

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade De Veterinária**  
**Programa de Pós-graduação em Veterinária**



Dissertação

**Prevalência molecular de *Ehrlichia canis* em cães atendidos no Hospital de  
Clínicas Veterinária da UFPel**

**Daniel Felipe Buitrago Linares**

**Pelotas, 2023**

**Daniel Felipe Buitrago Linares**

**Prevalência molecular de *Ehrlichia canis* de cães atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária da UFPel**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Clínica Médica Veterinária).

Orientador: Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Coorientadora: Marlette Brum Cleff

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

L735p Linares, Daniel Felipe Buitrago

Prevalência molecular de *ehrlichia canis* em cães atendidos no hospital de clínicas veterinária da ufpel / Daniel Felipe Buitrago Linares ; Rodrigo Casquero Cunha, orientadora ; Marlete Brum Cleff, coorientador. — Pelotas, 2023.

59 f.

Dissertação (Mestrado) — Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Nested pcr. 2. Dogs. 3. Zoonotic. 4. Hemoparasites. 5. Transmitted disease. I. Cunha, Rodrigo Casquero, orient. II. Cleff, Marlete Brum, coorient. III. Título.

CDD : 636.7

Daniel Felipe Buitrago Linares

Prevalência molecular de *Ehrlichia canis* de cães atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária da UFPel

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/02/2023

Banca examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha (Orientador)  
Doutor em Ciência Animal pela UFMS

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva  
Doutor em Biotecnologia pela UFPel

Dr. Kauê Rodriguez Martins  
Doutor em Biotecnologia pela UFPel

Prof. Dr. Camila Belmonte Oliveira  
Doutor em Medicina Veterinária pela UFSM

**Para minha mãe Luisa, minha irmã Helena e a minha amiga Nasly Clavijo por me apoiar sempre e me acompanhar nessa caminhada**

## **Agradecimentos**

Agradeço a todas aquelas pessoas que me encheram de amor, me acompanharam nesse caminho, me mostram a luz sempre quando achei que tudo estava obscuro, obrigado pela motivação e a coragem, por amenizar meus momentos difíceis e me acompanhar a desfrutar os momentos de alegria.

A meu orientador, Prof, Rodrigo Casquero Cunha, por acreditar em mim, pela oportunidade de executar esse projeto e pelas suas guias, e me incursionar nesse mundo novo para mim da biologia molecular.

A minha coorientadora Proffa. Marlette Brum Cleff, por me permitir viver experiências de crescimento pessoal e profissional na área que eu amo.

A minha família por sempre acreditar em mim, me apoiar e me motivar a continuar com cada desafio na minha vida.

Aos meus amigos por sempre me acompanhar, me escutar e me apoiar neste caminho do mestrado e tornar tudo mais leve.

Aos meus colegas e amigos Leonel e José por sempre me guiar e dar apoio.

Ao pessoal que faz parte da equipe veterinária UFPel, clínicas veterinárias, Laboratorio clínico e LabMol, Por a disponibilidade e ajuda nas coletas e análise de amostras.

A UFPel e a Pós-graduação em veterinária, pela oportunidade de pós-graduação e a Capes/CNPq e OEA por me conceder a Bolsa para poder realizar este projeto, viver e conhecer um novo lugar, cultura e aprender um novo idioma.

**“Primum non nocere”**

**-Hipócrates**

## Resumo

Buitrago-Linares, Daniel Felipe. **Prevalência molecular de *Ehrlichia canis* em cães atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária da UFPel**. 2023. F. Dissertação (Mestrado em Ciências) Programa de Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Este estudo teve como objetivo investigar a prevalência de *Ehrlichia canis*, um patógeno que pode causar uma doença multisistêmica em cães, em uma população de cães com condições clínicas variadas do Hospital Clínicas Veterinária (HCV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Um total de 95 amostras de sangue foram coletadas e avaliadas quanto à qualidade antes de serem analisadas por meio de Nested PCR. Os resultados revelaram que o DNA de *E. canis* foi detectado em 16 das 95 amostras, indicando uma taxa de prevalência de 16,84% no HCV-UFPel. A idade média dos animais infectados foi de  $7,86 \pm 5,13$  anos, sendo o mais jovem com 0,8 anos e o mais velho com 15,8 anos. Este estudo representa um dos poucos estudos de prevalência molecular realizados no Rio Grande do Sul e contribui para uma melhor compreensão do comportamento epidemiológico de *E. canis*. Os achados sugerem que a infecção por *E. canis* está presente em cães com diferentes condições clínicas, destacando a necessidade de vigilância e medidas de controle de rotina para evitar a possível transmissão zoonótica.

Palavras Clave: Nested PCR; Cães; Zoonótica; Hemoparasitas; Doenças transmitidas.



## Abstract

Buitrago-Linares, Daniel Felipe. **Diagnosis and molecular prevalence of *Ehrlichia canis* no Hospital de Clínicas Veterinária of UFPel**. 2023. F. Dissertation (Master in Veterinary Sciences) Post-graduation Program in Veterinary Medicine, Veterinary Faculty, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

This study aimed to investigate the prevalence of *Ehrlichia canis*, a pathogen that can cause a multisystemic disease in canines, in a population of dogs with varying clinical conditions from the Hospital Clínicas Veterinária (HCV) of the Universidade Federal de Pelotas (UFPel). A total of 95 blood samples were collected and evaluated for quality before being analyzed using Nested PCR. The results revealed that *E. canis* DNA was detected in 16 out of 95 samples, indicating a prevalence rate of 16.84% at HCV-UFPel. The mean age of the infected animals was  $7.86 \pm 5.13$  years, with the youngest being 0.8 years old and the oldest being 15.8 years old. This study represents one of the few molecular prevalence studies conducted in Rio Grande do Sul and contributes to a better understanding of the epidemiological behavior of *E. canis*. The findings suggest that *E. canis* infection is present in canines with varying clinical conditions, highlighting the need for routine surveillance and control measures to prevent potential zoonotic transmission.

Keywords: Nested PCR; Dogs; Zoonotic; Hemoparasites; transmitted disease.

## Lista de Tabelas

<b>Table 1</b>	Age-related statistics for individuals detected and not detected.....	<b>35</b>
<b>Table 2</b>	Descriptive statistics of age for individuals detected and not detected.....	<b>36</b>
<b>Table 3</b>	Relation of PCR detection positives and negatives with characteristics of the red and white series.....	<b>37</b>
<b>Table 4</b>	Relation of detected positives and negatives with biochemical disorders.....	<b>40</b>

## Lista de abreviaturas e siglas

<b>ALT:</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST:</b>	Aspartato aminotransferase
<b>DNA:</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>Elisa:</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimático.
<b>HCV:</b>	Hospital de Clínicas Veterinárias.
<b>H<sub>2</sub>O:</b>	Água
<b>IFI:</b>	Imunofluorescência indireta.
<b>Mm:</b>	Milímetros
<b>mM:</b>	Miliosmolar
<b>ALT:</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST:</b>	Aspartato aminotransferase
<b>PCR:</b>	Reação em cadeia polimerase.
<b>µL:</b>	Microlitro

## Lista de símbolos

>	Maior
™	Marca registrada
®	Marca registrada
<	Menor
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem

## Sumario

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Descrição do microrganismo.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Epidemiologia.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Patogenia.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.</b>	<b>Fases clínicas.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Achados laboratoriais.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Achados clínicos e histopatológicos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Métodos de diagnostico.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Esfregaço sanguíneo.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Diagnostico sorológico.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5.2.1</b>	<b>IFI.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5.2.2</b>	<b>ELISA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5.2.3</b>	<b>Diagnostico molecular.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b>Prevenção.....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Artigo.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>42</b>
	<b>Referencias.....</b>	<b>43</b>

## 1 Introdução

A ehrlichiose canina pode ser causada por diferentes agentes bacterianos intracelulares como: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaaffensis*, *Ehrlichia ewingii*, e pode apresentar concomitância com outros agentes patógenos transmitidos por carrapatos (GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016). A doença causada por *E. canis* também é conhecida como enfermidade monocítica canina, pancitopenia tropical canina, entre outros nomes. Foi a enfermidade responsável por apresentar uma alta mortalidade em cachorros militares britânicos entre 1963 e 1968 em Singapura e Malásia, sendo detectada em um labrador retriever em 1967 (HUXSOLL et al., 1970).

É uma doença de relevância para médicos veterinários que atuam na clínica de pequenos animais, sendo diagnosticada em cães em diferentes locais de todo o Brasil e apresentando maior prevalência em regiões de clima quente ou temperado. De fato, tem sido diagnosticada no Brasil em todos os estados, tendo uma menor prevalência na região sul (DUARTE, 2010)

A distribuição mundial da *E. canis* é ampla, sendo diagnosticada em vários continentes, incluindo Ásia, África, Europa e Américas. A doença é mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais, exceto em países como Austrália e Nova Zelândia (GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016). Isto posto que a presença predominante do seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* garante a sua transmissão. É importante ressaltar que o carrapato tem maior ocorrência em áreas urbanas do que em áreas rurais (VELOSO et al., 2021) tornando a ehrlichiose canina uma doença de relevância clínica em animais de companhia em todo o mundo.

