

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETECÇÃO PARASITOLÓGICA, MOLECULAR E
SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis* E *Babesia canis* EM CÃES
DA REGIÃO CENTRO - ORIENTAL DA COLÔMBIA.**

Giovanni Vargas Hernández
Medico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETECÇÃO PARASITOLÓGICA, MOLECULAR E
SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis* E *Babesia canis* EM CÃES
DA REGIÃO CENTRO - ORIENTAL DA COLÔMBIA.**

Giovanni Vargas Hernández

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GIOVANNI VARGAS HERNÁNDEZ – nascido na cidade de Bogotá – Colômbia em 13 de outubro de 1972. Concluiu o curso de Tecnólogo em Administração Agropecuária pelo Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA – Mosquera – Colômbia, em 1994. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidad Nacional de Colômbia – UN - campus Bogotá, em 2002. Durante a graduação, participou como monitor de aulas práticas de Clínica Médica de pequenos animais para estudantes de último ano da Universidad Nacional de Colômbia, sede Bogotá. Trabalhou como autônomo em Clínica Veterinária, até 2004. Em 2005 trabalhou como professor na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidad de Pamplona – Nte. de Santander – Colômbia. Em 2006, foi convidado pela Faculdade de Medicina Veterinária y Zootecnia da Universidad Cooperativa de Colômbia – Campus Bucaramanga em Santander, para assumir as aulas de semiologia e Clínica-Cirúrgica de pequenos animais. Durante os meses de julho a dezembro de 2007, realizou estágios voluntários de treinamento e aperfeiçoamento nos setores de Clínica Médica, Nutrição Clínica e Oncologia de cães e gatos do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil. De setembro de 2008 até janeiro de 2010, trabalhou como voluntário no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil, na forma de plantões semanais, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Em 2009, concluiu o curso de Pós-Graduação *latu sensu* em Patologia Clínica Veterinária na Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil, sob orientação do Prof. José Jurandir Fagliari. Ingressou em março de 2008, no curso de Mestrado em Medicina Veterinária na área de concentração em Clínica Médica da Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa.

....Deus em nossas vidas é bastante parecido a uma sombra que nos acompanha ao longo de um dia cheio de sol e com poucas nuvens...
Ao ficar olhando nossa sombra é curioso tudo o que pode acontecer....
.... percebemos que ela nunca se afasta de nós.
.... algumas vezes, está em nossa frente como uma guia....
.... outras vezes, está ao nosso lado fazendo companhia....
... e em outras situações, quando mais precisamos dela, fica atrás de nós.
Você sabe o que ela está fazendo? Impulsionando-nos nas nossas dificuldades!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Erliquiose canina	03
2.2 Situação da Erliquiose canina na Colômbia	05
2.3 Babesiose canina	06
2.4 Situação da Babesiose canina na Colômbia	08
2.5 Erliquiose e Babesiose em humanos	09
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Áreas de estudo	11
3.1.1 Cidade de Bogotá e respectivas instituições colaboradoras.	13
3.1.2 Cidade de Villavicencio e respectivas instituições colaboradoras	13
3.1.3 Cidade de Bucaramanga e respectivas instituições colaboradoras	14
3.2 Seleção das amostras experimentais	15
3.3 Coleta das amostras	16
3.4 Confecção de esfregaços sangüíneos	16
3.5 Avaliação hematológica	17
3.6 Técnicas das Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia canis</i>	17
3.7 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	18
3.7.1 Extração de DNA de sangue total	18
3.7.2 Amplificação do DNA do gênero <i>Ehrlichia</i>	18

3.7.3 Amplificação do DNA da espécie <i>Ehrlichia canis</i>	19
3.7.4 Amplificação do DNA da espécie <i>Babesia canis</i>	20
3.7.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose	20
3.8 Reações de Seqüenciamento	21
3.8.1 Purificação dos amplicómeros de amostras positivas	21
3.8.2 Quantificação de DNA dos amplicómeros	21
3.8.3 Reação de Seqüenciamento	21
3.8.4 Análise das seqüências e construção da árvore filogenética.....	23
3.9 Análise estatístico	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Detecção de carrapatos e avaliação hematológica	25
4.2 Pesquisa parasitológica	28
4.3 Reações de imunofluorescência indireta (RIFI)	28
4.3.1 Soropositividade para <i>Ehrlichia canis</i>	28
4.3.2 Soropositividade para <i>Babesia canis</i>	29
4.3.3 Co-soropositividade e co-soronegatividade para <i>B. canis</i> e <i>E. canis</i>	30
4.4 Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR)	30
4.4.1 Resultados da nested PCR para <i>E. canis</i>	30
4.4.2 Resultados da PCR para <i>B. canis</i>	31
4.4.3 Inter-relação dos produtos da nested PCR e da Sorologia para <i>E. canis</i>	32
4.4.4 Inter-relação dos produtos da PCR e a Sorologia para <i>B.</i> <i>canis</i>	32
4.5 Análise dos dados	34
4.6 Análises das similaridades dos produtos seqüenciados obtidas pelo BLAST	36
4.6.1 Análises das similaridades observadas para <i>E.canis</i>	36
4.6.2 Análises das similaridades observadas para <i>B. canis</i>	37

4.7 Dendogramas das árvores filogenéticas	37
4.7.1 Árvore filogenética de <i>E. canis</i> da Colômbia	37
4.7.2 Árvore filogenética de <i>B. canis</i> da Colômbia	38
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	59

Anexo A. Variações e medias dos valores normais do hemograma de cães

Anexo B.

Tabela que apresenta os valores observados menos o esperado, para cada uma das cidades.

Tabela que apresenta os autovalores de qui-quadrado, para cada uma das cidades, em negrito as correspondências observadas.

Anexo C.

Tabela que apresenta os valores observados menos o esperado, para a cidade de Villavicencio.

Tabela que apresenta os autovalores de qui-quadrado, para a cidade de Villavicencio, em negrito as correspondências observadas.

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Mapa da América do Sul, destacando em amarelo a Colômbia (superior direita)(A), e mapa da Colômbia destacando em vermelho as cidades mencionadas neste estudo: Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga (B). Fonte: www.comunidadandina.org/quienes/img/colombia.jpg e www.luventicos.org/colombia.gif</p>	12
<p>Figura 2. Mapa de altimetria, destacando as cidades Bogotá (*) e Villavicencio (*) em vermelho.....</p>	14
<p>Figura 3. Mapa de altimetria, destacando as cidades Bogotá (*), Bucaramanga (*) em vermelho.....</p>	14
<p>Figura 4. Intensa fluorescência exibida em piroplasmas de <i>B. canis</i>, frente aos soros testados (A). Células DH 82 infectadas com <i>E. canis</i>, mostrando intensa fluorescência frente aos soros testes (B). Técnica de Imunofluorescência Indireta. Unesp/ Jaboticabal; SP/ 2009.....</p>	18
<p>Figura 5. Valores de hematócrito encontrados para 91 cães provenientes das cidades colombianas de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga.....</p>	26
<p>Figura 6. Amostras de sangue de cães provenientes de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga, cidades Colombianas que apresentaram alterações nas contagens de leucócitos.....</p>	27
<p>Figura 7. Valores de trombócitos encontrados em 49 amostras de sangue de cães trombocitopenicos das cidades colombianas de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga.....</p>	27
<p>Figura 8. Gel de agarose mostrando fragmentos de DNA de <i>E. canis</i> obtidos pela nested PCR de amostras de sangue de cães provenientes das cidades colombianas de Villavicencio e Bucaramanga, onde observam-se fragmentos de 398pb, que caracterizam os produtos amplificados. Linha 1, marcador de peso molecular (100pb); linha 2. controle positivo; linhas 3 a 15, amostras testadas; linha 16, água. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.....</p>	31

- Figura 9.** Gel de agarose mostrando os traçados electroforéticos da pesquisa de DNA de *B. canis* em sangue de cães provenientes da cidade colombiana de Villavicencio. Observam-se dois fragmentos de 408 pb que caracterizam o produto amplificado. Linha 1. marcador de peso molecular (100pb); linha 2. controle positivo; linhas 3 a 12. amostras colhidas dos cães da Colômbia; linha 13. água. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010..... 31
- Figura 10.** Mapa perceptual mostrando as associações entre cidades (Bogotá, Villavicencio (V_vicencio), Bucaramanga (Bucara.) e os fatores: HC (histórico de carrapatos), PC (presença de carrapatos), PN (plaquetas normais), PB (plaquetas baixas), SEN (sorologia erliquia negativo), SEP (sorologia erliquia positivo), SBN (sorologia babesia negativo), SBP (sorologia babesia positivo), PEN (PCR erliquia negativo), PEP (PCR erliquia positivo), PBN (PCR babesia negativo), PBP (PCR babesia positivo). As setas indicam as principais variáveis que se associaram com as respectivas cidades. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010..... 34
- Figura 11.** Mapa perceptual mostrando a situação na cidade de Villavicencio e as variáveis: HC (histórico de carrapatos), PC (presença de carrapatos), HTN (hematócrito normal), HTB (hematócrito baixo), PN (plaquetas normais), PB (plaquetas baixas), SEN (sorologia erliquia negativa), SEP (sorologia erliquia positiva), SBN (sorologia babesia negativa), SBP (sorologia babesia positiva), PEN (PCR erliquia negativa), PEP (PCR erliquia positiva). As principais associações estão destacadas nos círculos (azul e vermelho). No círculo azul visualiza-se correspondência entre HC, HCT, PN, SBN e PEN; no círculo vermelho a correspondência é dada entre PC, HTB, PB, SEP, SBP e PEP. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010..... 35
- Figura 12.** Dendograma filogenético exibindo as amostras positivas para o gênero *Ehrlichia canis* comparando-se com os outros membros da família *Anaplasmataceae* obtidas com sequência parciais do gene 16S rRNA (5´-3´) de amostras de sangue de cães da Colômbia naturalmente infectados provenientes das cidades de Villavicencio (49, 50) e Bucaramanga (57, 81). O método de construção foi calculado pelo algoritmo “neighbor-joining” e Kimura-2 parâmetros de 1000 repetições. As sequência utilizadas

nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank. Unesp. Campus de Jaboticabal, 2010.....	38
Figura 13. Dendograma filogenético exibindo as amostras positivas para o gênero <i>Babesia canis</i> obtidas com seqüência parciais do gene 18S rRNA (5´-3´) de amostras de sangue de cães colombianos naturalmente infectados provenientes das cidades de Villavicencio (53, 74) e Bucaramanga (57, 81). O método de construção foi calculado pelo algoritmo “neighbor-joining” e Kimura-2 parâmetros de 1000 repetições. As sequências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank. Unesp. Campus de Jaboticabal, 2010.....	39

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Cidades, instituições, identificação dos locais de coleta (Grupos) e número de amostras de sangue de cães para este estudo. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.....	15
Quadro 2. Resultados da pesquisa parasitológica com esfregaços sanguíneos de 91 cães colombianos, provenientes das cidades de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.....	28
Quadro 3. Resultados obtidos nas pesquisas de anticorpos anti- <i>E. canis</i> e anti- <i>B. canis</i> , de 91 amostras de soro de cães, provenientes das cidades colombianas de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga, segundo instituição de origem, soropositividade e soronegatividade observadas. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.....	29
Quadro 4. Resultados obtidos na pesquisa de DNA de <i>E. canis</i> (nPCR) e <i>B. canis</i> (PCR), em sangue de 91 cães provenientes das cidades colombianas de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga, segundo os grupos. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.....	32
Quadro 5. Comparação entre os testes diagnósticos (RIFI e PCR) na detecção dos hemoparasitas <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i> . Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.....	33
Quadro 6. Resumo dos resultados, segundo as provas utilizadas para a detecção direta e indireta de <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i> em 91 cães provenientes das cidades colombianas Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.....	33

DETECÇÃO PARASITOLÓGICA, MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis* E *Babesia canis* EM CÃES DA REGIÃO CENTRO - ORIENTAL DA COLÔMBIA.

RESUMO – A babesiose e a erliquiose canina são doenças comuns em cães, transmitidas pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus*. Os sinais e sintomas dessas doenças não são específicos. A detecção dos parasitos em esfregaços sanguíneos nem sempre é possível e a detecção sorológica pode indicar apenas que o animal teve contato com o agente, mas não necessariamente a doença ativa. Na Colômbia existem poucas pesquisas sobre a epidemiologia e diagnóstico de erliquiose e babesiose em cães, as poucas existentes se basearam na detecção dos hemoparasitas em esfregaços sanguíneos, ou de anticorpos específicos. Sendo assim propôs-se este estudo com o objetivo de pesquisar a erliquiose e a babesiose em esfregaços sanguíneos associados a provas sorológicas e moleculares em cães da região centro-oriental de Colômbia. Amostras de sangue e soro de 91 cães, provenientes das cidades de Bogotá (n=21), Villavicencio (n=31) e Bucaramanga (n=39) foram submetidas a pesquisa parasitológica, detecção de anticorpos anti-*B. canis* e anti-*E. canis* e detecção molecular de *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*. Os resultados mostraram que dentre as 91 amostras testadas, 4% e 5% delas apresentaram *E. canis* e *B. canis*, respectivamente nas pesquisas parasitológicas dos esfregaços sanguíneos. Nas mesmas amostras, 82% e 51% delas apresentaram anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*, respectivamente e, em 40% e 5%, foram detectados os DNA de *E. canis* e de *B. canis*, respectivamente. Os amplicons foram confirmados por seqüenciamento e o DNA de *E. canis* e de *B. canis* obtidos mostraram similaridade genética de 98% a 99% com amostras de *E. canis* e de *B. canis* isoladas em outros países, as árvores filogenéticas dos agentes pesquisados foram.

Palavras-chave: hemoparasitas, erliquiose, babesiose, America do sul, cão, diagnóstico

**PARASITOLOGICAL, MOLECULAR AND SEROLOGICAL DETECTION OF *Ehrlichia canis*
AND *Babesia canis* IN DOGS FROM CENTRAL-EASTERN REGION OF REPUBLIC OF
COLOMBIA.**

SUMMARY – Canine babesiosis and ehrlichiosis are common diseases in dogs, and are transmitted by the vector *Rhipicephalus sanguineus*. The clinical signs of these diseases are not specific. Detection of parasites in blood smears is not always possible and the serological detection could only indicate that the animal has had contact with the agent and not necessarily that the disease is being developed. In Colombia, there are few reports on canine babesiosis and ehrlichiosis's epidemiology and diagnosis, being them based only on the detection of haemoparasites in blood smears and detection of antibodies. The purpose of the present study was to investigate the presence of *Ehrlichia sp.* and *Babesia sp.* in blood smears, associated with serological and molecular detection of these parasites in dog blood samples from the middle east region of Colombia. Blood and sera samples from 91 dogs from Bogotá (n=21), Villavicencio (n=31) and Bucaramanga cities (n=39) were submitted to parasitological, serological and molecular detection of *B. canis* and *E. canis*. Among the 91 samples tested, 4% and 5% presented *E. canis* morulae and *B. canis* piroplasms in blood smears, respectively. Moreover, 82% and 51% of samples presented antibodies anti-*E. canis* and anti-*B. canis*, respectively. *E. canis* and *B. canis* DNA were detected in 40% and 5% of samples, respectively. The amplicons were confirmed by sequencing and the found DNA from *E. canis* and *B. canis* showed a genetic identity of 98% to 99% among samples from *E. canis* and *B. canis* isolated from other countries. Finally, phylogenetic trees were constructed from both agents.

Key words: hemoparasite, ehrlichiosis, babesiosis, Republic of Colombia, dogs, diagnosis

1. INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis e *Babesia canis* são considerados os hemoparasitas mais comuns em cães, os quais influenciam e comprometem sua saúde (NELSON, 2001; GREENE, 2006). A situação epidemiológica destas doenças é parcialmente conhecida em vários países da América do Sul (OPS/OMS-09/2004).

A erliquiose e a babesiose caninas são enfermidades reconhecidas na Colômbia (BATISTA, 1980; BENAVIDES & RAMIREZ, 2003), mas a epidemiologia e técnicas de diagnóstico são pouco conhecidas e desenvolvidas (OPS/OMS, 2004). Este fato indica a necessidade de detecção dos agentes etiológicos baseado nas principais técnicas diagnósticas mais atuais.

Na Colômbia, os diagnósticos de erliquiose e babesiose se baseiam no exame físico, histórico de contato com carrapatos, resposta ao tratamento ou observação dos hemoparasitos em esfregaços de sangue periférico, sendo técnicas que oferecem baixa sensibilidade e pobre especificidade para um diagnóstico seguro.

Apesar da grande importância do diagnóstico molecular nas hemoparasitoses caninas, sabe-se que na Colômbia esta ferramenta ainda não é utilizada como rotina diagnóstica. Sendo assim, não há esclarecimento sobre os principais gêneros e espécies de hemoparasitas que acometem os cães naquele país. Os dados epidemiológicos atualmente disponíveis descrevem a distribuição destas doenças, especialmente nos Estados Unidos, Europa e também no Brasil. Presume-se que uma proporção considerável de cães da Colômbia possa estar infectada com erliquiose ou babesiose.

Já foi identificado em cães da Colômbia a presença do vetor *Rhipicephalus sanguineus*, assim como de outras espécies de carrapatos (CARDONA e RUBIO, 2006). Recentemente, Paternina e colaboradores (2009), analisaram 420 carrapatos colhidos de 50 cães infetados e observaram o predomínio do *Rhipicephalus sanguineus* (92,1%) em relação aos outros identificados (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma ovale*). A maioria dos estudos realizados na Colômbia sobre esta espécie de carrapato está relacionada com o setor pecuário. No estado de Antioquia, situado ao Norte da Colômbia, coletaram-se 42.858 carrapatos de bovinos, sendo 2,5% destes o *Rhipicephalus sanguineus* (LOPEZ, 1989). Em outro estudo, realizado no estado de Córdoba, também ao Norte da Colômbia, de um total de 11.899 carrapatos coletados de bovinos 0,25% eram *Rhipicephalus sanguineus* (DUEHNEN et al., 1990).

A marcada presença de carrapatos em cães, como o *Rhipicephalus sanguineus*, fazem destas doenças entidades que devem ser consideradas e avaliadas por técnicas mais sensíveis e específicas, visando conhecer a distribuição e a epidemiologia dos respectivos hemoparasitas, no país, inclusive pelo fato de serem doenças com grande potencial zoonótico.

No Brasil, particularmente em Minas Gerais, no ano de 2004, foi realizada uma consulta a vários especialistas da Organização Pan-americana da Saúde e da Organização Mundial da Saúde e esses concordaram que há vários gêneros e espécies da família *Anaplasmataceae*, os quais mantêm ciclos zoonóticos na natureza. Tal situação representa uma grande ameaça à saúde pública, por estes serem agentes da febre maculosa, do tifo, entre outras, em vastas áreas das Américas. Acrescenta também que no mesmo ano, há relatos não publicados de dois casos fatais de febre maculosa das Montanhas Rochosas na Colômbia (OPS/OMS-09/2004). No mesmo documento, Galvão comentou que nada era conhecido ou publicado sobre rickettsioses na Colômbia desde 1937, quando Luis Patiño Camargo apresentou um relatório sobre uma epidemia provocada por *R. rickettsii*, denominada, "Fiebre de Tobia". Tal fato mostra que as pesquisas na Colômbia ainda são incipientes devido a escassez de técnicas de diagnóstico específicas e devido a isso, a epidemiologia e a distribuição, tanto de vetores como de hemoparasitas são pouco conhecidos.

As infecções transmitidas pelos carrapatos são um problema emergente na população canina. Tradicionalmente estas infecções eram relacionadas com regiões tropicais e subtropicais, porém hoje é evidente um incremento destas enfermidades em climas temperados e ambientes urbanos de todo o mundo (SHAW et al., 2001). Nosso estudo foi desenvolvido com amostras de sangue e soro de cães da Colômbia, um país localizado na região tropical. Participaram dele cães com antecedentes de contato com carrapatos, distribuídos em seis diferentes grupos, com programas de vacinação, controle de ectoparasitas e nutrição diversos, provenientes de três cidades daquele país, com características geoclimáticas diversas, quanto temperatura e altitude.

Os resultados deste estudo, associados à reconhecida presença do carrapato vetor na Colômbia, poderão contribuir com outras pesquisas que promovam seu controle e que evidenciem riscos aos humanos naquele país.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erliquiose canina

A *Ehrlichia spp.* é um gênero de bactéria intracelular gram-negativa, sendo a *E. canis* a espécie mais comum em cães. Infecta células mononucleares, causando uma grave doença clínica (DUMLER et al., 2001; GREENE, 2006). A taxonomia das Ehrlichias ficou mais clara com os métodos da filogenia molecular. Recentemente elas foram reclassificadas e, se encontram dentro do Reino das bactérias, Filo das proteobacterias, Ordem Rickettsiales, Família anaplasmataceae e gênero das *Ehrlichias* (DUMLER et al., 2001)

A infecção por *E. canis* apresenta três fases: aguda, subclínica e crônica. A fase aguda inicia-se uma a três semanas após a infecção e dura de duas a quatro semanas. Os achados clinicopatológicos mais comuns são febre, anorexia, linfadenopatia, trombocitopenia, anemia arregenerativa, presença de mórulas em leucócitos e títulos sorológicos específicos variáveis (MURPHY et al., 1998). A fase subclínica pode durar anos e o animal elimina o microorganismo, mas na maioria das vezes ele persiste dentro das células, resultando na fase crônica da infecção (WANER et al., 2001). São poucas as alterações clínicas nesta fase, podendo o animal apresentar hiperglobulinemia, trombocitopenia e altos títulos de anticorpos (HARRUS et al., 1998). As alterações apresentadas na fase crônica originam-se das reações imunes contra o microorganismo intracelular, resultando em anemia, trombocitopenia, diátese hemorrágica, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia (HARRUS et al., 1999; WALKER et al., 2008). A trombocitopenia na fase crônica é mais grave por haver supressão da medula óssea (HARRUS et al., 1999; NELSON, 2001; GREENE, 2006).

O diagnóstico pode ser dado pela identificação direta de corpúsculos de inclusão ou mórulas de *E. canis* em leucócitos e plaquetas em esfregaços de sangue periférico (ELIAS, 1992), contudo a sensibilidade desta prova é baixa de 2 a 5% (OLIVEIRA et al., 2000). Mais recentemente, foi demonstrada superioridade de aproximadamente 49% na pesquisa de mórulas em material de citologia aspirativa de baço (FARIA, 2006).

Outra forma de diagnóstico utilizada é a detecção de anticorpos anti-*E. canis* no soro, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (RISTIC et al., 1972). O método é muito confiável e sensível na detecção de anticorpos em todas as fases da doença (WANER et al., 2001). Contudo, a RIFI não diferencia se a infecção é aguda ou se o animal já foi exposto ao antígeno, uma vez que os títulos de anticorpos permanecem altos por longo tempo, mesmo após a eliminação do parasita (IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 1998). Alguns autores comentam que não é confiável estabelecer o diagnóstico definitivo da erliquiose usando apenas testes sorológicos, especialmente em áreas endêmicas, uma vez que os cães podem, constantemente, sofrer reinfecção (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998). As reações sorológicas cruzadas entre espécies de erlíquias são comuns, razão pela qual a identificação da espécie pode não ser alcançada, evidenciando a importância de se utilizar técnicas de biologia molecular (WEN et al., 1997; NEER et al., 2002).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um ensaio altamente específico, especialmente quando utilizado em conjunto com a RIFI para o diagnóstico da erliquiose canina (HARRUS et al., 1998). A PCR é um teste que tem a capacidade de detectar baixa parasitemia e se um cão soropositivo é portador ou não, visto que, a sorologia pode manter-se positiva mesmo em animais livres do parasito (IQBAL et al., 1994, HARRUS et al., 1998). A PCR visa amplificar apenas um segmento comum ao gênero, o gene 16S rRNA (HIRATA et al., 1997), devido a alta conservação do mesmo entre as espécies de erlíquia (FOX et al., 1992). A identificação da espécie deve ser feita com a PCR tipo "NESTED", na qual é retirada uma fração do produto obtida da amplificação da PCR e então, nova reação com este produto é conduzida detectando-se a espécie-alvo (HIRATA et al., 1997). Faria (2006) e Nakaghi et al. (2008)

confirmaram que a nested PCR é mais sensível quando comparada à PCR em única amplificação para a detecção do DNA da *E. canis*.

2.2 Situação da Erliquiose canina na Colômbia

Poucos estudos têm sido feitos para se avaliar a incidência de erliquiose em cães na Colômbia. Em um destes, docentes da Universidad de Caldas, que fica na região Ocidental do país, relataram um caso de erliquiose canina, diagnosticado por meio de teste imunoenzimático (Snap-Idexx Laboratórios®), que detecta anticorpos anti-erliquia, borrelia e dirofilaria (BENAVIDES & RAMIREZ, 2003).

Pesquisadores da Universidad de los Llanos, localizada na cidade de Villavicencio, desenvolveram trabalhos na área. Em 2002 Parrado e Vargas, avaliando 30 cães com suspeita clínica de hemoparasitoses e com antecedentes de infestação por carrapatos, verificaram que 28 deles foram soropositivos para *Ehrlichia sp.* usando o teste ELISA. Em 2007, MARTINEZ desenvolveu um estudo retrospectivo em um hospital veterinário da mesma cidade, selecionando cães com sinais clínicos e alterações no hemograma sugestivas de erliquioses e desta forma foram encontrados 341 casos suspeitos de erliquiose.

A comparação entre as técnicas diagnósticas de RIFI e detecção direta do hemoparásita em esfregaços sanguíneos de 16 cães suspeitos de erliquiose foi também realizada na Universidade Cooperativa da Colômbia, situada na cidade de Bucaramanga, na região norte do país. A pesquisa confirmou a presença da doença em cães da cidade pelos dois métodos empregados (GOMEZ, 2002). Outro estudo, feito na mesma universidade e com as mesmas técnicas empregando 80 amostras de sangue canino, constatou superioridade da RIFI (41,25%) em relação ao esfregaço sanguíneo (1,25%) (CONTRERAS & SANABRIA, 2006).

Em 2009, Hidalgo et al., detectaram em uma população de cães de uma área rural da Colômbia (Villeta), anticorpos anti-*Ehrlichia sp.* e anti-*Rickettsia rickettsii*, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.

2.3 Babesiose canina

A babesiose é uma doença transmitida por carrapatos, cujo agente etiológico é o hematozoário do gênero *Babesia spp*, um piroplasma de 4-5µm (SWANGO et al.,1992). A patogenia inicia com a destruição do eritrócito pelo parasita (REMO, 1998). Um mecanismo patogênico adicional é induzido por mediadores inflamatórios levando à hipotensão e à síndrome do choque (BOOZER & MACINTIRE, 2003). Anemia hemolítica é o achado mais comum da infecção e pode ser acompanhada por numerosas alterações e complicações, sendo algumas delas inespecíficas (REMO, 1998; TABOADA, 1998).

O gênero *Babesia spp*. é classificado no Reino protista, Filo apicomplexa, Classe Sarcodina e Ordem piroplasmida. A taxonomia das espécies de *Babesia* que acometem os cães não se encontra totalmente definida (IRWIN, 2009). Em cães, duas espécies já foram identificadas como causadoras da babesiose, a *B. canis* e a *B. gibsoni*. A *B. canis* é mais freqüente em regiões tropicais, como a América do Sul, enquanto a *B. gibsoni* encontra-se na Ásia, África e Estados Unidos (REMO, 1998; HOMER, 2000; CORDERO, 2004).

São conhecidos, mundialmente, três subtipos de *B. canis*: *Babesia canis canis* encontrada na Europa; *Babesia canis vogeli* no Norte da África e América do Norte e a *Babesia canis rossi* no Sul da África (CORDERO, 2004). Mais recentemente, estes subtipos foram reclassificados e atualmente são consideradas outras espécies de babesias (*Babesia canis*, *Babesia vogeli* e *Babesia rossi*) (IRWIN, 2009). No Brasil, vários são os relatos de babesiose em cães (BRACCINI et al., 1992; FURUTA et al., 2009; OLIVEIRA & GUIMARÃES, 2002) e em outras espécies animais (MACHADO et al., 1997; ANDRÉ, 2010). Somente em 2005, FRICHE et al. caracterizaram molecularmente o subtipo *vogeli* da *Babesia canis*. A distribuição da babesiose em carnívoros é praticamente mundial. A doença pode surgir nos locais cuja temperatura e umidade permitem a presença dos carrapatos vetores (CORDERO, 2004).

As fontes de infecção são os carrapatos infectados, cães doentes e portadores sadios (SWANGO et al.,1992). No carrapato, a transmissão pode ser transovariana ou

transestadial. O contágio se dá pela inoculação do agente pelo carrapato, como também por transfusão sanguínea, fômites ou via transplacentária (CORDERO, 2004).

A patogenicidade do parasito varia com a virulência da cepa, a primo-infecção ou re-infecção, número de parasitas e taxa de penetração do agente. A babesia pode ser encontrada em todos os órgãos e tecidos do organismo, desta forma, a patogenia e os sinais clínicos apresentados variam de acordo com o órgão afetado (REMO, 1998). A infestação por um número considerável de babesias no encéfalo, ocasiona a formação de trombos nos capilares, e manifesta sinais de incoordenação, paresia, ataxia, convulsões, entre outras (CORDERO, 2004).

A ação patogênica do parasito sobre os eritrócitos é do tipo mecânico, ocasionando a destruição dos glóbulos vermelhos do sangue no momento em que acontece a divisão da babesia. Além disso, ocorre fagocitose dos eritrócitos parasitados e não parasitados, facilitada pelo sistema complemento (BOOZER & MACINTIRE, 2003). O período de incubação varia entre 4 e 20 dias e nos animais jovens a doença se apresenta na forma aguda com um período pré-patente de 4 a 6 dias (HOMER, 2000).

As manifestações iniciais da doença incluem: elevação da temperatura corporal, depressão e perda de peso, seguida de anemia. Ademais, podem estar presente reticulocitose, leucopenia, trombocitopenia, icterícia, edema, hemoglobinúria, hepatomegalia, esplenomegalia, vômitos, diarreia, sinais respiratórios, dificuldade locomotora, mialgia, paresia, paralisia, entre outros (GREENE, 2006). Animais adultos portadores da doença, também podem apresentar a forma crônica, a qual é desencadeada por situações de estresse, doenças concomitantes, gestação, entre outros. (BOOZER & MACINTIRE, 2003).

O prognóstico é considerado de reservado a pobre, principalmente em animais jovens. Em animais adultos, o prognóstico também é reservado, quando associado a outras doenças. Em animais imunocompetentes o quadro poderá evoluir para cura (CORDERO, 2004).

O diagnóstico clínico não é confiável dado que nenhum dos sinais é patognomônico, pelo contrário, estes podem se apresentar em qualquer doença. Os

métodos diagnósticos utilizados incluem a detecção direta ou indireta do parasito. A detecção direta, que ocorre pela presença de merozoitos nas hemácias em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, Field's ou Wright's (CLEVELAND et al., 2004); é uma prova específica, mas de baixa sensibilidade, já que a parasitemia e o período de parasitemia são variáveis (GREENE, 2006).

O diagnóstico indireto pela RIFI é considerado o teste de referência, por ser sensível (OLIVERA & GUIMARÃES, 2002), porém a especificidade é baixa, pois podem ocorrer reações cruzadas entre as espécies de *Babesia* (VIDOTTO & MANDUCCA, 2004). No Brasil, FURUTA et al. (2009) padronizaram e compararam os testes de ELISA e RIFI na detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis* na cidade de Jaboticabal/SP, evidenciando uma maior incidência de babesiose no teste de ELISA (67%) que no teste de RIFI (59%).

A PCR detecta fragmentos de DNA de *Babesia spp.* e proporciona o diagnóstico de infecções agudas, subclínicas ou crônicas, mesmo nos casos de baixa parasitemia. A PCR também pode ser utilizada para monitoramento de terapia, detecção de animais portadores e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica deste patógeno (VIDOTTO et al., 2004; CLEVELAND et al., 2004).

2.4 Situação da Babesiose canina na Colômbia

A babesiose canina tem um menor número de estudos em comparação à erliquiose canina na Colômbia. Em uma pesquisa realizada com 216 cães saudáveis no Estado de Córdoba, no norte do país, a prevalência de *Babesia canis*, pelo método do esfregaço sanguíneo corado com Wright e Giemsa, mostrou positividade de 0,93% (BATISTA, 1980). No mesmo estado, a detecção de anticorpos anti-*Babesia microti* em populações rurais e urbanas humanas mostrou uma prevalência de 30,6% (BUELVAS et al., 2008). Na Universidad de Pamplona, localizada no estado chamado Norte de Santander, ao norte da Colômbia, foi diagnosticado babesiose em um cão de três meses de idade, mediante a observação do parasito em esfregaço sanguíneo

(VARGAS, 2005 – comunicação pessoal). Outros registros de babesiose canina, na Colômbia, não foram encontrados na literatura consultada.

2.5 Erliquiose e Babesiose em humanos

Quase todas as espécies de erlíquia podem acometer o homem e causar alguma sintomatologia (WALKER, 2008). Na Europa é conhecido o potencial zoonótico destes parasitos após estudos epidemiológico-moleculares e soro-epidemiológicos, os quais mostraram um incremento de casos de infecções causadas por microrganismos transmitidos por carrapatos (babesia, erlíquias e rickettsias), evidenciando um importante risco para humanos (HUNFELD & BRADE, 2004). PEREZ et al. (1996), na Venezuela, sugerem por meio de caracterização antigênica e genética que a *E. canis* seja um agente causador de zoonose.