Após a inoculação do patógeno pelo carrapato vetor, a infecção por *E. canis* apresenta uma incubação de 8 a 20 dias, com diferentes fases de manifestação: aguda, subclínica e crônica. Cada fase é caracterizada por anormalidades clínicas e hematológicas distintas (GREENE, 2015; HARRUS et al., 1998a). Os sinais clínicos comuns incluem febre, anorexia, depressão, perda de peso, edema, hepatomegalia,

esplenomegalia, linfadenopatia, distúrbios cardíacos, respiratórios, neurológicos e oftalmológicos (CESAR, 2008; DE CASTRO et al., 2004; GREENE, 2015)

Os exames laboratoriais revelam frequentemente alterações hematológicas como trombocitopenia, leucopenia e anemia normocítica normocrômica. (DE CASTRO et al., 2004; GREENE, 2015; MOLINA; SEÑARIS, 2004) Para realizar o diagnóstico da doença, é necessário um exame clínico detalhado para determinar os sinais clínicos e as alterações hematológicas e bioquímicas que podem estar presentes ao longo da doença (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2004).

Há uma variedade de testes disponíveis que podem ajudar a confirmar o diagnóstico, mas que apresentam variações na sensibilidade e especificidade. Entre esses testes, incluem-se o esfregaço sanguíneo, cultivos celulares, técnicas de detecção de anticorpos contra a doença e técnicas moleculares que identificam o DNA do patógeno a partir de amostras de sangue circulante ou do baço. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada o teste padrão-ouro, pois apresenta maior sensibilidade 100% e especificidade do 100%, porém pode variar segundo o tipo de PCR implementado (BONILLA et al., 2014; FRANCO; ADAME; DZUL, 2019; THOMSON et al., 2018). Permitindo a detecção do DNA do agente presente nas células sanguíneas (UPADHYAY et al., 2021).

As técnicas sorológicas, como o ELISA, têm limitações em determinar se a infecção é atual ou pregressa e podem apresentar reações cruzadas entre as espécies de *Ehlichia* spp. O esfregaço sanguíneo apresenta apenas 4% de eficácia na detecção da doença e a efetividade das provas diagnósticas varia de acordo com a fase da doença, podendo resultar em falsos negativos. Assim, é necessário integrar os achados clínicos e interpretar a doença como um todo para chegar a um diagnóstico preciso. Nesse sentido, a PCR é uma ferramenta valiosa para minimizar os resultados falso-positivos e falso-negativos (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2004; HARRUS; WANER, 2011; SÁ et al., 2018; UENO et al., 2009)

O objetivo desse estudo foi determinar, mediante PCR, a prevalência molecular de *E. canis* em amostras de sangue tomadas de cães sintomáticos e assintomáticos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária (HCV) da Universidade Federal de Pelotas durante o período de maio a dezembro do ano 2022.

## 2 Revisão de literatura

### 2.1 Descrição do microrganismo

*Ehrlichia canis* é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta tanto o hospedeiro vertebrado quanto o vetor invertebrado (BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009). É uma bactéria Gram-negativa que pertence ao grupo das rickettsias e está classificada dentro da família Anaplasmataceae. Seu único cromossomo circular contém 1.315.030 nucleotídeos (HARRUS; WANER, 2011; KEYSARY et al., 2001). O gênero *Ehrlichia* é composto por cinco espécies, sendo elas *E. canis*, *E. chaaffensis*, *E. ewingii*, *Ehrlichia muris* e *Ehrlichia ruminantium*. Todas são transmitidas principalmente por carrapatos *R. sanguineus*, sendo três consideradas zoonóticas: *E. canis*, *E. chaaffensis* e *E. ewingii*, sendo de preocupação em saúde pública pela interação entre cães e humanos (VELOSO et al., 2021).

*E. canis* tem a capacidade de infectar principalmente as células hematopoiéticas maduras ou imaturas, atingindo principalmente as células do sistema fagocítico mononuclear, como os monócitos e os macrófagos (leucócitos), formando agrupamentos chamados mórulas, que são consideradas como um microrganismo com uma medida de 0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$  de diâmetro (GREENE, 2015; STIVAL et al., 2021). O método mais comum para identificar a filogenética da espécie é o 16S rRNA (DUARTE; PARENTE; LINHARES, 2013).

### 2.2 Epidemiologia

Esta rickettsia foi descoberta em cães pelos pesquisadores Donatien e Lestoquard no país de Argélia um país da África do norte, no 1935, sendo denominada como *E. canis* em 1945 por Mashkovky, o seu gênero foi nominado *Ehrlichia* por causa do microbiologista Paul Ehrlich (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2004).



A doença só recebeu uma atenção notória na década de 1980 pela crença de que esta infectava humanos, porém, em 1991, descobriu-se que o agente responsável pela erliquiose monocitotrófica humana era *E. chaaffensis* (STIVAL et al., 2021). Também, recebeu atenção após causar uma alta mortalidade de cães militares americanos, sendo a maior parte de raça pastor alemão, na guerra do Vietnã (GREENE, 2015; KEYSARY et al., 2001; STIVAL et al., 2021)

*E. canis* é uma doença distribuída globalmente e causa de morbidade e mortalidade em cães ao redor do mundo, envolvendo lugares como Ásia, África, Europa, e Américas, países como Austrália e Nova Zelândia parecem ser área livre da doença, a doença tem sido relatada em espécies como coioote, raposa, chacal, humanos e cão doméstico (DUARTE; PARENTE; LINHARES, 2013; GREENE, 2015; STIVAL et al., 2021).

No Brasil foi detectada pela primeira vez no ano 1973, num cão da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Após disso tem sido detectada nas regiões nordeste, sudeste e sul, onde a prevalência pode variar de 14 a 45% em cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias. Sendo detectada a sua presença por técnicas moleculares no HCV da UFPEL por (BARCELLOS KRAUSE et al., 2015). A prevalência do patógeno vai depender do clima, distribuição do vetor, habitat do animal e exposição deste ao vetor sem predileção por idade, raça ou sexo (HARRUS et al., 1997; JULIANA PIERANGELI FONSECA, CHRISTIAN HIRSCH, 2017; STIVAL et al., 2021).

A transmissão de *E. canis* dá-se mediante o repasto sanguíneo do vetor, sendo que o carrapato *R. sanguineus*, conhecido no Brasil como carrapato marrom, ao parasitar um animal infectado, adquire o patógeno e transforma-se em portador do agente, conseguindo transmitir para outros cães. Outra forma de transmissão podem acontecer por meio de transfusões sanguíneas no qual o doador é portador da doença (FOURIE et al., 2013; STIVAL et al., 2021; WOODY; HOSKINS, 1991). A disseminação dos microrganismos presentes na saliva do carrapato entram ao por via sanguínea do hospedeiro e replica-se em forma de mórulas, uma vez estas mórulas fazem lise, liberam-se novos corpos elementais que vão a infestar outras células sanguíneas, a disseminação pode continuar via sanguínea ou via linfática e atingir órgãos de diferentes sistemas como fígado, baco, medula óssea e nódulos linfáticos (GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016).

Alem da *E. canis*, o carrapato pode transmitir outros patógenos como *Babesia*, *Hepatozoon*, *Mycoplasma haemocanis*. Sendo a Erliquiose canina a que apresenta um quadro clínico severo, tendo assim uma significativa importância epidemiológica (SILVA, 2015), a transmissão da *E. canis* transestadial, sendo considerado o carrapato como um vetor, mas não como reservatório da doença.(SILVA, 2015).

A *E. canis* foi descoberta em cães na Argélia pelos pesquisadores Donatien e Lestoquard em 1935, e seu gênero foi nomeado em homenagem ao microbiologista Paul Ehrlich(DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2004; STIVAL et al., 2021). Embora tenha sido identificada em todo o mundo em regiões tropicais e subtropicais, a doença só recebeu atenção notável na década de 1980 por causa da crença de que ela infectava humanos. No entanto, em 1991, foi descoberto que o agente responsável pela erliquiose monocítica humana era a *E. chaffeensis* (DE CASTRO et al., 2004; STIVAL et al., 2021). A *E. canis* recebeu atenção após causar uma alta mortalidade em cães militares americanos, principalmente da raça pastor alemão, durante a Guerra do Vietnã (GREENE, 2015; STIVAL et al., 2021; VIEIRA et al., 2011).

A *E. canis* é uma doença distribuída globalmente e causa morbidade e mortalidade em cães em todo o mundo, afetando espécies como coiotes, raposas, chacais, humanos e cães domésticos. Embora seja relatado em todo o mundo, países como Austrália e Nova Zelândia parecem ser livres da doença (DUARTE; PARENTE; LINHARES, 2013; GREENE, 2015; STIVAL et al., 2021).

No Brasil, a *E. canis* foi detectada pela primeira vez em 1973 em um cão de Belo Horizonte, Minas Gerais. Desde então, tem sido detectada nas regiões nordeste, sudeste e sul do país, com prevalência variando de 14 a 45% em cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias. A prevalência do patógeno depende do clima, idade, raça, distribuição do vetor, habitat do animal e exposição do cão ao vetor (JULIANA PIERANGELI FONSECA, CHRISTIAN HIRSCH, 2017; STIVAL et al., 2021), tem sido detectado no HCV da UFPEL mediante técnicas moleculares por (BARCELLOS KRAUSE et al., 2015).