Vários trabalhos realizados nos últimos anos identificaram membros da família *Anaplasmataceae* como agentes patogênicos para humanos, como *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *A. phagocytophilum* (WALKER et al., 2008).

Em relação às babesioses, os humanos são mais comumente infectados pela *B. microti*, *B. divergens* e *B. bovis* (REITER & WEILAND, 1989; TABOADA, 1998), contudo os cães podem servir de hospedeiros acidentais para qualquer espécie de babesia (HUNFELD, 2004). Em 1995, em Paris, Marsaudon associou um caso de insuficiência renal aguda no homem ao diagnóstico de babesiose, cujo agente etiológico era *B. canis*.

A implementação e aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos para detecção de *E. canis* como de *B. canis*, no Brasil, podem contribuir para a detecção destas enfermidades em outros países da região, colaborando com pesquisas clínicas e epidemiológicas destas doenças na América do Sul, como recomendado no documento publicado pela OPS/OMS de 2004. Além disso, possibilita que profissionais da área possam implantar esses meios diagnósticos em seu país de origem e, dessa forma, estabelecer rotinas de trabalho e parcerias de pesquisas.

O presente estudo teve como objetivo geral identificar, mediante a detecção direta e indireta, a presença de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, em amostras de sangue e soro de cães com antecedentes de contato com carrapatos, associados ou não a presença de trombocitopenia, provenientes das cidades de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga, situadas na região Centro-Oriental da Colômbia.

Especificamente foram pesquisadas:

- A presença de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em esfregaços de sangue de cães com contato com carrapatos;
- Anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis* nos soros de cães, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI)
- O DNA da *Babesia canis* no sangue de cães pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando primers gênero e espécie-específicos;
- O DNA da *Ehrlichia canis* no sangue de cães, baseado na seqüência gênica do 16S rRNA, pela PCR em duas etapas (nested PCR), utilizando primers gênero-específico e espécie-específica;
- A correspondência entre as variáveis estudadas;
- E seqüenciadas as amostras positivas na nested PCR para *E. canis* e na PCR para *B. canis*, determinada a similaridade com seqüências já depositadas no GenBank e construídas as árvores filogenéticas dos patógenos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo

A Colômbia é um país da América do Sul, delimitada ao leste pela Venezuela e Brasil; ao sul pelo Equador e Peru e ao noroeste pelo Panamá.

As coletas de sangue de cães foram oriundas de três cidades da região centro-oriental da Colômbia. Bogotá (latitude 4°20'48"N/longitude 74°09'49"O), Bucaramanga (latitude 7°07'48"N/longitude 73°11'49"O), localizadas na região central e a cidade de Villavicencio (latitude 4°15'48"N/longitude 73°65'49"O), situada na região Oriental (Figura 1). No estudo, participaram seis instituições que desenvolvem atividades com populações de cães, cada uma delas com características de manejo e objetivos diferentes.



Figura 1. Mapa da América do Sul, destacando em amarelo a Colômbia (superior direita)(A), e mapa da Colômbia destacando em vermelho, as cidades foco deste estudo: Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga (B). Fonte: www.comunidadandina.org/quienes/img/colombia.jpg e www.luenticos.org/colombia.gif

3.1.1 Cidade de Bogotá e respectivas instituições colaboradoras

Bogotá está localizada a uma altitude de 2640m com temperatura média de 14°C (Figura 2) e duas foram as instituições colaboradoras (grupos 1 e 2).

Grupo 1 - Centro de adiestramento canino para la detección de artefatos explosivos “SLP Hector Pacheco Lopez”: Instituição do estado responsável pela vigilância do centro de detenção “carcel Modelo”. Os cães são especializados na detecção de narcóticos e passam por adestramento na cidade de Acácias que fica a 30 Km da cidade de Villavicencio. Os animais são alimentados com ração comercial, vacinados e o controle de parasitas (endo e ecto) é realizado periodicamente. Total de 13 amostras, provenientes de cães da família retriever (Quadro 1).

Grupo 2 - Instituto Nacional Penitenciario y Carcelário: Instituição do estado responsável pelo treinamento de cães na detecção de explosivos, os animais fazem parte do Exército da Colômbia. Estes cães viajam por diferentes regiões do país, muitas com condições ambientais desfavoráveis. Os animais são alimentados com ração comercial, vacinados e o controle de parasitas (endo e ecto) é feito periodicamente. Total de oito amostras, provenientes de cães da família retriever (Quadro 1).

3.1.2 Cidade de Villavicencio e respectivas instituições colaboradoras

Villavicencio está localizada a uma altitude de 467m com temperatura média de 23°C (Figura 2), nesta também duas foram as instituições colaboradoras (grupos 3 e 4).

Grupo 3 - Fundación Hogar del Perro: Refúgio de cães, de caráter privado e sem fim lucrativo. Instituição de escassos recursos, que oferece cuidado a cães abandonados. As vacinações e controle de parasitas não são feitos com a periodicidade adequada e a alimentação baseia-se em ração comercial e comida caseira. Total de 21 amostras, provenientes de cães sem raça definida (Quadro 1).

Grupo 4 - Coso Municipal: centro de controle de Zoonoses vinculado à

Secretaria de Saúde, responsável pelo controle e captura de cães errantes. Com escassos recursos, oferece apenas atenção básica e a alimentação baseia-se em ração comercial. Total de 10 amostras, a maioria provenientes de cães sem raça definida (Quadro 1).



Figura 2. Mapa de altimetria, destacando as cidades Bogotá (*) e Villavicencio (*) em vermelho.

3.1.3 Cidade de Bucaramanga e respectivas instituições colaboradoras

Bucaramanga está localizada a uma altitude de 950m com temperatura média de 24°C (Figura 3) e também duas instituições colaboram com este estudo (grupos 5 e 6).

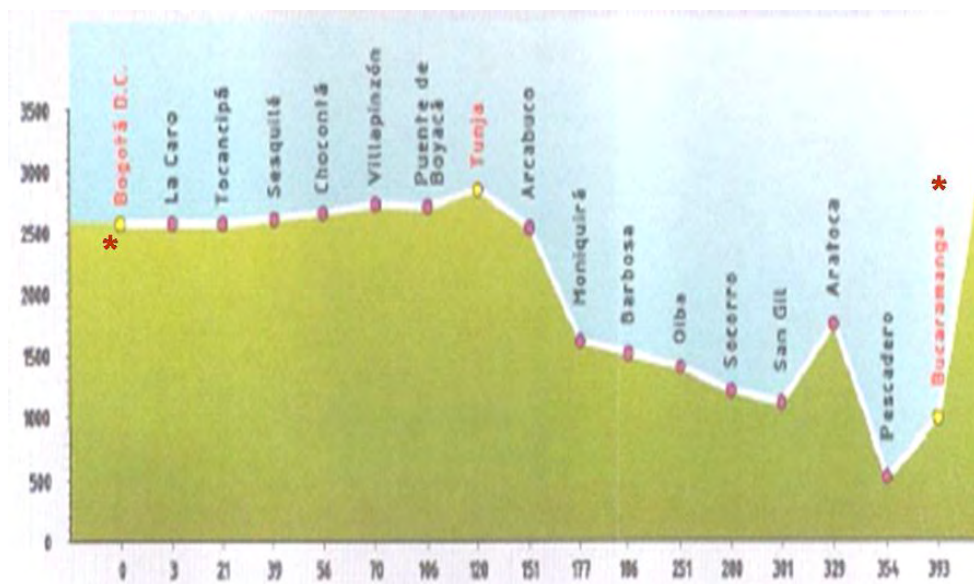


Figura 3. Mapa de altimetria, destacando as cidades Bogotá (*), Bucaramanga (*) em vermelho.

Grupo 5 - Clínica Veterinaria de pequeños animales “Santiago Reyes Amaya”: Instituição de caráter privado, com fim lucrativo, dedicada à atenção médica de caninos e felinos. Não foram obtidas informações acerca dos cuidados sanitários e alimentação dos animais. Total de 19 amostras, provenientes de cães de varias raças (Quadro 1).

Grupo 6 – Fundación protectora de animales: Refúgio de cães abandonados, de caráter privado e sem fim lucrativo. Por contar com escassos recursos, as vacinações e controle de parasitas não são feitos com a periodicidade adequada e a alimentação é baseada em ração e comida caseira. Total de 20 amostras, provenientes de cães sem raça definida (Quadro 1).

Quadro 1. Cidades, instituições, identificação dos locais de coleta (Grupos) e número de amostras de sangue de cães para este estudo. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010

Cidade	Instituição	Identificação	amostras (n)
Bogotá	Instituto Nacional Penitenciario y Carcelario	Grupo 1	13
	Centro de adiestramiento canino para la detección de artefactos explosivos “SLP Hector Pacheco Lopez”	Grupo2	8
Villavicencio	Fundación Hogar del Perro	Grupo 3	21
	Coso Municipal - Centro de control de zoonoses	Grupo 4	10
Bucaramanga	Clínica Veterinaria de pequeños animales “Santiago Reyes Amaya”	Grupo 5	19
	Fundación protectora de animales	Grupo 6	20
TOTAL			91

3.2 Seleção das amostras experimentais

Utilizou-se como critério de inclusão a presença ou histórico de contato com carrapatos e, particularmente na Clínica Veterinaria de pequeños animales “Santiago

Reyes Amaya” (Grupo 5), aplicou-se o critério de pacientes com suspeita clínica de hemoparasitoses, associada à presença de trombocitopenia (abaixo de 200.000/ μ l). Desta forma foram coletadas amostras de 91 cães (Quadro 1).

3.3 Coleta das amostras

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular utilizando-se de agulhas e seringas estéreis e descartáveis. A quantidade de sangue coletado foi de 10 mL por cão, sendo 4 mL de sangue colocados em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante e os 6 mL remanescentes em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro. Após a realização da avaliação hematológica as amostras de sangue e soro foram então alíquotizadas em microtubos estéreis de 1,5 mL, identificadas e mantidas a -20°C , para posterior uso nos ensaios de PCR (sangue total) e provas sorológicas (RIFI). As amostras foram colhidas no período de dezembro de 2008 a abril de 2009.

O transporte das amostras foi feito de acordo com as normativas do Decreto nº 24548, de 03 de julho de 1934 e o Decreto nº 5741 de 30 de março de 2006 e a Instrução Normativa nº 01 de 14/01/2004, cumprindo com as exigências da Gerência Geral de Portos, Aeroportos e Fronteiras (GGPAF) / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), autorização de importação **N.º SG.1308/08** – SP.

3.4 Confecção de esfregaços sanguíneos

Alíquotas de sangue periférico obtidas a partir da punção capilar marginal da ponta da orelha dos cães foram destinadas à confecção de esfregaços sanguíneos finos. Os esfregaços foram confeccionados imediatamente após as coletas e depois de secos foram fixados em metanol durante três minutos e armazenados em laminários plásticos para posteriormente ser corados pelo corante de Rosenfeld modificado (Giemsa 0,978g, May-Grünwald 0,54g, Metanol 1L). A presença de corpúsculos de inclusão, ou de mórulas, sugestivos de *Ehrlichia spp.* nos leucócitos ou plaquetas e de

piroplasmas, característicos de *Babesia spp.*, em hemácias foi pesquisada em microscopia de luz (x100).

3.5 Avaliação hematológica

As contagens globais de leucócitos e plaquetas, bem como a determinação do hematócrito foram realizadas de acordo com os protocolos estabelecidos pelos laboratórios veterinários localizados nas respectivas cidades onde se processaram as coletas, num período máximo de duas horas após as coletas das mesmas.

3.6 Técnicas das Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*

As técnicas empregadas foram desenvolvidas e padronizadas por OLIVEIRA et al. (2000) e NAKAGHI et al. (2008) para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia spp.* e por FURUTA et al. (2009) para a detecção de anticorpos anti-*Babesia spp.*, ambas as técnicas empregadas na rotina do Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Animal da UNESP, campus de Jaboticabal, onde foram realizados os ensaios.

As amostras de soro foram diluídas a 1:20 e 1:40 em solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,2) para a detecção de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*, respectivamente. Foram depositados 10 μ L de cada soro diluído em cada um dos poços das lâminas com antígeno de *E. canis*, como nas lâminas com antígeno de *B. canis* como substratos, reservando-se dois poços, em cada lâmina, para a adição dos controles positivo e negativo, amostras sabidamente positivas e negativas frente aos antígenos de *E. canis* e de *B. canis* e provenientes da soroteca do Lab. de Imunoparasitologia do Dep. de Patologia Animal/ UNESP As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos para *E. canis* e por 45 minutos para *B. canis*, em câmara úmida.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS (pH 7,2), secas e a cada poço adicionados 10 μ L de conjugado (anti-IgG de cão, marcado pelo isotiocianato de fluoresceína – Sigma Aldrich®), diluído conforme orientação do fabricante. As lâminas

foram novamente incubadas, como já descrito. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas à microscopia com emissão de luz ultravioleta. Para *E. canis*, foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:20 e a positividade da reação foi dada pela observação de fluorescência nas mórulas (Figura 4 A). Para *B. canis*, foram consideradas positivas as reações em que toda a periferia do piroplasma apresentasse fluorescência, a partir da diluição de 1:40 (Figura 4 B). A intensidade de fluorescência das lâminas foi avaliada comparativamente com as amostras de soro controle positivo e negativo.

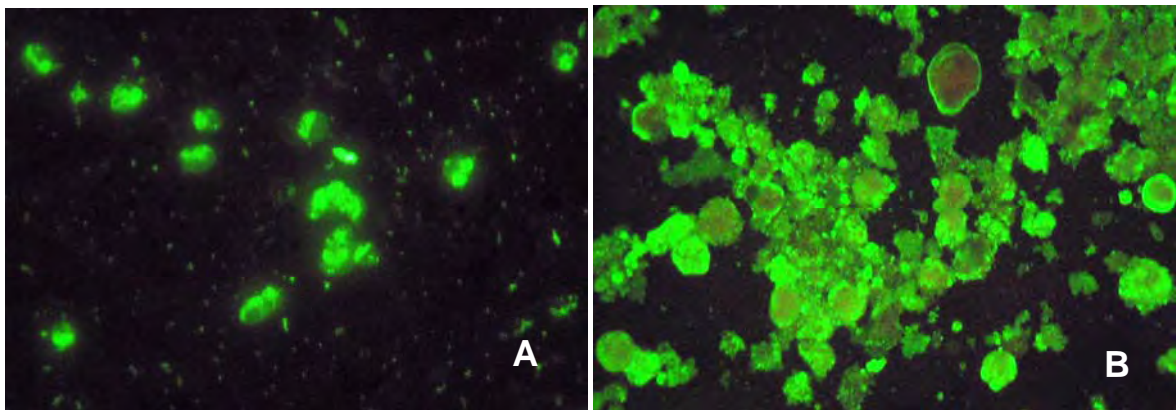


Figura 4. Intensa fluorescência exibida em piroplasmas de *B. canis*, frente aos soros testados (A). Células DH 82 infectadas com *E. canis*, mostrando intensa fluorescência frente aos soros testes (B). Técnica de Imunofluorescência Indireta. Unesp, Jaboticabal, SP, 2009.

3.7 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

3.7.1 Extração de DNA de sangue total

A extração de DNA de sangue total foi realizada com o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagem®), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi então identificado e armazenado a -20°C para a realização da PCR.

3.7.2 Amplificação do DNA do gênero *Ehrlichia*

O método de amplificação foi desenvolvido por MURPHY et al. (1998) e padronizado para o sistema por NAKAGHI et al. (2008), DAGNONE et al. (2009) e empregado por FARIA (2006) e realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Animal da UNESP, campus de Jaboticabal.

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene 16SrRNA presente em todas as erliquias: ECC (5'-GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3') e ECB (5'-GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3'). A amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 50µL, contendo uma mistura contendo 10µL do DNA - amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP- Invitrogen®), 20pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1.25U de TaqDNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X - 100nM Tris-HCL pH 9,0, 500mM KCl) e água ultra pura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 50µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento ou hibridização a 65°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Este processo foi realizado em aparelho termociclador modelo PTC- 100 TM- Peltier- Effect Cycling (MJ Research, Inc).

3.7.3 Amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia canis*

A reação de amplificação do tipo *nested* para *E.canis* foi realizada utilizando-se os produtos obtidos na primeira amplificação (para gênero), como moldes para os *primers* das próximas reações. Para as reações específicas para *E. canis* foram utilizados os primers ECAN5 (5'CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA3') e HE3 (5'TATAGGTA CCGTCATT ATCTTCCCTAT-3').

Para a reação de nested PCR (nPCR) foram utilizadas as mesmas soluções da PCR, além de 1µL da amostra de DNA amplificado e os *primers* espécie-específicos. A

reação consistiu de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto e 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1,5 minuto, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72°C (MURPHY et al.,1998).