A transmissão da *E. canis* ocorre através do repasto sanguíneo do vetor. O carrapato *R. sanguineus*, conhecido no Brasil como carrapato marrom, ao parasitar um animal infectado, adquire o patógeno e se torna um portador do agente, conseguindo

transmiti-lo para outros cães. Outra forma de transmissão pode ocorrer por meio de transfusões sanguíneas em que o doador é portador da doença (STIVAL et al., 2021). A disseminação dos microrganismos presentes na saliva do carrapato ocorre através da via sanguínea do hospedeiro e replica-se em forma de mórulas. Uma vez que estas mórulas fazem lise, liberam-se novos corpos elementares que vão infestar outras células sanguíneas. A disseminação pode continuar via sanguínea ou via linfática e atingir órgãos de diferentes sistemas, como fígado, baço, medula óssea e nódulos linfáticos (GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016).

Além da *E. canis*, o carrapato pode transmitir outros patógenos, como *Babesia*, *Hepatozoon* e *Mycoplasma haemocanis*. A erliquiose canina apresenta um quadro clínico grave, sendo, portanto, de significativa importância epidemiológica. A transmissão da *E. canis* é transtadiária, considerando-se o carrapato como vetor, mas não como reservatório da doença (GREENE, 2015; GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016; SILVA, 2015).

### 2.3 Patogenia

As interações na patogênese da ehrlichiose canina envolvem mecanismos do patógeno e do sistema imunológico do hospedeiro. A infecção é transmitida quando o carrapato se alimenta do hospedeiro (neste caso, o cão), permitindo que as secreções salivares do carrapato contaminado atinjam a região onde ele se alimenta. A saliva dos carrapatos contém moléculas com propriedades anticoagulantes, anti-inflamatórias e imunorreguladoras (FOURIE et al., 2013; GROVES et al., 1975).

A bactéria *Ehrlichia* spp. desenvolveu diferentes mecanismos para escapar do sistema imunológico do hospedeiro. Esses mecanismos envolvem processos de adesão, internalização, proliferação, exocitose e propagação intercelular. O objetivo desses processos é adquirir nutrientes, evitar a ação do lisossomo e inibir os mecanismos de apoptose celular (JERE W. MCBRIDE.; & DAVID H. WALKER, 2013).

Os leucócitos, como os monócitos, macrófagos e neutrófilos, possuem receptores de reconhecimento tipo TOLL, que reconhecem padrões moleculares expressos por agentes infecciosos e desencadeiam respostas inflamatórias, e receptores intracelulares

de reconhecimento tipo NOD, que permitem identificar padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) ou sinais de perigo do tipo endógeno, como o peptidoglicano e o lipopolissacarídeo (LPS) (GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016). Os hemócitos do carrapato utilizam o mesmo mecanismo para eliminar os (GREENE, 2015; RIKIHISA, 2015). Entretanto, as bactérias gram-negativas têm ausência de peptidoglicanos e lipopolissacarídeos, o que permite que elas evitem esses receptores e entrem na célula (AZIZ et al., 2023).

Após a entrada do patógeno na célula, ele forma vacúolos que se transformam em endossomos precoces, expressando proteínas como Rab5A e o antígeno 1 endossomal precoce (EEA1). Esses endossomos precoces permitem a acumulação de transferrina e, com a ajuda do receptor da transferrina (RTr), facilitam a captura de ferro da célula hospedeira. Na etapa seguinte, que é o endossomo tardio, a proteína EEA1 desaparece e é substituída por Rab7, e o pH do endossomo acidifica para 5,2 para permitir a sobrevivência e replicação do patógeno (GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016; MOUMÈNE, AMAL, 2016). Além disso, o patógeno também consegue inibir os processos mitocondriais e, conseqüentemente, apoptóticos da célula hospedeira (GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016).

## **2. 4 Fases clínicas**

O curso da doença da ehrlichiose canina pode ser dividido em três fases distintas: a fase de incubação, que dura de 8 a 20 dias após a infecção; a fase aguda, subclínica e crônica. Na prática clínica, é difícil determinar exatamente em qual fase da doença o animal se encontra (AVENDAÑO et al., 2017; MELO; KELEN; LIMA, 2004). Cães que são tratados durante a fase aguda têm uma boa chance de recuperação, enquanto aqueles que não recebem tratamento podem entrar em uma fase subclínica após 2 a 4 semanas. Essa fase pode durar de 4 meses a vários anos e, embora alguns cães imunocompetentes possam eliminar a doença nessa fase, outros podem progredir para a fase crônica (MCCLURE et al., 2010; SANTIAGO MONSALVE et al., 2017).

#### 2. 4. 1 Achados laboratoriais

Entre os sinais hematológicos mais comuns da erliquiose canina, destaca-se a trombocitopenia, que pode ser encontrada em até 90% dos cães infectados. A trombocitopenia pode ser causada por diferentes mecanismos, dependendo da fase da doença. Na fase aguda, há um maior consumo de plaquetas devido aos processos inflamatórios no endotélio dos vasos sanguíneos, além de sequestro esplênico e destruição plaquetária como resposta imunológica, reduzindo, assim, a vida média das plaquetas (KAKOMA et al., 1978). Em cães infectados com erliquiose, a média de vida das plaquetas pode diminuir de 9 a 4 dias e até mesmo de 4 a 2 dias após aquisição da doença (HARRUS et al., 1995; KAKOMA et al., 1978; SMITH et al., 1975).

Acredita-se que o baço seja o órgão mais suscetível para conter a *E. canis* na fase subclínica da doença. Nos aspirados esplênicos, é muito mais fácil detectar as mórulas de *E. canis* do que em esfregaços (JOICE LARA MAIA FARIA., ET AL., 2010). Cães que foram submetidos a esplenectomia tiveram um curso da doença menos severo do que aqueles em que o procedimento cirúrgico não foi realizado. Além disso, outros sinais hematológicos que podem ser observados incluem anemia normocítica não regenerativa, leucopenia com monocitose e alteração do hematócrito e da hemoglobina (HARRUS et al., 1998b; NAIR et al., 2016).

Foram levantadas hipóteses sobre as causas das anormalidades bioquímicas observadas na ehrlichiose, como a hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hipergamaglobulinemia, aumento da fosfatase alcalina (FA), alanino aminotransferase (ALT), ureia e creatinina. A hipoalbuminemia pode ser causada por perda periférica em fluidos inflamatórios devido a alterações na permeabilidade vascular, perda de sangue por hemorragias, alterações hepáticas que diminuem a produção de proteína, alterações no glomérulo e controle da pressão oncótica. A hipergamaglobulinemia pode ser policlonal ou monoclonal, e os anticorpos anti-*E. canis* não conferem proteção, independentemente se o número de anticorpos elevado. Em cães com gamopatia monoclonal, o aumento da viscosidade sanguínea pode levar a sinais clínicos, como hemorragia subretiniana, descolamento de retina e cegueira aguda (HARRUS et al., 1996; HARRUS; WANER, 2011; HARRUS; WANER; NEER, 2012).

## 2. 4. 2 Achados clínicos e histopatológicos

Durante a fase aguda da ehrlichiose, é comum observar-se a presença de linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. Também é possível observar achados moleculares e histopatológicos em órgãos como o baço, rim, nódulos linfáticos e fígado, indicando que a doença pode afetar múltiplos órgãos corporais e causar uma diversidade de sinais clínicos (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2004; FRUET, 2005; GREENE, 2015).

A ehrlichiose pode afetar o pulmão, levando a alterações como pneumonia intersticial, espessamento dos septos alveolares e presença de células mononucleares e macrófagos. Além disso, há alterações vasculares decorrentes da presença de mórulas de *E. canis* no endotélio de pequenas e médias artérias. Na Europa, foi relatado um caso de hipertensão pulmonar em um cachorro da raça Yorkshire associada à *E. canis* (GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016; LOCATELLI et al., 2012; SIMPSON, 1974).

Nos rins, foram observados achados a nível tubular e glomerular em cães inoculados experimentalmente, exibindo proteinúria transitória durante a fase aguda da doença. Nível histopatológico foi identificado como glomerulopatia, possivelmente gerando a hipoalbuminemia encontrada na fase aguda da doença (CODNER; MASLIN, 1992).

Observa-se, no fígado, a infiltração portal de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos, que pode resultar em alterações na arquitetura hepática, como degeneração de gordura centro-lobular perivascular de leve a moderada e infiltração de células mononucleares periportais. Além disso, há relatos de casos de hepatite severa associada a *E. canis* em cães (DE CASTRO et al., 2004; GUTIÉRREZ; PÉREZ-YBARRA, 2016; M.E. MYLONAKIS. ET AL., 2010).

O baço é considerado o principal reservatório de *E. canis* e acredita-se que seja o último órgão a abrigar o patógeno antes de sua eliminação pelo corpo. A esplenomegalia é um achado clínico comum, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença. Durante a fase aguda, a esplenomegalia pode ser de origem não congestiva (HARRUS et al., 1998b; HARRUS; WANER, 2011).

Durante a fase aguda da doença, um dos achados clínicos mais comuns é a linfadenomegalia, resultado da atividade hiperplásica dos linfócitos T e B induzida pela presença do antígeno ehrlichial. Na histopatologia, observa-se uma alteração do tecido linfático com acúmulo perivascular generalizado de células linfóides e plasmáticas, bem como a presença de plasmócitos. É importante destacar que as células B podem se diferenciar em células plasmáticas, o que leva a uma secreção aumentada de gamma globulinas e à consequente hipergamaglobulinemia, um sinal frequentemente observado em cães com a doença na fase aguda (KEYSARY et al., 2001; M.E. MYLONAKIS. ET AL., 2010; SANTIAGO MONSALVE et al., 2017).

Na ehrlichiose canina, a medula óssea é um dos órgãos afetados pela doença. Na fase aguda da doença, ocorre uma atividade hiperplásica na medula óssea devido ao aumento de células plasmáticas, que pode levar ao aumento do número de megacariócitos. Isso pode ser devido à trombocitopenia periférica e à trombopoiese ativa (HARRUS et al., 1995). Na fase crônica, por outro lado, há uma diminuição nas células mielóides e eritroides, mas há uma presença marcada de células plasmáticas e uma presença atípica de megacariócitos. Nesta fase, pode ocorrer uma aplasia de medula óssea devido à imunossupressão ou necrose da medula óssea. Estas alterações podem levar a um quadro clínico de anemia, trombocitopenia e leucopenia (BUHLES; HUXSOLL; RISTIC, 1974; M.E. MYLONAKIS. ET AL., 2010).

O exame oftalmológico em cães com erliquiose canina tem revelado a presença de células plasmáticas ao redor das veias na capa celular ganglionar. Dentre as principais alterações oculares encontram-se uveíte bilateral anterior e lesões retinianas, como dano retinal exsudativo, hemorragia retinal, blefaroespasma bilateral e fotofobia. A detecção de *E. canis* na conjuntiva por meio de PCR também têm sido relatada em cães com a doença. É importante salientar que as lesões oculares geralmente surgem na fase aguda e subclínica da doença (KOMNENOU et al., 2007; LEIVA; NARANJO; PEÑA, 2005).

O coração apresenta alterações hemorrágicas macro e microscópicas, bem como a presença de células mononucleares próximas dos vasos sanguíneos miocárdicos e do tecido adiposo pericárdico. Cães com infecção aguda têm maior probabilidade de sofrer infarto, porém, o risco cardíaco pode estar presente tanto na fase aguda quanto na

crônica da doença. Níveis elevados de troponina I foram detectados em cães infectados por *E. canis* (HILDEBRANDT et al., 1973; KOUTINAS et al., 2012).

## **2. 5 Métodos de diagnóstico**

Para o diagnóstico da infecção por *E. canis*, é necessário realizar uma análise cuidadosa da anamnese, avaliando se o animal reside ou viajou para áreas endêmicas da doença e se há presença de carrapatos. Além disso, é importante observar os sinais clínicos apresentados pelo animal e realizar exames laboratoriais, como a detecção direta da bactéria e achados sorológicos. Para identificar a presença de *E. canis*, os testes mais comumente utilizados são a imunofluorescência indireta, ELISA, esfregaço sanguíneo e reação em cadeia polimerase (PCR) (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2004; JULIANA PIERANGELI FONSECA, CHRISTIAN HIRSCH, 2017; LÓPEZ ROMERO; SOLER-TOVAR, 2020; STIVAL et al., 2021).

### **2. 5. 1 Esfregaço sanguíneo**

O diagnóstico de *E. canis* podem ser feito por meio da detecção microscópica de corpos de inclusão em esfregaços sanguíneos. Essa técnica é considerada rápida, simples e econômica, mas possui uma baixa taxa de sucesso para o diagnóstico da doença aguda, cerca de 4% (DE PÁDUA COSTA et al., 2015; FERRAZ et al., 2021).

### **2. 5. 2. Diagnóstico sorológico**

As técnicas serológicas são as mais utilizadas para suspeita de infecção por *E. canis*. Elas não detectam diretamente o patógeno, mas identificam anticorpos produzidos contra ele. Esses anticorpos podem ser detectados nas fases aguda, subclínica, crônica e após o tratamento efetivo da doença. No entanto, um diagnóstico sorológico positivo pode ser encontrado tanto em uma infecção ativa quanto em uma exposição prévia do cão ao patógeno, o que torna necessária a realização de exames clínicos e análises



complementares confirmatórias (KRAWCZAK et al., 2012; PUENTES, 2016; VIEIRA et al., 2011).

O diagnóstico sorológico pode apresentar algumas limitações em animais na fase inicial aguda ou com risco de óbito, uma vez que pode não haver tempo suficiente para a produção de anticorpos ou a produção pode ter sido esgotada nesses casos. Geralmente, os anticorpos anti-*E. canis* do tipo imunoglobulina G podem ser detectados no soro de 7 a 20 dias após a infecção. As técnicas mais utilizadas para a identificação de anticorpos são a imunofluorescência indireta (IFI) e o ELISA (KEYSARY et al., 2001; PUENTES, 2016).

**2. 5. 2. 1 IFI:** A IFI é considerada a prova "padrão ouro" para detecção de *E. canis* devido à sua alta precisão, no entanto, seu uso requer uma equipe experiente e não é uma técnica economicamente viável, o que a torna menos atraente para o veterinário na prática clínica (BONILLA et al., 2014; FRANCO; ADAME; DZUL, 2019; MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ et al., 2015).

**2. 5. 2. 2 ELISA:** As técnicas de ELISA e IFI apresentam uma boa correlação entre seus resultados, com uma sensibilidade igual ou superior a 71% e uma especificidade que pode chegar a 100%. Entretanto, a sensibilidade do teste pode ser reduzida na fase inicial aguda da doença, uma vez que ainda não houve tempo suficiente para produção de anticorpos. Dessa forma, diante da presença de sinais clínicos suspeitos da doença, é recomendável repetir o teste após 2 semanas para garantir uma produção adequada de anticorpos. É importante ressaltar que a IFI, embora seja considerada o padrão-ouro para detecção de *E. canis*, não é uma técnica econômica e requer uma equipe experiente para sua realização, sendo menos utilizada pelos veterinários na prática clínica (BORGES-PEREIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2015; O'CONNOR et al., 2006; PUENTES, 2016).

### 2. 5. 2. 3 Diagnóstico molecular

A PCR é uma técnica altamente sensível e específica na detecção do patógeno de *E. canis*, podendo detectar o microrganismo em cães de 4 a 10 dias após a infecção. No entanto, os resultados falso-negativos podem ocorrer devido a dificuldades na extração do DNA ou seleção inadequada da amostra, enquanto resultados falso-positivos podem ser causados por amplificação inespecífica ou contaminação da amostra durante o teste. É importante tomar cuidados pertinentes ao realizar este teste para obter maior precisão no diagnóstico. A PCR é considerada uma prova Gold Standard devido à sua alta sensibilidade e especificidade, além de detectar DNA do patógeno em sangue, o que a diferencia de outros testes diagnósticos. Atualmente, a PCR é usada como teste confirmatório para o diagnóstico da doença (CABRERA-JARAMILLO et al., 2022; DUARTE; PARENTE; LINHARES, 2013; MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ et al., 2015; OCTAVIO MERINO-CHARREZ, 2021).

## 2.4 Prevenção

A prevenção da *E. canis* baseia-se em ações profiláticas, já que se trata de uma doença zoonótica e infectocontagiosa. As estratégias de controle visam focar no vetor, o carrapato (*Rhipicephalus sanguineus*), utilizando acaricidas de uso tópico ou sistêmico, tais como isoxazolinas, Fipronil/S-metopreno, imidacloprid/permetrina e Amitraz, além de colares com inseticidas. Carrapaticidas também podem ser aplicados no ambiente, uma vez que apenas 5% da população de carrapatos está presente no cão e os 95% restantes estão no ambiente. É importante evitar lugares com alta infestação de carrapatos e realizar a remoção manual de carrapatos. No entanto, ainda não se sabe com certeza quanto tempo um carrapato precisa estar fixado para transmitir a doença. (GREENE, 2015; RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2018).

A ehrlichiose ainda não possui uma vacina, porém tem diferentes ensaios em desenvolvimento (NAMBOOPPHA et al., 2022; RUDOLER et al., 2012). para prevenção e a terapia com antibióticos não é indicada para pacientes que foram recentemente picados pelo carrapato e não apresentam sinais clínicos ou não possuem um diagnóstico

definitivo. Por isso, é importante que os tutores adotem medidas preventivas para evitar a transmissão de doenças zoonóticas, uma vez que os cães podem atuar como reservatórios da *E. canis* e de outras doenças infectocontagiosas (DANILO MARQUES, 2020).

Entre as medidas preventivas recomendadas para quem está exposto em lugares com alta infestação de carrapatos, estão o uso de repelentes, a verificação do corpo, cabelo e roupas em busca de carrapatos e a remoção imediata do carrapato caso haja picada, a fim de reduzir o risco de infecção, já que o carrapato precisa permanecer no hospedeiro por um período que pode variar de 2 a 24 horas para uma transmissão efetiva (CDC, 2019; DOMINGOS et al., 2013; ISMAIL; , KAREN C. BLOCH, 2010).

### 3 Artigo

**Prevalência molecular de *Ehrlichia canis* em cães atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.  
Molecular prevalence of canine ehrlichiose**

Daniel Felipe Buitrago Linares; Kauê Rodriguez Martins; Paolla Renata Dallman; Sthéphani Alves Branco Camargo; Éverton Fagonde da Silva; Fabio Pereira Leivas Leite; Marlete Brum Cleff; Rodrigo Casquero Cunha.

Submetido á revista Veterinary Research Communications.