3.7.4 Amplificação do DNA da espécie *Babesia canis*

O método de amplificação foi desenvolvido e padronizado por CARRET et al. (1999) e empregado na rotina do Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Animal da UNESP, campus de Jaboticabal.

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR foram baseados na sequência parcial do gene da subunidade menor do 18S rDNA presente na maioria das espécies de babesias: Piro A (5'AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') e Piro B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por CARRET et al. (1999), com algumas modificações, utilizando as mesmas soluções e concentrações da PCR para *E. canis* descritas anteriormente, com exceção da Taq Polimerase (Invitrogen®), da qual foi utilizada 0,5 U. A reação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

3.7.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (Invitrogen®) (0,5µL/mL) em tampão de corrida TEB1X. A eletroforese foi realizada a 90V/50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100pb DNA Ladder - Invitrogen®). Os resultados foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E)

acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-Eye II-Startagene®).

3.8 Reações de Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento e a quantificação de DNA dos ampliceros foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da UNESP, campus de Jaboticabal.

3.8.1 Purificação dos ampliceros de amostras positivas

Após a reação de PCR para *B. canis* e nested PCR para *E. canis*, os amplicons positivos foram purificados utilizando-se GeneClean II (QBiogene®), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8.2 Quantificação de DNA dos ampliceros

Cada amostra purificada foi então submetida a uma nova eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 1,0%, corado com Brometo de Etídeo 0.01% (Invitrogen®), em cuba horizontal, com solução de TBE 1X como meio condutor de corrida. O tempo de eletroforese foi de uma hora e trinta minutos com fonte a 50mA e 100V. Um marcador de peso molecular (“Low Mass DNA Ladder” - Invitrogen®) foi adicionado à primeira canaleta de cada amostra purificada para se obter uma medida comparativa das quantidades de DNA das amostras.

3.8.3 Reação de Seqüenciamento

Os amplicons purificados e quantificados foram utilizados na concentração aproximada de 80–100ng de DNA-amostra. Inicialmente foi preparado um mix da reação, composto de 3,5µL de tampão “Save-Money” (MgCl₂ 1M; Tris-HCl 1M pH 9,0;

água estéril ultra pura q.s.p 200 μL), 0,5 μL de “BigDye” (BigDye^r Terminator V3.1 9 Cycle Sequencing Kit, Applied BiosystemsTM) e 2 μL do oligonucleotídeo iniciador “forward” que originou o amplímero (na concentração de 5pmol/ μL). Utilizou-se uma placa de 96 cavidades (PP-PCR plate – Mil Halben Rand Fur ABI, Greiner BioOneTM) colocada em gelo e, a cada cavidade, adicionaram-se, inicialmente, 3 μL de água ultra-pura, 1 μL da amostra a ser seqüenciada e 6 μL do mix. Para as amostras contendo baixas quantidades de DNA foi adicionado maior volume da amostra, e o volume de água foi alterado (q.s.p 10 μL). A placa foi então submetida à centrifugação (Centrifuga de placa modelo – Rotina 46 R, Hettich-ZentrifugerTM) por 20 segundos, a 1200rpm e depois a placa foi vedada com tampa de silicone e colocada em aparelho termociclador (Programmable Thermal Controller – Peltier Effect Cucling Cycler, Modelo PTC-100, MJ ResearchTM), com programação de 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 52°C, 4 minutos a 60°C e, finalizando, a 4°C. Após essa etapa, foram adicionados 80 μL de Isopropanol 75% (temperatura ambiente) para cada poço. A placa foi tampada e incubada em centrífuga de placa (Rotina 46 R, Hettich-ZentrifugerTM) a 20°C por 15 minutos. Após essa pausa, a placa foi centrifugada a 20°C, em 1310xg, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, cuidadosamente, em papel absorvente. Adicionaram-se 200 μL de etanol 70% (temperatura ambiente) para cada poço. A placa foi vedada com adesivo plástico e centrifugada (Rotanta 46 R, Hettich-ZentrifugerTM) a 20°C, em 1310xg, por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente em papel absorvente. Essa etapa foi realizada duas vezes. A placa foi colocada sem tampa sobre um papel toalha e centrifugada (Rotanta 46R, Hettich-ZentrifugerTM) à temperatura ambiente em 1310xg, por 20 segundos. Em seguida, a placa foi então colocada, sem tampa, em uma bomba de alto vácuo (EduardsTM) por 5 minutos. A seguir adicionou-se - se 9 μL de formamida (Hi Di, Applied BiosystemsTM) a cada poço, e a placa foi vedada com tampa de silicone e levada a um aparelho termociclador com a programação de 95°C, por 5 minutos e finalizando a 4°C . Imediatamente após essa etapa, a placa foi colocada em gelo por 3 minutos. E a seguir, foi colocada no aparelho seqüenciador (3100 Hitachi Genetic Analyser – ABI PRISM, Applied BiosystemsTM).

3.8.4 Análise das sequências e construção da árvore filogenética

As sequências de nucleotídeos obtidas no seqüenciamento foram submetidas a alinhamento e análise. A trimagem foi feita pelo programa Phred (EWING et al., 1997), que avalia os eletroferogramas gerados nos seqüenciamentos dos clones, observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base seqüenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram consideradas as bases com qualidade acima de 20.

Para analisar as similaridades entre as sequências dos fragmentos amplificados de DNA de *E. canis* e *B. canis* com aquelas depositadas no GenBank foram utilizados os programas “BLAST 2 sequences” e “nucleotide BLAST”. O programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) é uma ferramenta da web utilizada para localizar alinhamentos entre uma seqüência de interesse pesquisada e dados internacionais existentes já publicados no GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Blast>) (BENSON et al., 2002).

As seqüências salvas em modo “FASTA” foram analisadas então com o programa CLUSTAL-X (THOMPSON et al., 1997), no qual foram obtidos parâmetros de alinhamentos pareados, múltiplos alinhamentos e alinhamentos completos. As seqüências foram então salvas em modo “.ALN” e utilizadas no programa MEGA-4 (“Phylogenetic and molecular evolutionary analyses – MEGA version 2.1) (KUMAR et al., 2001). As seqüências salvas foram convertidas em modo “.meg”, sendo realizados cortes de fragmentos (pedaços desalinhados). No programa MEGA foram formadas árvores filogenéticas. As seqüências alinhadas foram reamostradas com “bootstrap” de 1000, com o método “neighbor-joining” e parâmetros Kimura-2.

3.9 Análises estatístico

Uma tabela com as contagens do número de cães com histórico ou presença de carrapatos, da avaliação hematológica e testes diagnósticos foi padronizada pelo valor do Qui-quadrado (χ^2) e a seguir submetida à análise de correspondência múltipla que,

constrói mapas perceptuais com os autovalores da tabela padronizada destacando as correspondências existentes entre variáveis.

O valor do Qui - quadrado para cada célula foi calculado pela fórmula:

$$\text{Valor qui - quadrado } (\chi^2) \text{ de uma célula} = \frac{\text{diferença}^2}{\text{valor esperado}}$$

Onde o valor esperado para cada célula foi calculado pela fórmula:

$$\text{valor esperado da célula} = \frac{\text{total da linha que contém a célula} \times \text{total da coluna contém a célula}}{\text{valor total}}$$

As análises foram processadas no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil utilizando o software STATISTICA versão 7 (STATSOFT, 2004).

4. RESULTADOS

4.1 Detecção de carrapatos e avaliação hematológica

A pesquisa de carrapatos feita na anamnese e exame da pele dos 91 cães (corpo em geral e espaços interdigitais, coxim plantar e orelhas em especial) mostrou que 63 cães (69%) apresentavam história de contato com carrapatos; sendo 21 (33%) provenientes da cidade de Bogotá, 22 (35%) da cidade de Villavicencio e 20 (23%) da cidade de Bucaramanga. Dos 91 cães, 28 (31%) apresentaram na pele carrapatos; nove (32%) provenientes da cidade de Villavicencio e 19 (68%) da cidade de Bucaramanga.

Das 91 amostras de sangue foram feitas avaliações hematológicas de 89, as duas remanescentes, procedentes da cidade de Bogotá (grupo 2), apresentaram coágulos, impedindo seu processamento e análise (Figura 5. Bogotá). Os valores de normalidade hematológica para cães estão apresentados no anexo A.

Trinta e um cães (34%) apresentaram diminuição do hematócrito, que variou de 8 a 36%, com média de 28,2%. Destes, dezessete (54,8%) eram provenientes da cidade de Bucaramanga, 14 (45,2%) da cidade de Villavicencio e na cidade de Bogotá nenhum animal apresentou alteração neste parâmetro (Figura 5). Dos 31 cães, 22 (70%) apresentaram trombocitopenia concomitante.

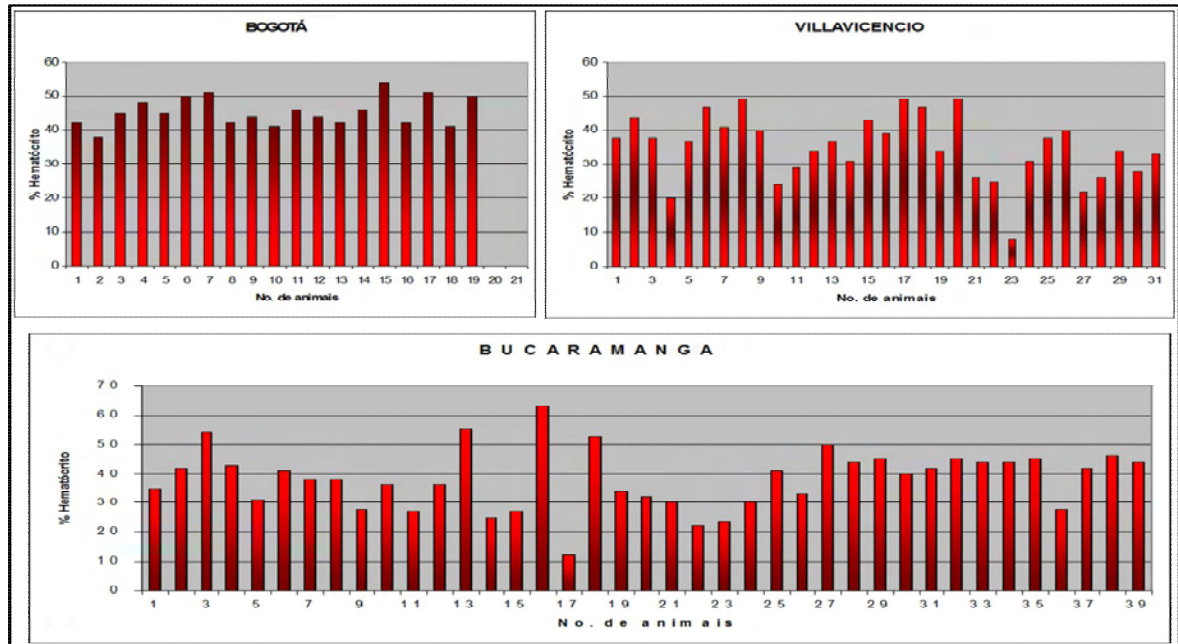


Figura 5. Valores de hematócrito encontrados para 91 cães provenientes das cidades colombianas de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga. Jaboticabal, 2010.

Foi observada em oito (8,79%) animais leucopenia neutropênica, que variou de 2.900/ μ L a 5.390/ μ L (3.212/ μ L.), sendo mais comum na cidade de Bucaramanga, com seis casos (75%). Os outros dois casos foram apresentados nas cidades de Bogotá e Villavicencio, respectivamente (Figura 6).

Foi observada leucocitose neutrofílica em 18 (19,78%) amostras, que variou de 17.200/ μ L a 31.510/ μ L (18.831/ μ L.), apresentando-se com maior freqüência na cidade de Villavicencio com 11 casos (61%) (Figura 6).

A cidade de Bogotá foi o local que apresentou o menor número de casos com alterações na contagem de leucócitos. Apenas dois animais apresentaram leucocitose (2%) e um (1%) apresentou leucopenia (Figura 6).

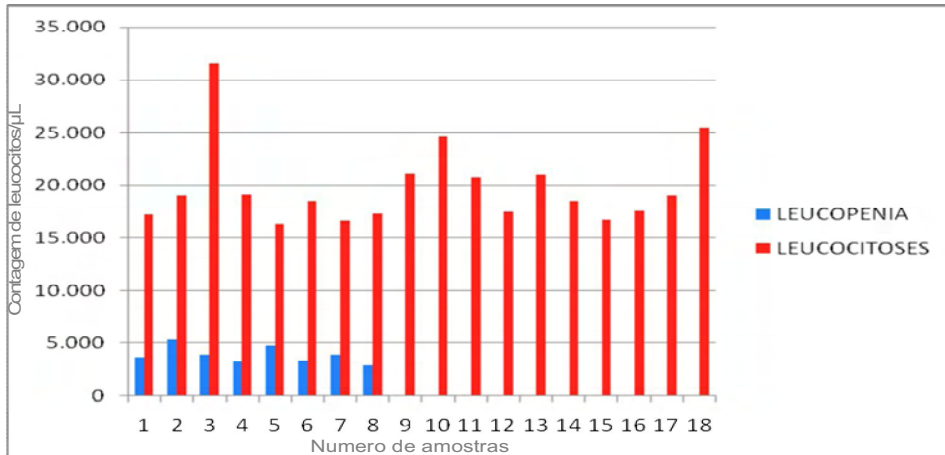


Figura 6. Amostras de sangue de cães provenientes de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga, cidades colombianas, que apresentaram alterações nas contagens de leucócitos.

Neutrofilia absoluta foi encontrada em 12 amostras (13%), neutropenia em 8 (9%), linfocitose em 7 (8%), linfopenia em 3 (3%) e eosinofilia em 5 (5%).

Das 91 amostras, 49 (52,7%) apresentaram trombocitopenia (15.000/μL a 200.000/μL, 79.608/μL). Destas, 36 (73,6%) eram provenientes da cidade de Bucaramanga, 12 (24,4%) da cidade de Villavicencio e uma (2%) da cidade de Bogotá (Figura 7).

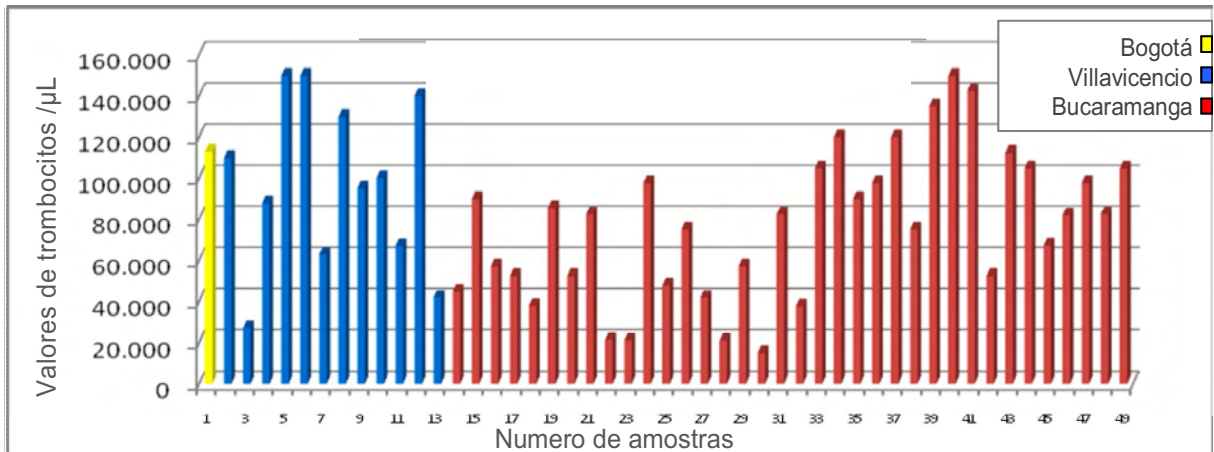


Figura 7. Valores de trombocitos encontrados em 49 amostras de sangue de cães trombocitopenicos das cidades colombianas de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga.

4.2 Pesquisa parasitológica

Foram observados piroplasmas característicos de *Babesia sp.* em eritrócitos de três amostras provenientes da cidade de Villavicencio (Grupo 4) e de duas amostras da cidade de Bucaramanga (Grupo 5). Mórulas erliquiais, foram observadas em monócitos de três cães do Grupo 5 e em uma do Grupo 6, da cidade de Bucaramanga (Quadro 2).

Quadro 2. Resultados da pesquisa parasitológica com esfregaços sanguíneos de 91 cães colombianos, provenientes das cidades de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010

Cidade	Grupo	<i>Ehrlichia sp.</i>	<i>Babesia sp.</i>
Bogotá	1	0	0
	2	0	0
Villavicencio	3	0	0
	4	0	3
Bucaramanga	5	3	2
	6	1	0
Total		4	5

Além dos hemoparasitas pesquisados foram também observados gametócitos dentro de leucócitos, compatíveis com *Hepatozoon sp.* em quatro amostras, três da cidade de Bucaramanga (Grupo 6) e uma da cidade de Villavicencio (Grupo 4); além de um animal apresentando corpúsculos intraplaquetários sugestivos de *Anaplasma sp.*, na cidade de Bucaramanga (Grupo 6).