1 Molecular prevalence of *Ehrlichia canis* in treated canines at the veterinary clinical hospital of  
 2 Universidade Federal de Pelotas.

3 Daniel Felipe Buitrago Linares<sup>1</sup>; Kauê Rodriguez Martins<sup>1</sup>; Paolla Renata Dallman<sup>1</sup>; Sthéphani  
 4 Alves Branco Camargo<sup>2</sup>; Éverton Fagonde da Silva<sup>3</sup>; Fabio Pereira Leivas Leite<sup>4</sup>; Marlete Brum  
 5 Cleff<sup>3</sup>; Rodrigo Casquero Cunha<sup>3\*</sup>.

6

7 <sup>1</sup> Postgraduate Program in Veterinary Medicine (PPGV), Faculty of Veterinary Medicine, Federal  
 8 University of Pelotas (UFPel), University Campus, S/N - CEP 96160-000, Capão do Leão, RS -  
 9 Brazil. Contact email: ppgveterinariaufpel@gmail.com.

10 <sup>2</sup> Postgraduate Program in Parasitology and microbiology (PPGMPAR), Federal University of  
 11 Pelotas (UFPel), University Campus, S/N-CEP 96160-000, Capão do Leão, RS - Brazil.

12 <sup>3</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas (UFPel), University Campus,  
 13 S/N - CEP 96160-000, Capão do Leão, RS - Brazil.

14 <sup>4</sup> Center for Technological Development - Biotechnology Center, Federal University of Pelotas  
 15 (UFPel), University Campus, S/N - CEP 96160-000, Capão do Leão, RS - Brazil.

16 \*Corresponding author: rodrigocunha\_vet@hotmail.com, No. Orcid: 0000-0003-0145-0321,  
 17 Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS,

Brazil.

18 Contributing authors: daniel.buitrago.linares@unillanos.edu.co, kauerodriguez@gmail.com,  
 19 dallmannpaola@gmail.com, sthephanicamargo@gmail.com, fagondee@gmail.com,  
 20 fleivasleite@gmail.com, marletecleff@gmail.com.

21 These authors contributed equally to this work.

22

23

### Abstract

24 *Ehrlichia canis* is a pathogen that causes a multisystemic disease in canines of all ages and genders.  
 25 It has the potential to be zoonotic, meaning it can be transmitted from animals to humans and cause  
 26 health issues in both. The purpose of this study was to determine the molecular prevalence of *E.*  
 27 *canis* in a population of canines with varying clinical conditions from the Hospital Clinicas  
 28 Veterinária (HCV) of the Universidade Federal de Pelotas (UFPel), using the polymerase chain  
 29 reaction (PCR) technique. To achieve this, 95 blood samples were collected from dogs that  
 30 presented for evaluation at the HCV and sent to the Laboratorio de Biologia Molecular Veterinaria

31 (LabMol-Vet) for DNA extraction. The samples were assessed for quality before being analyzed  
32 by Nested PCR. Of the total samples evaluated, *E. canis* DNA was detected in 16 out of 95,  
33 resulting in a prevalence of 16.84% at HCV-UFPel. The mean age of the animals detected was 7.86  
34  $\pm$  5.13 years, with the youngest being 0.8 years old and the oldest being 15.8 years old. This study  
35 is one of the few molecular prevalence studies conducted in Rio Grande do Sul.

36 Keywords: Dogs; Zoonosis; Hemoparasites; Transmitted disease.

37

38

39

### Introduction

40 Canine ehrlichiosis is a disorder caused by different species of *Ehrlichia*, such as *Ehrlichia canis*,  
41 *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii*. These pathogens can cause coinfections that are  
42 transmitted by ticks (Dumler et al., 2001; Gutiérrez & Pérez-Ybarra, 2016). *Ehrlichia canis*, like  
43 the other species, is an intracellular Gram-negative bacterium that has an affinity for leukocytes,  
44 monocytes, and lymphocytes (Nelson, 2015).

45 *Ehrlichia canis* has a worldwide distribution and has been detected in Asia, Africa, Europe, and  
46 the Americas. According to the literature, it is more prevalent in tropical and subtropical areas  
47 (Dumler et al., 2001; Gutiérrez & Pérez-Ybarra, 2016). In Brazil, it has been reported in all states  
48 of the country and has a higher prevalence in temperate climate states than in cold states (Vieira et  
49 al., 2011). There have been reports of the presence of *E. canis* in Rio Grande do Sul (Saito et al.,  
50 2008; Barcellos Krause et al., 2015).

51 The main vector that transmits this bacterium is the tick *Rhipicephalus sanguineus*, which becomes  
52 infected through a bite. After that, the incubation period of the disease lasts from 8 to 20 days. The  
53 disease has different phases: acute, subclinical, and chronic (HARRUS et al., 1998). The clinical  
54 signs are unspecific but can be differentiated by characteristic clinical and hematologic symptoms.  
55 These signs include fever, anorexia, depression, weight loss, edema, hepatomegaly, splenomegaly,  
56 lymphadenopathy, coagulation, cardiac disorders, respiratory problems, neurological symptoms,  
57 and ophthalmological issues. These multiple disorders can lead to the death of the animal. In the

58 subclinical phase, there are no evident clinical signs (HARRUS et al., 1998; PATRICIA; DELZY,  
59 2019).

60 The diagnostic involves multiple steps to identify the disease, including a clinical exam to identify  
61 clinical signs, as well as hematologic and biochemical disorders present during the course of the  
62 disease. Currently, there are different laboratory tests available to aid in the diagnosis, with  
63 variations in specificity and sensitivity. These tests include blood cytology, cell cultures, detection  
64 of antibodies, and molecular techniques such as PCR, which is considered the gold standard for  
65 Ehrlichiosis diagnosis. PCR allows for the detection of the agent's DNA in blood cells and multiple  
66 target organs, leading to a rapid diagnosis and reducing false positives. There are also techniques  
67 such as sequencing that can identify the circulating strain. It is important to understand the behavior  
68 of the disease because studies have reported that clinical signs can vary depending on the  
69 circulating strain of the disease (KEYSARY et al., 2001; OCTAVIO MERINO-CHARREZ, 2021;  
70 WEN et al., 1997).

71 In order to differentiate between various pathogens that may cause similar clinical signs, it is  
72 necessary to implement diagnostic techniques that can aid in the diagnosis of the disease and  
73 provide epidemiological information to local clinicians. Therefore, the objective of this study is to  
74 determine the prevalence and identify the circulating species of *E. canis* in canines seen at the  
75 veterinary clinic hospital of the Universidade Federal de Pelotas using PCR.

## 76 **Material and Methods**

77 This study was conducted between May and December of 2022 at HCV/UFPEL, located in Capão  
78 de Leão, Rio Grande do Sul, at an altitude of 21 meters above sea level. This region experiences  
79 warm temperatures in the months of October, November, January, February, and March, and cold  
80 temperatures in the months of April, May, June, July, August, and September (CEDAR LAKE  
81 VENTURES, 2023). The sample size was determined based on the last prevalence report for the  
82 region (VIEIRA et al., 2011), and a total of 95 blood samples were collected from dogs in tubes  
83 containing EDTA. The dogs were brought to the HCV/UFPEL by their owners for medical  
84 attention.

85 Blood samples were collected and taken to the Laboratório de Biologia Molecular Veterinária  
86 (LaBMol-Vet) for DNA extraction. The extraction was performed using the commercial

87 PetNAD™ Nucleic Acid Co-Prep Kit (GeneReach Biotechnology Corporation, Taichung City,  
88 Taiwan R.O.C) according to the manufacturer's instructions. The final product was diluted in 50 µl  
89 of buffer, and its quality was assessed using the NanoDrop® UV light spectrophotometer (Life  
90 Technologies Brasil LTDA, Sao Paulo, SP, Brazil) for purity and concentration. It was then  
91 subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis to check for degradation and stored at -20 °C.

92 The PCR was selected and standardized based on previous studies by other authors (Alves &  
93 Luciano, 2006; Duarte et al., 2013) using genus and species-specific oligonucleotides for the 16S  
94 rRNA gene. The primer set Ebr6 (5'-CGA ACG CTG GCG GCA AG-3') and Ebr5 (5'-GGA GTG  
95 CTT AAC GCG TTA G-3') were used to detect *Ehrlichia* spp., producing an amplicon of 840 bp  
96 by PCR. Species-specific reactions were performed using the primer set Ebr1 (5'-CCT CTG GCT  
97 ATA GGA AAT TG-3') (sense) and Ebr5 (5'-GGA GTG CTT AAC GCG TTA G-3') (antisense)  
98 to amplify an amplicon of 765-bp of the *E. canis* 16S rRNA gene.

99 Nested PCR was performed using a GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler (PerkinElmer,  
100 Norwalk, CT, USA). The first reaction was genus-specific, with an initial cycle at 94 °C for 2 min,  
101 followed by 35 cycles of 94 °C for 20 s, 53 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, and a final cycle of  
102 72 °C for 5 min. The second reaction was species-specific and used the same temperature  
103 conditions, but the number of cycles was increased to 40 cycles. The samples were subjected to  
104 electrophoresis on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide (10 µg/mL).  
105 Subsequently, they were visualized under a UV transilluminator, and the molecular weights were  
106 determined using a marker ladder (100 bp-500 µL, Ludwig Biotecnologia®, Alvorada, RS, Brazil).