4.3 Reações de imunofluorescência indireta (RIFI)

4.3.1 Soropositividade para *Ehrlichia canis*

Das 91 amostras de soros testados, 75 (82,4%) mostraram soropositividade frente ao antígeno de *E. canis*. Na cidade de Bogotá, de 21 amostras testadas, 14 (66,6%), mostraram-se positivas (cinco amostras do Grupo 1 e nove amostras do Grupo

2). Na cidade de Villavicencio das 31 amostras 26 (83,8%) mostraram-se soropositivas (16 amostras do Grupo 3 e 10 amostras do grupo 4). Na cidade de Bucaramanga, 35 (89,7%) das 39 amostras, mostraram-se positivos (17 amostras do Grupo 5 e 18 do Grupo 6) sendo a cidade onde foi observada a maior soropositividade ao antígeno de *E. canis*. Dezesesseis (17,6%) soros foram não reagentes (Quadro 3).

4.3.2 Soropositividade para *Babesia canis*

O número de amostras sororreagentes frente ao antígeno de *B. canis* foi menor que o obtido para *E. canis* e dos 91 soros testados, 47(51,6%) apresentaram anticorpos anti-*B. canis*. Das 21 amostras da cidade de Bogotá apenas uma (4,7%), proveniente do Grupo 2 se apresentou soropositiva. Ao contrário, na cidade de Bucaramanga e Villavicencio a soropositividade a este protozoário foi marcada. Em Bucaramanga, 28 (71,7%) das 39 amostras reagiram positivamente (oito amostras do Grupo 5 e todas as 20 amostras do Grupo 6). Das 31 amostras de Villavicencio, 18 (58%) (10 do Grupo 3 e oito do Grupo 4), mostraram-se soropositivas. Quarenta e quatro amostras (48,45%) não se apresentaram reativas (Quadro 3).

Quadro 3. Resultados obtidos nas pesquisas de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*, de 91 amostras de soro de cães, provenientes das cidades colombianas de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga, segundo instituição de origem, soropositividade e soronegatividade observadas. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010

Cidade	Grupo	RIFI <i>E. canis</i>		RIFI <i>B. canis</i>	
		Soropositivo/Total	Soronegativo/Total	Soropositivo/Total	Soronegativo/Total
Bogotá	1	9 / 13	4 / 13	0 / 13	13 / 13
	2	5 / 8	3 / 8	1 / 8	7 / 8
Villavicencio	3	16 / 21	5 / 21	10 / 21	11 / 21
	4	10 / 10	0 / 10	8 / 10	2 / 10
Bucaramanga	5	17 / 19	2 / 19	8 / 19	11 / 19
	6	18 / 20	2 / 20	20 / 20	0 / 20
Total		75 / 91	16 / 91	47 / 91	44 / 91

4.3.3 Co-soropositividade e co-soronegatividade para *B. canis* e *E. canis*

Dos 91 soros testados, 42 cães (46,1%) mostraram-se soropositivos para ambos os antígenos, sendo vinte e cinco (60%) de Bucaramanga, 16 (38%) de Villavicencio e um (2%) de Bogotá. Onze (12%) mostraram-se soronegativos para ambos os antígenos, sete (64%) de Bogotá, três de Villavicencio (27%) e um de Bucaramanga (9%).

Das 75 amostras soropositivas para *E. canis*, 33 (44%) foram soronegativas para *B. canis*, sendo treze (40%) de Bogotá, 10 (30%) de Bucaramanga e 10 (30%) de Villavicencio. Das 47 amostras soropositivas para *B. canis*, cinco (10,6%) não sororreagiram aos anticorpos anti-*E.canis*, sendo três (60%) de Bucaramanga e dois de Villavicencio (40%).

4.4 Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.4.1 Resultados da nested PCR para *E. canis*

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram um produto amplificado de 398pb pelo nested PCR (Figura 8). Das 91 amostras avaliadas foram encontrados fragmentos amplificados de DNA de *E. canis* em 37 (40,6%) delas, enquanto que em 54 (59,4%) nada foi detectado.

Nenhuma amostra proveniente da cidade de Bogotá expressou DNA erliquial. Na cidade de Villavicencio das 31 amostras, 14 (45%) foram positivas (cinco amostras do Grupo 3 e nove amostras do grupo 4). Em Bucaramanga das 39 amostras detectou-se a presença de fragmentos de DNA amplificados de *E. canis* em 23 (60%) delas (10 do Grupo 5 e 13 do Grupo 6) (Tabela 3).

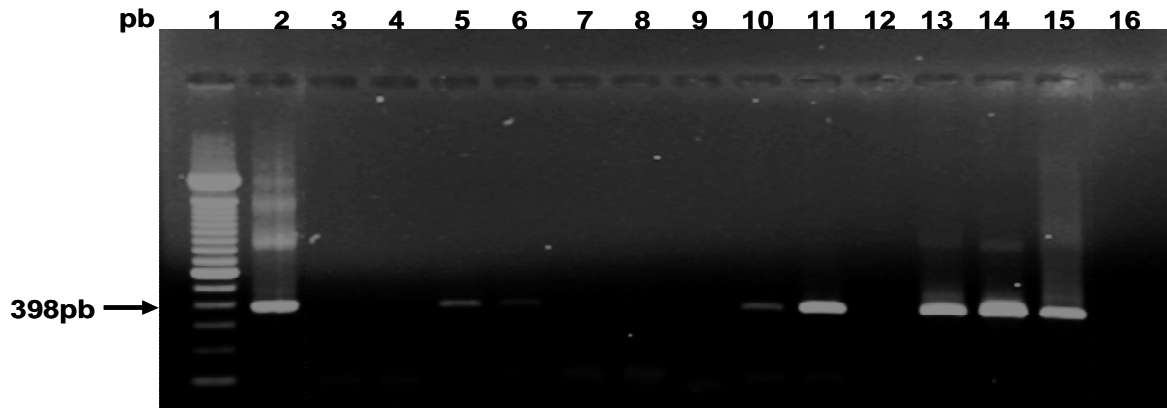


Figura 8. Gel de agarose com fragmentos de DNA de *E. canis* obtidos pela nested PCR de amostras de sangue de cães provenientes das cidades colombianas de Villavicencio e Bucaramanga, onde observam-se fragmentos de 398pb, que caracterizam os produtos amplificados. Linha 1, marcador de peso molecular (100pb); linha 2, controle positivo; linhas 3 a 15, amostras testadas; linha 16, água. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.

4.4.2 Resultados da PCR para *B. canis*

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram um produto amplificado de **408pb** pela PCR (Figura 9). Das 91 amostras avaliadas foram encontrados fragmentos amplificados de DNA de *B. canis* em 5 (5,5%), enquanto que estes não foram detectados em 86 (94,5%).

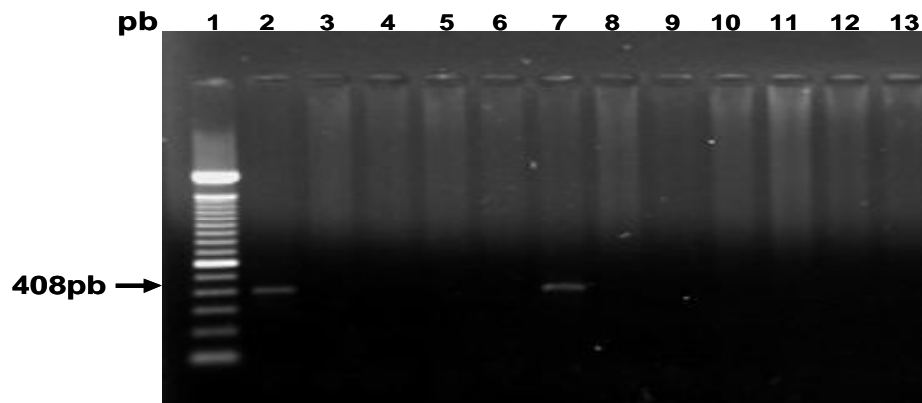


Figura 9. Gel de agarose com os traçados electroforéticos da pesquisa de DNA de *B. canis* em sangue de cães provenientes da cidade colombiana de Villavicencio. Observam-se dois fragmentos de 408 pb que caracterizam o produto amplificado. Linha 1, marcador de peso molecular (100pb); linha 2, controle positivo; linhas 3 a 12, amostras colhidas de cães da Colômbia; linha 13, água. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.

Na cidade de Bogotá nenhum animal mostrou-se positivo na PCR para *B. canis*. Na cidade de Villavicencio das 31 amostras, três (9,6%) foram positivas na PCR e eram provenientes do Grupo 4. Em Bucaramanga, das 39 amostras duas (5%) mostraram fragmentos de DNA de *B. canis* (uma proveniente do Grupo 5 e uma do Grupo 6) (Quadro 4).

Quadro 4. Resultados obtidos na pesquisa de DNA de *E. canis* (nPCR) e *B. canis* (PCR), em sangue de 91 cães provenientes das cidades colombianas de Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga, segundo os grupos. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010

Cidade	Grupo	nPCR <i>E. canis</i>		PCR <i>B. canis</i>	
		Positivos/Total	Negativos/Total	Positivos/Total	Negativos/Total
Bogotá	1	0 / 13	13 / 13	0 / 13	13 / 13
	2	0 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8
Villavicencio	3	5 / 21	16 / 21	0 / 21	21 / 21
	4	9 / 10	1 / 10	3 / 10	7 / 10
Bucaramanga	5	10 / 19	9 / 19	1 / 19	18 / 19
	6	13 / 20	7 / 20	1 / 20	19 / 20
Total		37 / 91	54 / 91	5 / 91	86 / 91

4.4.3 Inter-relação dos produtos da nested PCR e da sorologia para *E. canis*

Todas as 37 amostras positivas na nested PCR também foram sororreagentes; das 75 amostras positivas pela RIFI para *E. canis*, em 38 (50%) não se observaram DNA erliquial. Das 91 amostras, 16 (17%) mostraram-se negativos tanto na nested PCR quanto na sorologia para *E. canis* (Tabela 4).

4.4.4 Inter-relação dos produtos da PCR e da sorologia para *B. canis*

Das cinco amostras positivas na PCR para *B. canis*, quatro delas (80%) também foram soropositivas para o agente; um animal foi positivo na PCR, porém soronegativo

4.5 Análise estatístico

Os registros submetidos à análise de correspondência múltipla foram obtidos nas cidades colombianas Bogotá, Villavicencio e Bucaramanga. Foram avaliados os seguintes fatores: histórico da presença de carrapatos (HC), presença de carrapatos (PC), plaquetas normais (PN), plaquetas baixas (PB), sorologia para erliquia negativo (SEN), sorologia para erliquia positivo (SEP), sorologia para babesia negativo (SBN), sorologia para babesia positivo (SBP), PCR para erliquia negativo (PEN), PCR para erliquia positivo (PEP), PCR para babesia negativo (PBN) e PCR para babesia positivo (PBP). Na cidade de Bogotá pode-se visualizar associação entre histórico de carrapatos, plaquetas normais, sorologia e PCR negativas para ambos os antígenos, enquanto que em Bucaramanga foi verificada associação entre presença de carrapatos, plaquetas baixas, sorologia e PCR positivas, para ambos os antígenos (Figura 10).

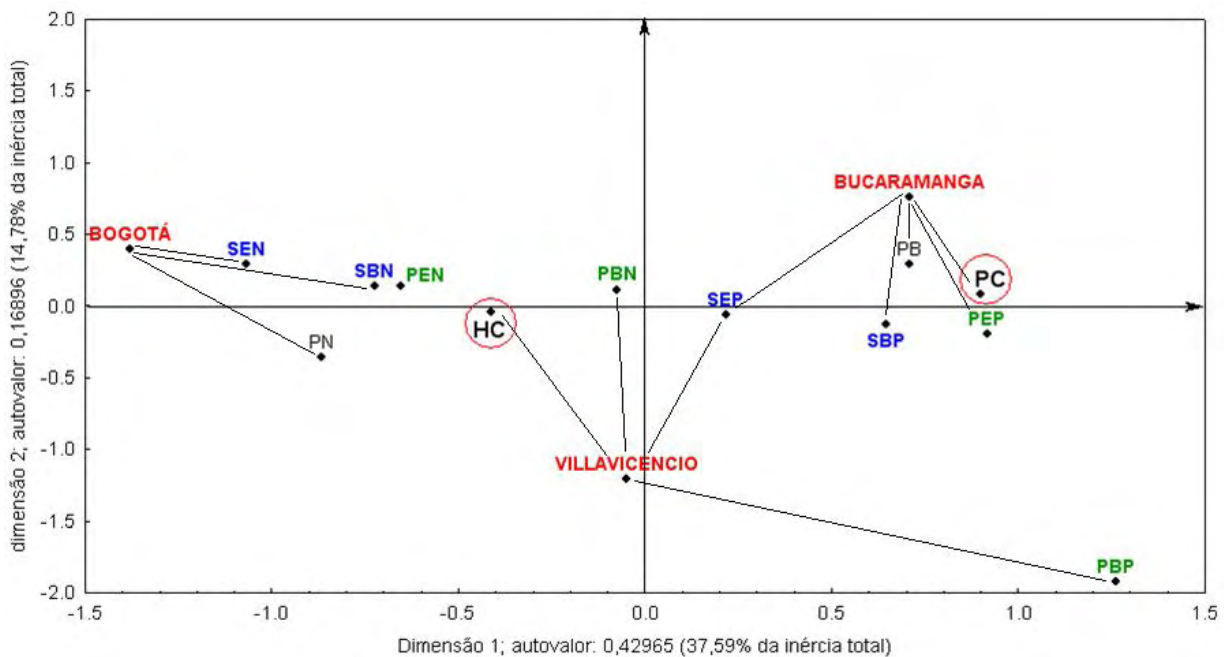


Figura 10. Mapa perceptual mostrando as associações entre cidades (Bogotá, Villavicencio (V_vicencio), Bucaramanga (Bucara)) e os fatores: HC (histórico de carrapatos), PC (presença de carrapatos), PN (plaquetas normais), PB (plaquetas baixas), SEN (sorologia erliquia negativo), SEP (sorologia erliquia positivo), SBN (sorologia babesia negativo), SBP (sorologia babesia positivo), PEN (PCR erliquia negativo), PEP (PCR erliquia positivo), PBN (PCR babesia negativo), PBP (PCR babesia positivo). As setas indicam as principais variáveis que se associaram com as respectivas cidades. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010

Observando a Figura 10, nota-se que a cidade de Villavicencio se situa na dimensão 1, ou seja, quase no centro da figura. Como tal, sua associação com as variáveis estudadas poderia não refletir, a real associação entre elas e por isso, foi necessário submeter os dados a uma análise individual e construção de um mapa perceptual próprio.