107 The database used for this study was created in Microsoft® Excel® (Microsoft 365 MSO, V. 2303  
108 compilation 16.0.16227.20202), including dynamic tables created among individuals with detected  
109 and non-detected *Ehrlichia* DNA, sex, age, and hemogram, serum biochemistry, and reasons for  
110 consultation. Since non-parametric categorical variables were used, the chi-squared test was  
111 applied using R. v. 4.2.2 (2022-10-31 ucrt) to identify differences between variables of detected  
112 and non-detected individuals in relation to laboratory analyses and reasons for consultation.  
113 Additionally, some descriptive statistics data were found, such as mean, standard deviation,  
114 standard error, maximum and minimum values of the variable in relation to age, sex, and detected  
115 and non-detected individuals.



## 116 **Results**

117 During the study period in 2022, a total of 95 animal samples were analyzed at HCV/UFPEL using  
118 Nested PCR, which detected a molecular prevalence of the pathogen *E. canis* in 16.84% (16/95) of  
119 the animals. The amplification of the 16S rRNA gene produced both genus-specific (840 bp) and  
120 species-specific (765 bp) amplicons.

121 A total of 95 dogs were sampled, of which 49 were females and 45 were males, with reported ages  
122 ranging from 1.1 to 15.8 years for females and 0.8 to 16.6 years for males, and mean ages of  $8.27$   
123  $\pm 3.85$  years and  $7.82 \pm 4.34$  years, respectively. The range of ages for all 95 animals was 0.8 to 16  
124 years. Among the positive animals, the average age was  $7.86 \pm 5.13$  years, with an age range  
125 between 1 and 15.8 years, and no significant differences were found between males and females  
126 ( $p > 0.05$ ) (see Tables 1 and 2).

127 No significant differences were found in the hematological variables of anemia, neutrophilia,  
128 eosinophilia, monocytopenia, lymphopenia, thrombocytosis, and thrombocytopenia between  
129 negative and positive animals ( $p > 0.05$ ). However, significant differences were found in the  
130 lymphocyte counts (lymphocytosis) ( $p < 0.05$ ). In terms of the biochemical parameters, no  
131 significant differences were observed

## 132 **Discussion**

133 Different studies have been conducted worldwide to assess the prevalence of *E. canis*, with most  
134 of them comparing serological prevalence and blood cytology detection and determining PCR as  
135 the gold standard test for detection (CABRERA-JARAMILLO et al., 2022; MARÍA DEL  
136 CARMEN MARTÍNEZ et al., 2015; OCTAVIO MERINO-CHARREZ, 2021; ROJAS et al.,  
137 2013). In Rio Grande do Sul, immunochromatography has been used to study the prevalence of *E.*  
138 *canis*, resulting in a prevalence of 4.8% (SAITO et al., 2008). Studies have also been conducted in  
139 the Pelotas region to detect the presence of *E. canis* through cytology, IFI, and PCR (BARCELLOS  
140 KRAUSE et al., 2015; FERRAZ et al., 2021). This study is the first to investigate the molecular  
141 prevalence of *E. canis* in Pelotas, RS, thereby contributing to a better understanding of the disease.

142 In Rio Grande do Sul, despite the importance of *E. canis* as a zoonosis, there is a lack of prevalence  
143 studies. The pathogen has gained greater relevance due to its potential to infect humans, with

144 positive infections reported in the literature (STIVAL et al., 2021). In Brazil, strains of *E. canis*  
145 identical to those found in humans have been detected in dogs (EDWARD HUERTO-MEDINA,  
146 2015), highlighting the need for research on the presence, distribution, and prevalence of this  
147 disease. Such studies are important to raise awareness among clinicians and pet owners, aiding in  
148 differential diagnoses and reinforcing preventive care to decrease the risk of infection.

149 In this study, it was found that out of 95 canines evaluated, 16 (16.84%) were positive for *E. canis*  
150 by Nested-PCR. In a previous study, the presence of *E. canis* was detected using PCR and IFI  
151 techniques in a population of dogs suspected of hemoparasitosis (Barcellos, 2015). Of the animals  
152 evaluated in that study, 37.1% (33/89) were found positive by PCR, and 21.4% (19/89) were  
153 positive by IFI technique. However, the results may vary depending on the stage of the disease,  
154 and tests carried out in the early days after infection may result in false negatives (Barcellos Krause  
155 et al., 2015).

156 The manual blood cytology method has been reported to have a low success rate in detecting the  
157 presence of *E. canis*, with only 4% success in some studies (Ferraz et al., 2021). This may be due  
158 to the method's low sensitivity in detecting the pathogen during the initial phase of the disease  
159 when bacteremia is low or when the pathogen multiplies in the lymphoid organs. False negatives  
160 may also occur in chronic cases due to the disappearance of morulas. As a result, PCR is considered  
161 the Gold Standard test for detecting *E. canis* by detecting the pathogen's DNA, with greater  
162 specificity and sensitivity than other techniques developed. In fact, studies have reported the  
163 detection of *E. canis* DNA without the presence of antibodies in serology (OCTAVIO MERINO-  
164 CHARREZ, 2021).

165 To differentiate between *Ehrlichia* species and *Anaplasma*, it is important to use specific diagnostic  
166 tools. Immunoenzymatic techniques, although useful, can cross-react with different *Ehrlichia*  
167 species, including *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *E. canis*, as well as with *Anaplasma platys*.  
168 However, Nested-PCR allows for the identification of specific DNA fragments and can be used to  
169 research specific amplicons by sequencing to identify the species of *Ehrlichia* spp. or other  
170 pathogens, such as *Anaplasma* spp. (LAIA SOLANO-GALLEGO, JOAN LLULL; BARBARA  
171 HEGARTY, 2006; O'CONNOR et al., 2006; SAINZ et al., 2015).

172 Finally, the molecular prevalence found in this study was higher than the serum prevalence reported  
173 previously by Saito et al. (2008). This difference in prevalence may be attributed to the type of  
174 technique used, as well as the fact that the study was conducted in a veterinary hospital where dogs  
175 are often diagnosed and treated for various diseases. Further studies are needed to identify the  
176 specific strain of *Ehrlichia* circulating in the region through DNA sequencing. This information  
177 could be valuable in understanding the behavior of the bacteria and how it compares to other strains  
178 already reported, which could help identify the potential risks of infection for both the dog and  
179 human populations. Additionally, our team plans to implement ELISA techniques, specifically  
180 using protein GP19, to expand the study to other populations of dogs in the region.

#### 181 **The authors thank to:**

182 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de  
183 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Organization of American States,  
184 Universidade Federal de Pelotas for allowing access to the animal samples and laboratories.

#### 185 **Ethics statement**

186 Given that this study is based on routine laboratory samples, a formal ethics report is not required.  
187 However, we will ensure that the samples were collected in accordance with established ethical  
188 guidelines, ensuring that patients' dignity and rights were respected and that risks were minimized.

#### 189 **Competing interests**

190 The authors have no conflict of interest to declare.

191

#### 192 **Reference**

193 ALVES, LUCIANO; GUIDO, F. C. ; L. :NILO S. T. C. Avaliação De Iniciadores E Protocolo  
194 Para O Diagnóstico Da Pancitopenia Tropical Canina Por Pcr. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6,  
195 n. 1, p. 49–54, 2006.

196 DUARTE, S. C.; PARENTE, J. A.; LINHARES, G. F. C. DIAGNÓSTICO molecular de  
197 *Ehrlichia canis* EM CÃES de GOIÂNIA, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, p.  
198 30–41, 2013.

- 199 DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and  
200 Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of Ehrlichia with  
201 Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new  
202 species combi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n.  
203 6, p. 2145–2165, 2001.
- 204 GUTIÉRREZ, C. N.; PÉREZ-YBARRA, L. Ehrlichiosis Canina | Canine Ehrlichiosis. **Saber**, v.  
205 28, n. 4, p. 641–665, 2016.
- 206 LAIA SOLANO-GALLEGO, JOAN LLULL, M. O.; BARBARA HEGARTY, E. B. Review  
207 article West Nile virus infection of horses. v. 37, p. 231–244, 2006.
- 208 NELSON, R. W. ;. C. G. C. **Medicina Interna De Pequenos Animais - Nelson Couto 2a**  
209 **edição-1.pdf**. [s.l: s.n.].
- 210 O'CONNOR, T. P. et al. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot  
211 analysis, and a commercially available ELISA for detection of Ehrlichia canis antibodies in  
212 canine sera. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 206–210, 2006.
- 213 SAINZ, Á. et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in  
214 Europe. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2015.
- 215 VIEIRA, R. F. DA C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**  
216 **Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01–12, 2011.
- 217

**Table 1.** Age-related statistics for individuals detected and not detected."

<b>Result</b>	<b>&lt;1 years</b>	<b>&gt;6 years</b>	<b>1 - 6 years</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>P value</b>
D	0 (0%)	9 (56.25%)	7 (43.75%)		
ND	1 (1.27%)	56 (70.89%)	22 (27.85%)	72.39	0.22
Total	1 (1.05%)	65 (68.42%)	29 (30.53%)		

D: Detected, ND: No detected, X<sup>2</sup>: chi-squared, P value: (p<0.05).

**Table 2.** Descriptive statistics of age for individuals detected and not detected.

<b>Results</b>	<b>Age.M</b>	<b>Age.SD</b>	<b>Age.SE</b>	<b>Age.MAX</b>	<b>Idade.MIN</b>
D	7.86	5.13	1.28	15.8	1.00
ND	8.09	3.87	0.44	16.6	0.80

Standard deviation, SE: standard error, MAX: maximum and MIN: minimum

**Table 3.** Relation of PCR detection positives and negatives with characteristics of the red and white series.

<b>Anemy</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>	<b>NR</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	12	1	3	16	75,00	18,75	6,25		
<b>ND</b>	58	5	16	79	73,42	20,25	6,33	0,47	0,99
<b>Total</b>	70	6	19	95	73,68	20,00	6,32		
<b>Hypochromia</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>	<b>NR</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	14	1	1	16	87,50	6,25	6,25		
<b>ND</b>	68	5	6	79	86,08	7,59	6,33	0,04	0,98
<b>Total</b>	82	6	7	95	86,32	7,37	6,32		
<b>Thrombocytopenia</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>	<b>NR</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	12	1	3	16	75,00	18,75	6,25		
<b>ND</b>	65	5	9	79	82,28	11,39	6,33	0,66	0,91
<b>Total</b>	77	6	12	95	81,05	12,63	6,32		
<b>Thrombocytose</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	14	1	1	16	87,50	6,25	6,25		
<b>ND</b>	71	5	3	79	89,87	6,33	3,80	0,20	0,91
<b>Total</b>	85	6	4	95	89,47	6,32	4,21		
<b>Hyperproteinemia</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>	<b>NR</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	13	1	2	16	81,25	12,50	6,25		
<b>ND</b>	67	5	7	79	84,81	8,86	6,33	0,21	0,90
<b>Total</b>	80	6	9	95	84,21	9,47	6,32		
<b>Leukopenia</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>	<b>NR</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>

<b>D</b>	14	1	1	16	87,50	6,25	6,25		
<b>ND</b>	74	5	0	79	93,67	0,00	6,33	4,99	0,08
<b>Total</b>	88	6	1	95	92,63	1,05	6,32		
<b>Neutrophilia</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	<b>11</b>	1	4	16	68,75	6,25	25,00		
<b>ND</b>	<b>53</b>	5	21	79	67,09	6,33	26,58	0,02	0,99
<b>Total</b>	<b>64</b>	6	25	95	67,37	6,32	26,32		
<b>Neutropenia</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	15	1	0	16	93,75	6,25	0,00		
<b>ND</b>	<b>74</b>	2	3	79	93,67	2,53	3,80	1,19	0,55
<b>Total</b>	<b>89</b>	3	3	95	93,68	3,16	3,16		
<b>Monocytosis</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	<b>13</b>	1	2	16	81,25	6,25	12,50	1255,00	
<b>ND</b>	<b>69</b>	6	4	79	87,34	7,59	5,06		0,53
<b>Total</b>	<b>82</b>	7	6	95	86,32	7,37	6,32		
<b>Monocytopenia</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	<b>15</b>	1		16	93,75	6,25	0,00		
<b>ND</b>	<b>73</b>	5	1	79	92,41	6,33	1,27	0,21	0,90
<b>Total</b>	<b>88</b>	6	1	95	92,63	6,32	1,05		
<b>Eosinophilia</b>									
<b>Results</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>Total</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>P</b>	<b>X2</b>	<b>P value</b>
<b>D</b>	<b>14</b>	1	1	16	87,50	6,25	6,25		
<b>ND</b>	<b>66</b>	5	8	79	83,54	6,33	10,13	0,24	0,89
<b>Total</b>	<b>80</b>	6	9	95	84,21	6,32	9,47		
<b>Linfocitose</b>									



Results	N	NR	Total	N	NR	X2	P value
D	15	1	16	93,75	6,25		
ND	74	5	79	93,67	6,33	0.00	0,99
Total	89	6	95	93,68	6,32		

#### Linfopenia

Results	N	NR	P	Total	N	NR	P	x2	P value
D	14	1	1	16	87,50	6,25	6,25		
ND	66	5	8	79	83,54	10,13	6,33	0,24	0,89
Total	80	6	9	95	84,21	9,47	6,32		

D: Detected, ND: No detected, X<sup>2</sup>: chi- squared, P value: (p<0.05), No Reported, P:

Presented, N: Normal

**Table 4.** Relation of detected positives and negatives with biochemical disorders.

<b>ALT</b>											
<b>Results</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>Total</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
											<b>Value</b>
<b>D</b>	1	1	13	1	16	6,25	6,25	81,25	6,25		
<b>ND</b>	5	4	64	6	79	6,33	5,06	81,01	7,59	0,07	1,00
<b>Total</b>	6	5	77	7	95	6,32	5,26	81,05	7,37		

  

<b>AST</b>										
<b>Results</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>Total</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>Value</b>	<b>P</b>
<b>D</b>	0	15	1	16	0,00	93,75	6,25			
<b>ND</b>	1	73	5	79	1,27	92,41	6,33	0,21	0,90	
<b>Total</b>	1	88	6	95	1,05	92,63	6,32			

  

<b>Hipoalbuminea</b>										
<b>Results</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>Total</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>Value</b>	<b>P</b>
<b>D</b>	0	15	1	16	0,00	93,75	6,25			
<b>ND</b>	1	73	5	79	1,27	92,41	6,33	0,21	0,90	
<b>Total</b>	1	88	6	95	1,05	92,63	6,32			

  

<b>Ureia</b>											
<b>Results</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>Total</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>NR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
											<b>Value</b>
<b>D</b>	2	0	13	1	16	12,50	0,00	81,25	6,25		
<b>ND</b>	6	1	66	6	79	7,59	1,27	83,54	7,59	0,62	0,89
<b>Total</b>	8	1	79	7	95	8,42	1,05	83,16	7,37		

  

<b>Creatinina</b>										
-------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Results											P	
	A	D	N	NR	Total	A	D	N	NR	X <sup>2</sup>	Value	
<b>D</b>	2	0	13	1	16	12,50	0,00	81,25	6,25			
<b>ND</b>	4	1	69	5	79	5,06	1,27	87,34	6,33	1,43	0,70	
<b>Total</b>	6	1	82	6	95	6,32	1,05	86,32	6,32			

### Trigliceridos

Results											P	
	A	D	N	NR	Total	A	D	N	NR	X <sup>2</sup>	Value	
<b>D</b>	1	0	14	1	16	6,25	0,00	87,50	6,25			
<b>ND</b>	2	1	73	3	79	2,53	1,27	92,41	3,80	1,01	0,80	
<b>Total</b>	3	1	87	4	95	3,16	1,05	91,58	4,21			

### FA

Results								P	
	A	N	NR	Total	A	N	NR	X <sup>2</sup>	Value
<b>D</b>	2	13	1	16	12,50	81,25	6,25		
<b>ND</b>	6	67	6	79	7,59	84,81	7,59	0,43	0,81
<b>Total</b>	8	80	7	95	8,42	84,21	7,37		

D: Detected, ND: No detected, X<sup>2</sup>: chi- squared, P value: (p<0.05), No Reported, A:

High, N: Normal

#### **4 Considerações finais**

No ano de 2022, foi identificada uma prevalência molecular de 18,29% de *E. canis* na população de cães atendidos no HCV/UFPel, sem distinção de sexo e idade. Contudo, é necessário expandir o alcance desta pesquisa, uma vez que não há relatos recentes sobre a prevalência da doença na região. A identificação da cepa circulante é crucial para compreender melhor o comportamento da doença. Portanto, futuros estudos mais amplos na região do Rio Grande Sul são essenciais para obter informações valiosas sobre a epidemiologia da ehrlichiose na área.

## Referencias

AVENDAÑO, J. et al. La Ehrlichiosis canina : Ehrlichia canis ( caso clínico ). 2017.

AZIZ, M. U. et al. Ehrlichiosis in Dogs: A Comprehensive Review about the Pathogen and Its Vectors with Emphasis on South and East Asian Countries. **Veterinary sciences**, 2023.

BARCELLOS KRAUSE, L. E. et al. Parasitologic, Serological and Molecular Diagnostic of Ehrlichia canis and Babesia canis in a Veterinary Hospital in Southern Brazil. **Sch J Agric Vet Sci**, v. 2, n. 5, p. 337–341, 2015.

BONILLA, L. M. C. et al. Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de Ehrlichia spp., en caninos de Medellín (Colombia). (Implementation of a PCR-based method for the diagnosis of Ehrlichia spp, in canine in Medellín (Colombia)\*). **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 7, n. 2, p. 38–46, 2014.

BORGES-PEREIRA, J. et al. Epidemiologia da doença de Chagas em quatro localidades rurais de Jaguaruana, Estado do Ceará: soroprevalência da infecção, parasitemia e aspectos clínicos TT - Epidemiology of Chagas disease in four rural localities in Jaguaruana, State of Ceará: seropr. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 345–351, 2008.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566–571, 2009.

BUHLES, W. C. J.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical canine pancytopenia: Clinical, hematologic, and serologic response of dogs to Ehrlichia canis infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **The Journal of infectious diseases**, v. 130, n. 4, p. 357–367, out. 1974

CABRERA-JARAMILLO, A. et al. Prevalence of Ehrlichia canis and Hepatozoon canis in sheltered dogs in southern Aburrá Valley, Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 35, n. 2, p. 82–92, 2022. CDC. No Title. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ehrlichiosis/prevention/index.html>>. CESAR, M. D. F. G. OCORRÊNCIA DE Ehrlichia canis EM CÃES SINTOMÁTICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA E ANÁLISE DE

VARIABILIDADE EM REGIÕES GENÔMICAS DE REPETIÇÃO. **Dissertação**, p. 57, 2008.