O mapa percentual da Figura 11, somente com os registros de Villavicencio, mostra associações entre histórico de carrapatos, plaquetas normais, hematócrito normal e a sorologia negativa para *B. canis* e PCR negativa para *E. canis*; assim como associação entre presença de carrapatos, hematócrito e plaquetas baixas, sorologia positiva para ambos os antígenos e PCR positiva para *E. canis*,

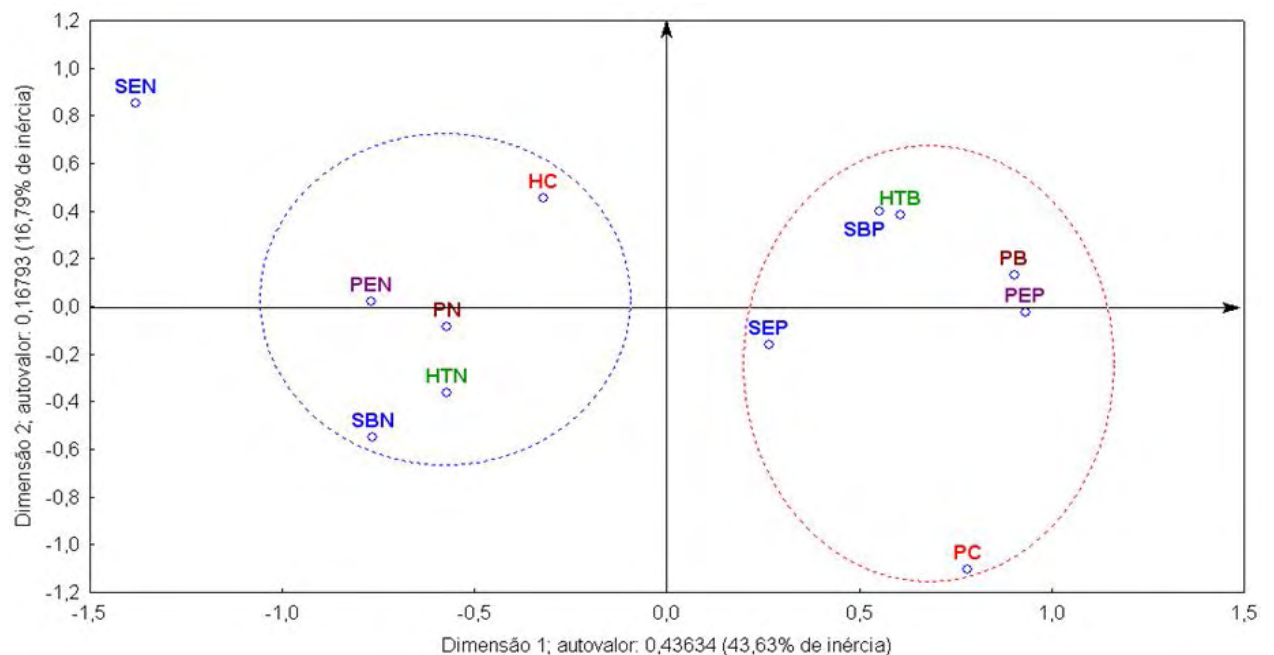


Figura 11. Mapa perceptual mostrando a situação na cidade de Villavicencio e as variáveis: HC (histórico de carrapatos), PC (presença de carrapatos), HTN (hematócrito normal), HTB (hematócrito baixo), PN (plaquetas normais), PB (plaquetas baixas), SEN (sorologia erliquia negativa), SEP (sorologia erliquia positiva), SBN (sorologia babesia negativa), SBP (sorologia babesia positiva), PEN (PCR erliquia negativa), PEP (PCR erliquia positiva). As principais associações estão destacadas nos círculos (azul e vermelho). No círculo azul visualiza-se correspondência entre HC, HCT, PN, SBN e PEN; no círculo vermelho a correspondência é dada entre PC, HTB, PB, SEP, SBP e PEP. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010

O valor de qui-quadrado confirmou as associações visualizadas no mapa perceptual da Figura 10. No anexo B, pode-se observar, em negrito, as correspondências encontradas. Exemplos das mais relevantes são:

- Bogotá associou-se marcadamente com as plaquetas normais (PN) (valor de $\chi^2 = 10,48$) e também com a sorologia para babesia negativa (SBN) (valor de $\chi^2 = 9,10$);
- Bucaramanga associou-se com as plaquetas baixas (PB) (valor de $\chi^2 = 9,83$);
- As variáveis presença de carrapatos (PC) e PCR erliquia positivo (PEP) mostraram forte correspondência entre si (valor $\chi^2 = 6,00$).

Os valores de qui-quadrado, do mapa perceptual da cidade de Villavicencio (Figura 11), evidenciam varias correspondências, a maioria delas fracas (anexo C, valores em negrito). Destacam-se as associações entre:

- PCR erliquia positivo (PEP) com a presença de carrapatos (PC) (valor de $\chi^2 = 2,12$);
- PEP, com as plaquetas baixas (PB) (valor de $\chi^2 = 2,37$).

4.6 Análises das similaridades dos produtos seqüenciados obtidas pelo BLAST

4.6.1 Análises das similaridades observadas para *E.canis*

Os ampliceros dos produtos dos oligonucleotídeos iniciadores (HE3/ECAN) do gene *16S rRNA*, seqüenciados das amostras positivas da nested PCR revelaram 98-99% de similaridades e altos graus de identidade com seqüências previamente publicadas no GenBank. As amostras positivas de *E. canis* seqüenciadas apresentaram grande similaridade (99%) com aquelas encontradas em cães da Tunísia (número de acesso EU781695.1), da Tailândia (número de acesso AB287435.1), México (EF424612.1) e Turquia (AY621071.1), entre outros.

4.6.2 Análises das similaridades observadas para *B. canis*

Os amplicmeros dos produtos dos oligonucleotídeos iniciadores (PIRO A/PIRO B) do gene *18S rRNA*, seqüenciados das amostras positivas da PCR para *B. canis* revelaram 98-99% de similaridades e altos graus de identidade com seqüências previamente publicadas no GenBank. As amostras positivas de *B. canis* seqüenciadas apresentaram grande similaridade (99%) com *Babesia canis vogeli* encontrada em cães do Brasil (número de acesso EF636702.1), da Venezuela (número de acesso DQ297390.1), Japão (AY077719.1) e Japão (AB083374.1).

4.7 Dendogramas das Arvores filogenéticas

4.7.1 Arvore filogenética de *E. canis* da Colômbia

As seqüências de quatro amostras de *E. canis* da Colômbia amplificadas e purificadas, sendo duas provenientes da cidade de Villavicencio (ambas do Grupo 4) e duas da cidade de Bucaramanga (Grupo 5 e Grupo 6), foram comparadas com as seqüências dos principais gêneros da nova reorganização da família *Anaplasmataceae* (DUMLER et al., 2001). O alinhamento dessas seqüências pelo programa CLUSTAL-X originou no programa MEGA a formação da seguinte árvore filogenética (Figura 12).

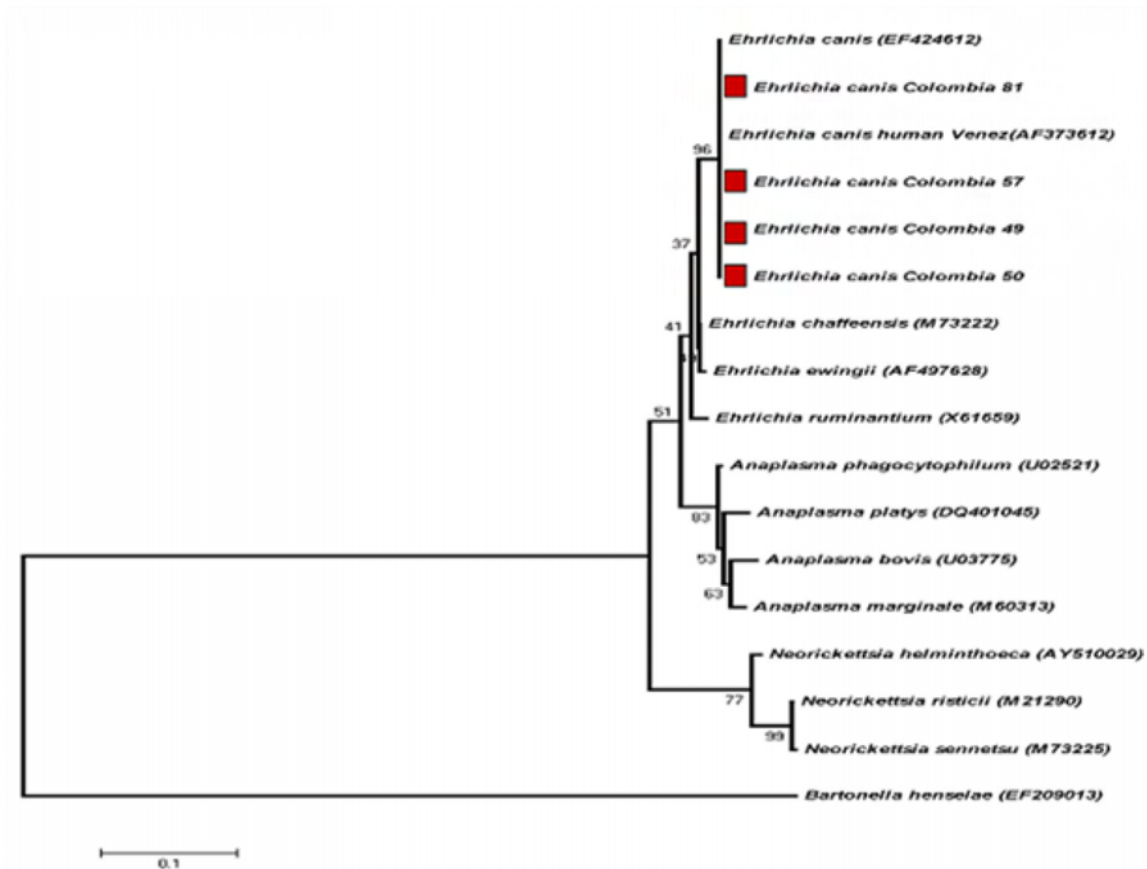


Figura 12. Dendrograma filogenético exibindo as amostras positivas para o gênero *Ehrlichia canis* comparando-se com os outros membros da família *Anaplasmataceae* obtidas com sequência parciais do gene 16S rRNA (5'-3') de amostras de sangue de cães da Colômbia naturalmente infectados provenientes das cidades de Villavicencio (49, 50) e Bucaramanga (57, 81). O método de construção foi calculado pelo algoritmo "neighbor-joining" e Kimura-2 parâmetros de 1000 repetições. As sequência utilizadas nas comparações estão indicadas pelo numero de acesso do GenBank. Unesp. Campus de Jaboticabal, 2010.

4.7.2 Arvore filogenética de *B. canis* da Colômbia

As sequências de quatro amostras de *B. canis* da Colômbia, duas da cidade de Villavicencio (ambas do Grupo 4) e duas da cidade de Bucaramanga (Grupo 5 e Grupo 6), foram comparadas com as sequências das principais espécies de piroplasmas encontradas em cães (IRWIN, 2009). O alinhamento dessas sequências pelo programa CLUSTAL-X originou no programa MEGA a formação da seguinte árvore filogenética (Figura 13).

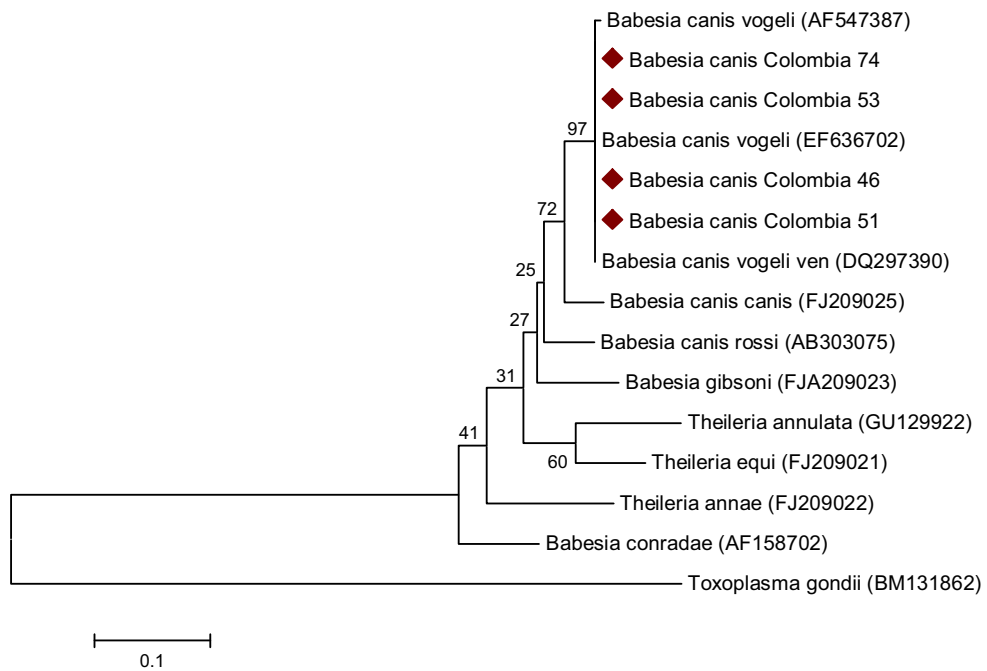


Figura 13. Dendrograma filogenético exibindo as amostras positivas para o gênero *Babesia canis* obtidas com sequência parciais do gene 18S rRNA (5'-3') de amostras de sangue de cães colombianos naturalmente infectados provenientes das cidades de Villavicencio (53, 74) e Bucaramanga (57, 81). O método de construção foi calculado pelo algoritmo "neighbor-joining" e Kimura-2 parâmetros de 1000 repetições. As sequência utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank. Unesp. Campus de Jaboticabal, 2010.

5. DISCUSSÃO

Ehrlichia canis e *Babesia canis*, entre outros hemoparasitas, são transmitidos pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (NELSON, 2001; CORDERO, 2004; GREEN, 2006), uma das principais espécies de carrapatos que afetam os caninos (TRAPP et al., 2006; PATERNINA et al., 2009). O antecedente de contato com carrapatos foi um dos critérios de inclusão de amostras neste trabalho, independente de qual era o ixodídeo, pois a classificação deste ectoparasita não estava entre os objetivos. Quase um terço dos animais apresentavam o vetor localizado especialmente nos espaços interdigitais, coxins plantares e orelhas, condizente com os achados de CORDERO (2004). Os outros dois terços dos animais tinham histórico de contato com carrapatos, de acordo com informações concedidas pelos proprietários e responsáveis dos respectivos canis.

Tanto a erliquiose como a babesiose caninas causam alterações hematológicas (GREEN, 2006). A erliquiose é acompanhada de anemia e leucopenia moderadas, juntamente com trombocitopenia; esta última é considerada a alteração hematológica mais comum (HARRUS et al, 1999). No caso da babesiose, a anemia tende a ser severa, a contagem de leucócitos é extremadamente variável e a trombocitopenia também é comumente observada (REMO et al.,1998; BOOZER & MANCINTIRE, 2003). A diminuição dos valores de hematócrito em cães associado aos sinais clínicos, principalmente descoloração das mucosas visíveis podem sugerir a presença de anemia (JAIN, 1993). Com base neste pressuposto, os valores do hematócrito foram considerados para avaliação da presença de anemia nos cães desde estudo. Quase a metade dos animais das cidades de Villavicencio e

Bucaramanga apresentava diminuição nesta variável, acompanhada, praticamente em sua maioria, por sorologia positiva aos dois agentes e PCR positiva a *Ehrlichia canis*. Estes dados podem sugerir uma relação causa-efeito (presença dos agentes-diminuição do hematócrito). A redução de hemácias na erliquiose ocorre pela diátese hemorrágica, devido à diminuição numérica das plaquetas, assim como por depressão da medula óssea por mecanismos imunológicos (HARRUS et al, 1999). No caso da babesiose, a anemia é devida a destruição das hemácias pelo dano físico causado pelo parasita (BOOZER & MACINTIRE, 2003).

Nas duas doenças a contagem de leucócitos é muito variável, o que foi constatado neste trabalho. De forma particular, nesta pesquisa, os animais com detecção direta positiva dos hemoparasitas via esfregaço sanguíneo e PCR, apresentavam a contagem de leucócitos dentro da faixa de normalidade. Leucopenia estava presente em 9% dos animais e 75% deles eram suspeitos de hemoparasitoses, particularmente aqueles cães do grupo 5. Esta alteração é comumente reportada na fase crônica da erliquiose e pode ser o resultado de hipoplasia da medula óssea, quanto há diminuição das linhagens mielóide, eritróide e megacariocítica (HUXSOLL et al., 1970; NEER et al., 2002).

A trombocitopenia é a anormalidade hematológica mais prevalente na erliquiose canina e está presente em aproximadamente 84% de todos os casos (HARRUS, 1999), e sua severidade varia de acordo com a fase da doença (aguda, subclínica, crônica) (BULLA et al., 2004). Tradicionalmente, o diagnóstico da erliquiose é feito pela combinação de sinais clínicos, anormalidades hematológicas e, em algumas ocasiões, pelos achados sorológicos. Na prática clínica, a trombocitopenia é utilizada como teste de triagem (NELSON, 2001). Os resultados deste estudo mostraram trombocitopenia em 50% dos animais. Destes, 92% foram sorologicamente positivos a *E. canis*. Portanto, ao se comparar o resultado da sorologia com a trombocitopenia, esta última poderia ser utilizada como ferramenta adicional diagnóstica para esta doença. Por outro lado, numerosas doenças podem resultar em trombocitopenia. Estas incluem trombocitopenia imunomediada, enfermidades inflamatórias, outros processos infecciosos (BULLA et al., 2004), além

dos processos neoplásicos; nenhuma delas pode ser descartada frente a um caso de trombocitopenia. Possivelmente, um desses processos poderia estar acometendo um cão do grupo 5, que apresentou marcada trombocitopenia (82.000/ μ L), mas foi negativo a todos os testes diagnósticos empregados neste trabalho para detecção da *E. canis* e *B. canis*. Todavia, outras avaliações laboratoriais deveriam ser conduzidas para se chegar ao diagnóstico definitivo neste cão.

Outro aspecto que o clínico deve interpretar é a magnitude da trombocitopenia, pois pode variar de acordo com a fase da doença; na fase subclínica a diminuição pode ser moderada ou não existir, enquanto na fase aguda e crônica esta diminuição é marcante (HARRUS et al., 1999; WANER et al., 2001). Todos os animais do grupo 5 e a grande maioria dos grupos 4 e 6, apresentaram marcadas trombocitopenias, o que faz supor que estes animais apresentavam estados agudos ou crônicos da doença, enquanto o restante dos animais poderiam estar apresentando a forma subclínica.

Outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa mostraram persistência da trombocitopenia em cães experimentalmente infectados com a amostra *E. canis* Jaboticabal, mesmo após o tratamento com cloridrato de doxiciclina por 21 dias, redução dos títulos de anticorpos específicos e negatificação da nPCR (FARIA, 2010). A presença de anticorpos antiplaquetários (HARRUS et al., 1999; WANER et al., 2000), aumento do consumo de plaquetas devido a alterações no endotélio vascular, seqüestro esplênico e a imunossupressão da medula óssea (WANER et al., 2000), que ocorrem na erliquiose, poderiam contribuir para a manutenção da trombocitopenia mesmo após o tratamento. Por esses fatores, é importante ter cautela com o uso da contagem de plaquetas para avaliar a resposta ao tratamento, concordando com o referido por NEER et al. (2002).

A pesquisa destes hemoparasitas em esfregaços de sangue periférico é uma técnica diagnóstica que oferece baixa sensibilidade (WANER et al., 2000; BOOZER et al., 2003). Ocasionalmente, são observadas mórulas intracitoplasmáticas em monócitos em 2 a 5% dos cães com erliquiose na fase aguda (WANER et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2000), o que também ocorreu no presente estudo. A detecção da

Ehrlichia sp. mediante esta técnica foi de 4,4%, sendo importante mencionar que a maioria das mórulas observadas pertenciam aos cães do grupo 5, ou animais suspeitos da doença. Também o diagnóstico da babesiose mediante o esfregaço sanguíneo pode não ser fácil, devido à baixa e intermitente parasitemia que caracteriza esta doença em animais com evidência de infecção (BOOZER et al., 2003). Na população estudada, a detecção de babesiose por esta técnica foi baixa (5,4%). Provavelmente devido ao critério de inclusão utilizado em nosso trabalho, que incluía somente o contato com carrapatos, com exceção do grupo 5, que se tratavam de animais suspeitos de infecção por hemoparasitas. Este dado foi ratificado pela observação do parasita em dois animais deste último grupo.

Entretanto, cerca de 80% dos cães sororeagiram à pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* e 50% anti-*B. canis*, indicando alta prevalência dessas hemoparasitoses na população de cães estudados.

A técnica de imunofluorescência tem sido considerada, nos últimos 30 anos, como uma das provas mais sensíveis para o diagnóstico de ambas as doenças. As pesquisas relacionadas com epidemiologia, patofisiológica e biologia molecular, comprovam inconsistências nos resultados e interpretação dos testes sorológicos, mostrando vantagens e desvantagens da técnica utilizada (WEN et al., 1997). WANER et al. (2001) ressaltam vários aspectos que devem ser considerados na interpretação dos testes sorológicos no diagnóstico da erliquiose. As reações cruzadas são os aspectos mais controversos, sendo estes fenômenos devido à forte similaridade morfológica existente entre as espécies da mesma família. No caso da *Ehrlichia sp.*, já foi demonstrada reatividade cruzada com *N. risticii*, *A. platys*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, entre outras (NEER et al., 2002), como também as co-infecções com múltiplos agentes erliquiais (WANER et al., 2001), que somados, estes dois aspectos, podem levar a falsos positivos ou falsos negativos. No caso da babesia a especificidade deste teste é considerada baixa devida também a reações cruzadas entre a *Babesia sp.* com outros parasitas membros da ordem apicomplexa (IRWIN, 2009). OLIVEIRA et al. (2008) não acreditam que haja reações cruzadas entre *E. canis*, *B. canis* e *Leishmania sp.* depois que vários soros foram testados pela

RIFI e ELISA. Os mesmos pesquisadores concluíram que não se tratam de reações cruzadas entre esses agentes e sim a presença de co-infecção, principalmente em cães de regiões endêmicas.

Observando os resultados de sorologia deste estudo, não se pode deixar de questionar a possibilidade da ocorrência de falsos positivos e falsos negativos. A presença do carrapato vetor, além de outras espécies de carrapatos, têm sido descritos na Colômbia (PATERNINA et al., 2009). Além desse aspecto, durante a pesquisa parasitológica nos esfregaços sanguíneos, encontramos uma mórula em plaqueta (grupo 6) e três animais (grupo 6) parasitados pelo *Hepatozoon sp.*, o que evidencia a existência de outros hemoparasitas. Todavia, a real interferência desses hemoparasitas com os que foram pesquisados neste estudo precisa ser investigada.

A maioria dos cães dos grupos 1, 2 e 3 pareciam estar saudáveis no momento da coleta de sangue, todavia mais de 60% deles apresentavam anticorpos anti-*E. canis* e apenas 23% (5/21) no grupo 3 eram nPCR positivos. Esses resultados sugerem que esses animais poderiam se encontrar na fase subclínica da erliquiose, fase na qual os títulos de anticorpos se mantém elevados e por longos períodos, possivelmente devido à estimulação antigênica crônica, como referido por WANER et al., (2001).

A marcada soropositividade a *E. canis* nas cidades de Bucaramanga e Villavicencio, pode indicar que são regiões endêmicas da doença, devido a constante exposição ao vetor e possivelmente ao agente infeccioso. TRAPP et al. (2006) mencionaram detecção de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis* nos cães de diferentes regiões tropicais do Brasil. A Colômbia também localiza-se em região tropical e as duas cidades mencionadas apresentam características similares em relação ao clima, permitindo o desenvolvimento e persistência do vetor.

Na Colômbia são escassos os estudos feitos para detectar a *Babesia canis*. Os poucos trabalhos encontrados utilizaram como teste diagnóstico os esfregaços sanguíneos, encontrando baixa parasitemia (BATISTA, 1980). Na literatura compilada, não foi localizado, até o momento, nenhum estudo detectando anticorpos anti-*B. canis* na Colômbia, o que sugere que estes resultados sejam os primeiros,

utilizando uma técnica sorológica. Existe grande dificuldade em se detectar o parasita nas diferentes fases da doença, o que conduz à pesquisa de anticorpos pelo imunodiagnóstico (FURUTA et al., 2009), como percebido em nosso estudo, já que a detecção direta da *Babesia sp.* foi muito baixa. A sorologia mostrou ser mais sensível. Um bom exemplo foi o grupo 6, nele apenas um cão foi PCR positivo e todos os animais foram sororreagentes a este antígeno. E, como os mesmos não apresentavam os sintomas clássicos da doença pode-se pensar que estavam apresentando a forma crônica da babesiose.

A contribuição mais importante deste trabalho, em relação ao tema das hemoparasitoses na Colômbia, foi a pesquisa molecular desenvolvida, cujos resultados permitiram não só identificar a *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, como também comparar a similaridade genética destes organismos com outros membros filogeneticamente relacionados. A nPCR é uma técnica sensível, capaz de identificar um monócito infectado em 10^{36} células (WEN et al., 1997). Neste estudo, o DNA de *Ehrlichia canis* foi detectado em 40% dos animais. Também confirmou maior sensibilidade e especificidade da nPCR, quando comparada à sorologia, dado que esta última técnica diagnóstica não pode distinguir a infecção ativa da exposição ao agente. Além disso, as reações cruzadas observadas nos testes sorológicos são pouco comuns na nPCR (IQBAL et al., 1994; NAKAGHI et al., 2008).

No grupo 5, um pouco mais da metade dos cães expressou DNA erliquial, e este achado pode confirmar a suspeita clínica de erliquiose nestes animais, tendo em vista que eram cães com suspeita clínica da doença. Por outro lado, a detecção de DNA de *E. canis* em cães aparentemente saudáveis sugere que os mesmos estariam na fase subclínica da infecção, e devido a isso serem portadores de bactérias, e desta forma amplificadores da doença.

Poucos foram os animais PCR positivos para *B.canis* (5,49%), contrastando com os resultados da sorologia em que 51,64% (47/91) apresentaram anticorpos anti-*B. canis*. A PCR, embora seja uma técnica bastante sensível e específica, nos casos de babesiose ela é considerada de baixa sensibilidade em cães infectados naturalmente, assintomáticos ou na fase crônica da doença (BOOZER et al., 2003).

Sugere-se que isto decorra da parasitemia que pode ser baixa ou flutuante. Devido a estes inconvenientes deve-se repetir o teste em outras ocasiões, como também o clínico deve se apoiar em provas sorológicas nestas situações (IRWIN, 2009). Neste trabalho, podemos estar frente a esta situação e aqueles animais sorologicamente positivos a *Babesia canis*, poderiam estar cursando a fase crônica ou subclínica da doença, e aqueles PCR positivos estarem apresentando um pico de parasitemia capaz de ser detectado pela técnica.

Em três, dos cinco cães positivos na PCR, foram detectados piroplasmas de babesia no esfregaço sanguíneo, o que nos permite sugerir que eles poderiam estar cursando pela fase aguda da doença.

O presente estudo é a primeira descrição das espécies de *Ehrlichia sp.* e *Babesia sp.* confirmadas e caracterizadas por métodos moleculares em cães naturalmente infectados nas cidades colombianas de Villavicencio e Bucaramanga. Nos estudos de caracterização foi observada elevada homologia genética entre a *E. canis* e *B. canis* colombianas, com as já seqüenciadas e depositadas no GenBank. As homologias foram confirmadas ao se construir os dendogramas das árvores filogenéticas de cada patógeno utilizando os produtos seqüenciados e purificados. As árvores demonstraram que as seqüências submetidas a análise dos genes 16S RNA e 18S RNA (*E. canis* e *B. canis*, respectivamente) são intimamente relacionadas com a *Ehrlichia canis* e *Babesia canis vogeli* identificadas mundialmente, oferecendo a primeira evidência molecular da existência destes agentes na Colômbia. A similaridade genética com a *E. canis* e *B. canis* originárias de regiões tropicais e subtropicais (Turquia, Tailândia, México, Brasil, Venezuela e Japão), permitem sugerir que devido a condições climáticas similares entre estes países e a Colômbia, foi possível o desenvolvimento, estabelecimento e permanência dos mesmos vetores e patógenos. Outro aspecto epidemiológico importante a ser considerado são as constantes migrações de pessoas e cães destes países à Colômbia ao longo dos últimos séculos, com a conseqüente distribuição mundial tanto de vetores como de patógenos, como já referido por EIRAS e colaboradores, em 2008.

Como já mencionado ao longo do trabalho, nos últimos anos a incidência de doenças transmitidas por carrapatos tem aumentado, assim como a expansão do vetor em áreas urbanas. Existe uma complexa interação entre os hospedeiros / ectoparasitas / agentes patógenos. Um exemplo evidente é a baixa resposta do hospedeiro frente à picadura do carrapato. Componentes da saliva do carrapato produzem marcada supressão imune no hospedeiro, principalmente da resposta celular, permitindo não só o estabelecimento da infestação dos ectoparasitas, como também a disseminação e desenvolvimento de patógenos transmitidos pela picadura do carrapato (SINGH & GIRSCHICK, 2003). A elevada detecção de anticorpos encontrada neste trabalho, assim como a detecção direta dos agentes pesquisados, colocam em evidencia que os mecanismos de defesa de grande parte dos animais dos grupos 4, 5 e 6, falharam frente às estratégias de invasão, permitindo o estabelecimento e adaptação dos agentes. Além disso, atualmente tem sido amplamente aceito que a imunidade ou a susceptibilidade a doenças infectoparasitárias estão diretamente relacionadas com o estado nutricional do hospedeiro. A desnutrição protéico-calórica afeta negativamente o sistema imune do hospedeiro, embora os mecanismos envolvidos na relação nutrição e infecção, ainda sejam pouco conhecidos (MALAFAIA, 2008). Este aspecto ficou bem claro em nosso trabalho, pois os cães das instituições que não tinham um programa nutricional bem estabelecido e nem controle de ectoparasitas foram aqueles que mostraram maior frequência de positividade nos testes empregados. Todavia, o impacto deste fator, na relação hospedeiro-parasita, precisa ser mais bem compreendido e avaliado.

O fenômeno da coinfeção é pouco estudado por pesquisadores. Grande parte dos trabalhos relacionados com hemoparasitas avalia experimentalmente a infecção frente a um agente. Aqueles relacionados à presença de múltiplos microrganismos infecciosos acometendo o cão, são na forma de relatos de casos clínicos (HARIKRISHNAN, et al., 2005; GAL, et al., 2007; SASANELLI et al., 2009), mostrando a gravidade das alterações, as dificuldades no diagnóstico, pobre resposta ao tratamento e prognóstico ruim. Neste trabalho ficou evidente a coinfeção entre *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, (grupos 4, 5 e 6). No grupo 6, além dos

hemoparasitas mencionados, foram observados nos esfregaços sanguíneos de três cães o *Hepatozoon sp.* e o *Anaplasma sp.* em um cão. Estes resultados ratificam a presença de coinfeção e estimulam novas pesquisas clínicas para se compreender a patogênese e a resposta do indivíduo nestas situações, e que tenham impacto no tratamento e prevenção das mesmas.

O papel da temperatura, altitude, nutrição, controle de ectoparasitas e recursos econômicos, precisam ser melhor estudados, pois a ferramenta estatística utilizada neste trabalho permitiu visualizar as associações entre as principais variáveis estudadas, com as respectivas cidades, sugerindo matematicamente uma associação entre epidemiologia e infecção. Por exemplo, na cidade de Bogotá (grupos 1, e 2), com temperatura de 14°C, altitude de 2600m, os cães tinham controle rigoroso de ectoparasitas, nutrição balanceada e as instituições eram financiadas pelo governo. Apesar do histórico de contacto com carrapatos, as avaliações hematimétricas dos cães se encontravam dentro dos padrões da normalidade e a maioria dos resultados dos testes diagnósticos foi negativa. Ao contrário, os cães da cidade de Bucaramanga, com temperatura de 23°C e altitude de 950m, apresentavam as maiores alterações hematológicas e foram diagnosticados com frequência, os hemoparasitas pesquisados, nos diferentes testes diagnósticos. Esses resultados, além de confirmarem a suspeita clínica de hemoparasitoses nos cães do grupo 5, sugerem o impacto que tem na saúde a escassez de recursos e nutrição desbalanceada, observada principalmente no grupo 6. A cidade de Villavicencio, estatisticamente se comportou como um local peculiar, pois apesar de ter características climáticas propícias para o desenvolvimento do vetor (temperatura de 24°C e altitude de 450m), o número de cães com ausência ou presença de carrapatos estavam em proporções semelhantes. Nesta localidade, os animais do grupo 3 recebiam um tratamento melhor que os do grupo 4. Embora em ambos as condições socioeconômicas fossem precárias, os animais do grupo 3 recebiam dieta de melhor qualidade e controle de ectoparasitos mais rigoroso. Novamente, esses resultados permitem especular sobre o reflexo da dieta e do controle de ectoparasitos no desenvolvimento de morbididades.

6. CONCLUSÕES

As análises dos resultados obtidos neste estudo permitiram as seguintes conclusões:

- A detecção direta em microscopia de luz de inclusões citoplasmáticas de *Ehrlichia canis*, assim como de piroplasmas de *Babesia canis* não se mostrou sensível em detectar os agentes em animais com ausência de sinais clínicos das respectivas doenças.
- Há prevalência de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis* na população canina estudada nesta pesquisa.
- As reações em cadeia da polimerase (nPCR e PCR), associadas ao seqüenciamento, permitiu confirmar a presença de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, em cães das cidades colombianas de Bucaramanga e Villavicencio.
- O agrupamento filogenético, pelo estudo do fragmento das seqüências dos genes 16S rRNA e 18S rRNA, permitiu a caracterização parcial das espécies *E. canis* e *B. canis*.
- A *E. canis* encontrada nas amostras deste estudo são similares geneticamente à *Ehrlichia canis* depositada no GenBank.
- A *B. canis* encontrada nas amostras deste estudo são do subtipo *vogeli*.
- Há uma forte correspondência entre a presença de carrapatos e a detecção molecular de *Ehrlichia canis*.

7. REFERÊNCIAS

ANDRÉ, R.; ADANIA, C.; MACHADO, R.; ALLEGRETTI, S.; FELIPPE, P.; SILVA, F.; NAKAGHI, A. Molecular and serological detection of Ehrlichia spp. in endangered Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**. 2010. no prelo

BATISTA, J. **Prevalência de parasitos hemáticos em caninos del departamento de Córdoba**. 1980. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Colombiano Agropecuario, Programa Universidad Nacional de Colômbia, Bogotá, 1980.

BENAVIDES, J. A.; RAMIREZ, G. F.; Ehrlichiosis canina. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, Caldas, v. 16, n. 3, p. 268-273, 2003.

BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I.; GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.

BOOZER, L.; MACINTIRE, K. Canine babesiosis. **Veterinary of North Clinics America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 885–904, 2003.