CODNER, E. C.; MASLIN, W. R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. **American journal of veterinary research**, v. 53, n. 3, p. 294–299, mar. 1992.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A. DE; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 191, 2004.

DE CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73–86, 2004.

DE OLIVEIRA, R. S. et al. Recombinant gp19 as a potential antigen for detecting anti-Ehrlichia canis antibodies in dog sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 24, n. 3, p. 290–297, 2015.

DE PÁDUA COSTA, M. et al. Bioquímica sérica de cães infectados por Ehrlichia canis, Anaplasma platys e Leishmania sp. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. 1, 2015.

DOMINGOS, A. et al. Review Case Report Article Approaches towards tick and tick-borne diseases control. v. 46, n. 3, p. 265–269, 2013.

DUARTE, S. C. PERFIL DO PARASITISMO SANGUÍNEO POR ANÁLISES MOLECULARES ENVOLVENDO Babesia, Ehrlichia e Hepatozoon EM CÃES SINTOMÁTICOS NA ÁREA METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS. **Tese**, 2010.

DUARTE, S. C.; PARENTE, J. A.; LINHARES, G. F. C. DIAGNÓSTICO molecular de Ehrlichia canis EM CÃES de GOIÂNIA, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, p. 30–41, 2013.

FERRAZ, A. et al. Prevalência de Hemoparasitoses em Cães na Região Sul do Estado do Rio Grande do Sul , Brasil Prevalence of Hemoparasitosis in Dogs in the South Region of the State of Rio Grande do Sul ,. **Ensaios e ciencia**, v. v. 25 n. 5, p. 609–612, 2021.

FOURIE, J. J. et al. Transmission of Ehrlichia canis by Rhipicephalus sanguineus ticks feeding on dogs and on artificial membranes. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 595–603, 2013.

FRANCO, M.; ADAME, J.; DZUL, K. Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 5, p. 650–655, 2019.

FRUET, C. L. Erliquiose em cães. p. 28, 2005.

- GREENE. Doencas infecciosas em caes e gatos. v. 148, p. 148–162, 2015.
- GROVES, M. G. et al. Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). **American journal of veterinary research**, v. 36, n. 7, p. 937–940, jul. 1975.
- GUTIÉRREZ, C. N.; PÉREZ-YBARRA, L. Ehrlichiosis Canina | Canine Ehrlichiosis. **Saber**, v. 28, n. 4, p. 641–665, 2016.
- HARRUS, S. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, n. 1–2, p. 13–20, 1995.
- HARRUS, S. et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 66, n. 3–4, p. 241–249, 1996.
- HARRUS, S. et al. Canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v. 141, n. 14, p. 360–363, 1997.
- HARRUS, S. et al. Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection with Ehrlichia canis. v. 36, n. 1, p. 73–76, 1998a.
- HARRUS, S. et al. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 15–27, 1998b.
- HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292–296, 2011.
- HARRUS, S.; WANER, T.; NEER, T. M. Ehrlichia canis infection. **Infectious diseases of the dog and cat**, p. 227–238, 1 jan. 2012.
- HILDEBRANDT, P. K. et al. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). **American journal of veterinary research**, v. 34, n. 10, p. 1309–1320, out. 1973.
- HUXSOLL, D. L. et al. Epizootiology of tropical canine pancytopenia. **Journal of wildlife diseases**, v. 6, n. 4, p. 220–225, 1970.
- ISMAIL, N.; , KAREN C. BLOCH, AND J. W. M. NIH Public Access. **Clin Lab Med**, v. 30, n. 1, p. 261–292, 2010.
- JERE W. MCBRIDE.; & DAVID H. WALKER, M. D. Molecular and Cellular Pathobiology of Ehrlichia Infection: Targets for New Therapeutics and Immunomodulation Strategies. **Mol. Med.**, 2013.

JOICE LARA MAIA FARIA., ET AL. Ehrlichia canis morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 2961, p. 98–102, 2010.

JULIANA PIERANGELI FONSECA, CHRISTIAN HIRSCH, A. M. G. Erliquiose monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 63, n. 2, p. 127, 2017.

KAKOMA, I. et al. Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine Ehrlichiosis. **Infection and Immunity**, v. 20, n. 1, p. 242–247, 1978.

KEYSARY, A. et al. Cultivation of Ehrlichia canis in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 6, p. 521–523, 2001.

KOMNENOU, A. A. et al. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis ( Ehrlichia canis ): a retrospective study of 90 cases. **Veterinary Ophthalmology**, p. 137–142, 2007.

KOUTINAS, C. K. et al. Serum cardiac troponin I concentrations in naturally occurring myelosuppressive and non-myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 2, p. 259–261, 2012.

KRAWCZAK, F. DA S. et al. Serological survey on Ehrlichia sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 21, n. 4, p. 415–417, 2012.

LEIVA, M.; NARANJO, C.; PEÑA, M. T. Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis : a retrospective study in dogs from Barcelona , Spain. **Veterinary Ophthalmology**, p. 387–393, 2005.

LOCATELLI, C. et al. Short Communications Pulmonary hypertension associated with Ehrlichia. **Veterinary record**, 2012.

LÓPEZ ROMERO, A. P.; SOLER-TOVAR, D. Ehrlichiosis canina y su contextualización en Colombia. **Fondo Editorial Biogénesis**, p. 63–82, 2020.

M.E. MYLONAKIS. ET AL. Case Report. n. Fig 1, p. 633–638, 2010.

MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ, A. et al. A serological and molecular survey of ehrlichia canis in dogs from a community in Aragua State, Venezuela. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v. 26, n. 4, p. 648–656, 2015.

MCCLURE, J. C. et al. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. **Antimicrobial Agents and**



**Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5012–5020, 2010.

MELO, A. M.; KELEN, A.; LIMA, F. Ocorrência de ehrlichiose canina em mossoró. v. 14, n. 1, p. 53–57, 2004.

MOLINA, C.; SEÑARIS, J. C. Los reptiles del Delta del Orinoco , Venezuela. **Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales 2004**, v. 2004, p. 235–264, 2004.

MOUMÈNE, AMAL, D. F. M. Ehrlichia ' s molecular tricks to manipulate their host cells. v. 18, p. 172–179, 2016.

NAIR, A. D. S. et al. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with Ehrlichia canis , E . chaffeensis , Anaplasma platys and A . phagocytophilum. p. 1–21, 2016.

NAMBOOPPHA, B. et al. Recombinant Ehrlichia canis GP19 Protein as a Promising Vaccine Prototype Providing a Protective Immune Response in a Mouse Model. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, 2022.

O'CONNOR, T. P. et al. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of Ehrlichia canis antibodies in canine sera. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 206–210, 2006.

OCTAVIO MERINO-CHARREZ, E. AL. Detección molecular de Ehrlichia canis y Anaplasma phagocytophilum y alteraciones hematológicas de perros infectados Molecular detection of Ehrlichia canis and Anaplasma phagocytophilum and hematological changes of infected dogs INTRODUCCIÓN La ehrlichios. p. 1–16, 2021.

PUENTES, C. PROBLEMÁTICA DE LA EHRlichiosis CANINA VISTA DESDE EL ASPECTO TEÓRICO Y EL ASPECTO CLÍNICO EN UNA CLÍNICA VETERINARIA DE BOGOTÁ (CENTRAL DE URGENCIAS VETERINARIAS). 2016.

RIKIHISA, Y. Molecular Pathogenesis of Ehrlichia chaffeensis Infection. 2015.

RUDOLER, N. et al. Evaluation of an attenuated strain of Ehrlichia canis as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 226–233, 2012.

SÁ, R. DE et al. Erliquiose canina: Relato de caso. **Pubvet**, v. 12, n. 6, p. 1–6, 2018.

SANTIAGO MONSALVE, B. et al. Pharmacokinetics and Adverse Effects of Doxycycline in the Treatment of Ehrlichiosis: Theoretical Foundations for Clinical Trials in Canines. **Revista MVZ Cordoba**, v. 22, p. 6062–6074, 2017.

SILVA, I. A. P. Erliquiose Canina. **Revista Científica de Medicina Veterinaria**, v. 151, p. 10–17, 2015.

SIMPSON, C. F. Relationship of Ehrlichia canis-Infected Mononuclear Cells to Blood Vessels of Lungs<sup>1</sup>. v. 10, n. 3, p. 590–596, 1974.

SMITH, R. D. et al. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 6, p. 1216–1221, 1975.

STIVAL, C. et al. Eriquiiose monocitotrópica canina: Revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2021.

THOMSON, K. et al. A new TaqMan method for the reliable diagnosis of Ehrlichia spp. in canine whole blood. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2018.

UENO, T. E. H. et al. Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 03, p. 57–61, 2009.

UPADHYAY, A. et al. An innovative and user-friendly smartphone-assisted molecular diagnostic approach for rapid detection of canine vector-borne diseases. **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1799–1809, 2021.

VELOSO, J. F. et al. Alterações do trato uveal associados à Eriquiiose Monocítica Canina (EMC). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e34010212661, 2021.

VIEIRA, R. F. DA C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01–12, 2011.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 75–98, 1991.