BRACCINI, G.L.; CAHAPLIN, E.L.; STOBBE, N.S.; ARAUJO, F.A.P.; SANTOS, N.R. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil 1986-1990. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 20, p. 134 – 149, 1992.

BULLA, C; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO JR.; TRINCA, L.; LOPES,R; WIEDMEYER, C. The relationship between degree of thrombocytopenia and infeccion with Ehrlichia canis in an endemic area. **Veterinary Research**, Paris, n. 35, p. 141-146, 2004

BUELVAS, F.; ALVIS, N.; BUELVAS, I.; MIRANDA, J.; MATTAR, S. Alta prevalencia de anticuerpos contra *Bartonella* y *Babesia microti* en poblaciones rurales y urbanas en dos provincias de Córdoba, Colombia. **Revista de Salud Pública**, Córdoba, v. 10, n.1, p. 168-177, 2008.

CARDONA E, RUBIO JD. Prevalencia de garrapatas (Acari: Ixodidae) en perros, *Canis familiaris* de nueve municipios del oriente antioqueño. In: CONGRESO DE ENTOMOLOGÍA SOCOLEN, 33., 2006, **Resúmenes...** p. 103.

CARRET, C.; WALAS, F.; CAREY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, TP.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 46, pp. 298-303, 1999.

CLEVELAND, C.; PETERSON, D.; LATIMER, K. An overview of canine babesiosis. 2004. Disponível em: <<http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/Cleveland>>. Acesso em: 08 fev. 2010.

CONTRERAS S. D.; SANABRIA, E.A.; **Determinación de pacientes positivos a *Ehrlichia canis* mediante prueba de inmunofluorescencia, comparada con diagnóstico clínico, lectura de extendido sanguíneo y cuadro hemático con recuento de plaquetas.** 2006. 57 f. Monografía (Trabalho de graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Facultad de Medicina Veterinária y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colômbia, Bucaramanga, 2006.

CORDERO del C.; ROJO. Babesiosis, Hepatozoonosis, Citauxzoonosis felina. In: ____ **Parasitología Veterinaria.** Madrid: McGraw Hill-Interamericana, 2004. p. 672–678.

DAGNONE , A. S.; SOUZA, A. I. DE; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmatidae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis 2009. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 20-5, 2009.

DUEHNEN, W.; OTTE, E. **Infestación con garrapatas y su control en Córdoba.** Bogotá: Convenio Colombo – Alemán ICA-GTZ, 1990. 67p. (Informe Técnico, 7)

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

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

EWING, S.A.; DAWSON, J.E.; PANCIERA, R.J.; MATHEW, J.S.; PRATT, K.W.; KATAVOLOS, P.; TELFORD III.S.R. Dogs Infected with a Human Granulocytotropic Ehrlichia spp (Rickettsiales: Ehrlichiae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 34, n. 6, p. 710-718, 1997.

EIRAS, F.; BASABE, J.; MESPLET, M.; SCHNITTGER, L.; First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of BuenosAires, Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 157, p.294–298, 2008.

FARIA, J. L. M. **Estudo comparativo de detecção de DNA de *Ehrlichia canis* em sangue total de e em aspirado de baço pelo “nested” PCR em cães naturalmente infectados**. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

FARIA, J.; MUNHOZ, T.; VARGAS, G; FRANCHI, C.; TINUCCI-COSTA, M. Erradicação da infecção experimental por *Ehrlichia canis* amostra Jaboticabal pelo tratamento com doxiciclina em cães. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 29, n. 172, p. 48-53, 2009.

FOX, G.E.; WISOTZNEY, J.D.; JURTSCHUK JR.,P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 42, n. 1, p.166-170, 1992.

FRICHE, L.; GEIGER, S.; BARBOSA, M.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**, v. 127, p. 81-85, 2005.

FURUTA, I.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, M.; ROCHA, A.; MACHADO, R.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**; Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 41-45, 2009

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. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 48, n. 6, p. 619–622, 2007.

GREENE, C. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis and Wolbachia Infection. In:____. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd ed. St. Louis: Saunders, 2006. p. 203 -231.

GOMEZ, F. A.; **Comparación de las técnicas IFA y frotis sanguíneo para el diagnóstico de ehrlichiosis canina**. 2002. 129 f. Monografía (Trabalho de graduação em Medicina Veterinaria e Zootecnia) – Facultad de Medicina Veterinária y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colômbia, Bucaramanga, 2002.

HARIKRISHNAN, T.; PAZHANIVEL, N.; CHELLAPPA, J. Concomitant *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* infection in a dog. **Veterinarski Arhiv**, Chennai, v. 75, n. 6, p. 513-520, 2005

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I; FOLEY, J.E.; POLAND, A.M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.1, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.9, p. 2745-2749, 1999.

HIDALGO, M.; VESGA, F.; LIZARAZO, D.; VALBUENA, G.; Short Report: A Survey of Antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* Domestic Animals from a Rural Area of Colombia. Resultados da pesquisa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, McLean, v. 80, n. 6, p. 1029–1030, 2009.

HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. **Aplicação da PCR em laboratório clínico e medicina forense**: apostila de práticas. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1997.

HOMER, M.; AGUILAR, I.; TELFORD, S.; KRAUSE, P.; PERSING, D. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.13, n.3, p.451-469, 2000.

HUNFELD, K.P.; BRADE, V. Zoonotic *Babesia*: Possibly emerging pathogens to be considered for tick-infested humans in central Europe. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Nova Deli, v. 293, supl. 37, p. 93 -103, 2004.

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANT, P.K.; NIMS, R.M.; WALTER, J.S. Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of American Venterinary Medical Association**, Shaumburg, v. 157, n.11,p. 1627-1632, 1970.

IRWIN, P.J. Review. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasites & Vectors**, v. 2, suppl. 1, p. 1-9, 2009.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.42, p. 281-287, 1994.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.; NEI, M. Mega2: Molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

LOPEZ, V. G.; Identificación y distribución de garrapatas de bovinos en Colombia. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE DIAGNÓSTICO, EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE ENFERMEDADES HEMOPARASITÁRIAS, Palmira, 1989. **Memórias...**

MACHADO, R.Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A.A.; LEMOS, E.G.; MACHADO, M.R.F.; VALADÃO, I.F.F.; L.G.; MALHEIROS, E.B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.71, p.17-26, 1997.

MARSAUDON, E.; CAMENEN, J.; TESTOU, D.; BOURREE, P.; SAMSON, P.; LUNEAU, F.; *Babesia canis* human babesiosis causing a 40-day anuria. **Annales de Médecine Interne**, Paris, v. 146, p. 451-452, 1995.

MARTINEZ, R. **Seguimiento de la presentación de casos clínicos diagnosticados como Ehrlichiosis en caninos en la clínica el mundo de la mascota de Villavicencio**. 2007. 52 f. Monografía (Trabajo de graduación em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Facultad de Ciências Agropecuárias y Recursos Naturales, Escuela de Medicina Veterinária y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, 2007.

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

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

NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the infectious Disease Study Group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, p. 309-315, 2002.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 324p.

OLIVEIRA, D; NISHIMORI, C.T.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO, M.B. Detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados, através do "DOT-ELISA". **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 1, n. 9, p. 1-6, 2000.

OLIVEIRA, T. M.; GUIMARÃES, A. M.; Prevalência de anticorpos anti-*Babesia canis* em Lavras, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** 1 CD-ROM.

OLIVEIRA, T.; FURUTA, P.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania sp.*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OPS / OMS. In: **CONSULTA OPS/OMS de expertos sobre Rickettsiosis en las Americas**, 2004, Ouro Preto. **Informe final ...** Ouro Preto: OPS/OMS, 2004.

PARRADO, G. M.; VARGAS, C. F.; **Asociación de los resultados de una prueba serológica (ELISA) y frotis sanguíneo en caninos con sintomatología compatible de Ehrlichiosis**. 2002. 82 f. Monografía (Trabalho de graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Facultad de Ciencias Agropecuárias y Recursos Naturales, Escuela de Medicina Veterinária y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, 2002.

PATERNINA, L.; DIAZ-OLMOS, Y.; PATERNINA-GOMEZ, M.; BEJARANO, M. *Canis familiaris*, um nuevo hospedero de *Ornithodoros (A.) puertoricensis* Fox, 1947 (Acari: Ixodida) in Colômbia. **Acta Biológica Colombiana**, Bogotá, v. 14, n. 1, p. 153-160, 2009.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B.; *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, Venezuela, v. 34, p. 2133-2139, 1996.

REMO, G. Canine Babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Yardley, v.20, n.4, p. 459-466, 1998.

REITER, I.; WEILAND, G. Recently developed methods for the detection of babesial infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 83, p. 21-23, 1989.

RISTIC, M.; Protozoal diseases: babesiosis. In: BONE, J.F. et al. **Equine medicine and surgery**. Illinois: American Veterinary Publications, 1972. p.137-144.

SASANELLI, M.; PARADIES, P.; LUBAS, G.; OTRANTO, D.; DE CAPRARIIS, D. Atypical clinical presentation of coinfection with Ehrlichia, Babesia and Hepatozoon species in a dog. **Veterinary Record**, London, v 3; n. 164 p.22-3, 2009

SHAW, S.; DAY, M.; BIRTLES, R.; BREITSCHWERDT, E. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, Langford, v. 17, p. 74–80. 2001

SWANGO, L.; BANKEMPER, K.; KONG, L. Infecções bacterianas, riquetsias, protozoais e outras. In: ETTINGER, S. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. v. 1, p. 300-302.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 473-481.

TRAPP, S.; DAGNONE, S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.; AMUDE, A.; AUTRAN DE MORAIS, H. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, p. 223-230. 2006.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

VIDOTTO, O.; MANDUCCA, S. Babesiose canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIKETSIOSES, 1., 2004, Ouro Preto, MG. **Anais...**

WALKER, H.; PADDOCK, D.; DUMLER, J. Emerging and Re-emerging Tick-Transmitted Rickettsial and Ehrlichial Infections. **Medicine Clinics of North America**, v. 92, p. 1345–1361, 2008.

WANER, T.; SHINITSKY, L.; SHARABANI, E.; BUCHA, H.; KEYSARYA, A.; HARRUS, S. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Rehovot, v. 77, p. 145-150, 2000.

WANER, C.K.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 95, p. 1-15, 2001.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H.Y.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of “nested” PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of *Ehrlichia canis*. Infection in Dogs Treated with Doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 7 p. 1852-1855, 1997.

ANEXOS

Anexo A. Variações e medias dos valores normais do hemograma de cães

Variações e médias	
Hematócrito (%)	37 – 55(45)
Leucócitos (/μL)	5,5 – 17,0 (11,5)
Neutrófilos segmentados (/μL)	3.000 – 11.500 (7.000)
Neutrófilos bastonetes (/μL)	0 – 300 (70)
Linfócitos (/μL)	1.000 – 4.800 (2.800)
Monócitos (/μL)	150 – 1.350 (750)
Eosinófilos (/μL)	100 – 1.250 (550)
Basófilos (/μL)	Raros
Plaquetas (/μL)	200.00 -500.000 (350.000)

Fonte: JAIN, N.C.: Essentials of Veterinary hematology. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417 p.

Anexo B.

Tabela que apresenta os valores observados menos o esperado, para cada uma das cidades.

	BOG	VILLA	BUCA	HC	PC	PB	PN	SEP	SEN	PEP	PEN	SBP	SBN	PBP
VILLA	-6,61													
BUCA	-8,32	-13,58												
HC	5,97	0,75	-6,73											
PC	-5,97	-0,75	6,73	-19,19										
PB	-9,46	-5,06	14,52	-7,58	7,58									
PN	9,46	5,06	-14,52	7,58	-7,58	-22,02								
SEP	-2,79	0,22	2,57	-3,71	3,71	4,25	-4,25							
SEN	2,79	-0,22	-2,57	3,71	-3,71	-4,25	4,25	-12,47						
PEP	-7,89	1,11	6,78	-8,35	8,35	9,62	-9,62	6,23	-6,23					
PEN	7,89	-1,11	-6,78	8,35	-8,35	-9,62	9,62	-6,23	6,23	-21,61				
SBP	-9,03	1,62	7,40	-4,21	4,21	9,12	-9,12	2,92	-2,92	11,46	-11,46			
SBN	9,03	-1,62	-7,40	4,21	-4,21	-9,12	9,12	-2,92	2,92	-11,46	11,46	-22,17		
PBP	-1,06	1,25	-0,19	-1,42	1,42	2,24	-2,24	0,84	-0,84	1,92	-1,92	1,35	-1,35	
PBN	1,06	-1,25	0,191	1,42	-1,42	-2,24	2,24	-0,84	0,84	-1,92	1,92	-1,35	1,35	-4,71

Tabela que apresenta os Autovalores de qui-quadrado, para cada uma das cidades, em negrito as correspondências observadas.

	BOG	VILLA	BUCA	HC	PC	PB	PN	SEP	SEN	PEP	PEN	SBP	SBN	PBP
VILLA	6,62													
BUCA	8,33	13,58												
HC	2,74	0,03	1,69											
PC	5,98	0,06	3,69	19,19										
PB	8,56	1,50	9,83	1,71	3,73									
PN	10,48	1,84	12,04	2,10	4,57	22,02								
SEP	0,50	0,00	0,20	0,27	0,59	0,45	0,55							
SEN	2,44	0,01	1,01	1,35	2,93	2,20	2,69	12,47						
PEP	7,90	0,10	2,84	2,76	6,00	4,55	5,58	1,26	6,24					
PEN	5,62	0,07	2,02	1,96	4,27	3,24	3,97	0,90	4,44	21,62				
SBP	8,13	0,16	2,66	0,55	1,20	3,22	3,94	0,22	1,08	6,72	4,78			
SBN	9,10	0,18	2,98	0,62	1,34	3,60	4,41	0,24	1,21	7,52	5,35	22,18		
PBP	1,07	0,91	0,02	0,59	1,29	1,83	2,25	0,17	0,84	1,78	1,26	0,70	0,78	
PBN	0,06	0,05	0,00	0,04	0,08	0,11	0,13	0,01	0,05	0,11	0,08	0,04	0,05	4,72

HC (histórico de carrapatos), PC (presença de carrapatos), PB (plaquetas baixas), PN (plaquetas normais), SEP (sorologia erliquia positivo), SEN (sorologia erliquia negativo), PEP (PCR erliquia positivo), PEN (PCR erliquia negativo), SBP (sorologia babesia positivo), SBN (sorologia babesia negativo), PBP (PCR babesia positivo), PBN (PCR babesia negativo).

Anexo C.

Tabela que apresenta os valores observados menos o esperado, para a cidade de Villavicencio.

	HC	PC	HTB	HTN	PB	PN	SEP	SEN	PEP	PEN	SBP
PC	-6,39										
HTB	-0,65	0,65									
HTN	0,65	-0,65	-7,74								
PB	-1,52	1,52	2,19	-2,19							
PN	1,52	-1,52	-2,19	2,19	-7,35						
SEP	-1,45	1,45	1,42	-1,42	1,94	-1,94					
SEN	1,45	-1,45	-1,42	1,42	-1,94	1,94	-4,19				
PEP	-2,94	2,94	3,23	-3,23	3,58	-3,58	2,26	-2,26			
PEN	2,94	-2,94	-3,23	3,23	-3,58	3,58	-2,26	2,26	-7,68		
SBP	-0,77	0,77	2,29	-2,29	3,03	-3,03	0,90	-0,90	3,87	-3,87	
SBN	0,77	-0,77	-2,29	2,29	-3,03	3,03	-0,90	0,90	-3,87	3,87	-7,55

Tabela que apresenta os Autovalores de qui-quadrado, para a cidade de Villavicencio, em negrito as correspondências observadas.

	HC	PC	HTB	HTN	PB	PN	SEP	SEN	PEP	PEN	SBP
PC	6,39										
HTB	0,04	0,10									
HTN	0,04	0,09	7,74								
PB	0,27	0,66	0,83	0,78							
PN	0,17	0,42	0,52	0,49	7,35						
SEP	0,11	0,28	0,16	0,15	0,37	0,24					
SEN	0,59	1,45	0,83	0,78	1,94	1,22	4,19				
PEP	0,87	2,12	1,54	1,44	2,37	1,49	0,43	2,26			
PEN	0,71	1,75	1,27	1,19	1,95	1,23	0,36	1,86	7,68		
SBP	0,05	0,11	0,60	0,56	1,32	0,83	0,05	0,28	1,84	1,52	
SBN	0,06	0,16	0,83	0,78	1,83	1,15	0,07	0,39	2,55	2,10	7,55

HC (histórico de carrapatos), PC (presença de carrapatos), HTB (hematócrito baixo), HTN (hematócrito normal), PB (plaquetas baixas), PN (plaquetas normais), SEP (sorologia erliquia positiva), SEN (sorologia erliquia negativa), PEP (PCR erliquia positiva), PEN (PCR erliquia negativa), SEP (sorologia babesia positiva), SBN (sorologia babesia negativa).