

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO DA NATUREZA

Suyane Costa Bordim

**Diagnóstico, caracterização molecular e epidemiologia da Erliquiose Monocítica Canina
na Zona da Mata Mineira, Brasil, e investigação do nicho fundamental da
distribuição mundial das linhagens de *Ehrlichia canis***

Juiz de Fora

2024

Suyane Costa Bordim

Diagnóstico, caracterização molecular e epidemiologia da Erliquiose Monocítica Canina na Zona da Mata mineira, Brasil, e investigação do nicho fundamental da distribuição mundial das linhagens de *Ehrlichia canis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de concentração: Comportamento, Ecologia e Sistemática.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da
Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa Bordim, Suyane.

Diagnóstico, caracterização molecular e epidemiologia da Erliquiose Monocítica Canina na Zona da Mata mineira, Brasil, e investigação do nicho fundamental da distribuição mundial das linhagens de *Ehrlichia canis* / Suyane Costa Bordim. -- 2024.

66 f.

Orientador: Roberto Júnio Pedroso Dias

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2024.

1. *Ehrlichia canis*. 2. *Rhipicephalus sanguineus* sensu latu. 3. Ferramentas diagnósticas. 4. Caracterização molecular. 5. Modelagem de Nicho Ecológico. I. Júnio Pedroso Dias, Roberto, orient. II. Título.

Suyane Costa Bordim

Diagnóstico, caracterização molecular e epidemiologia da Erliquiose Monocítica Canina na Zona da Mata mineira, Brasil, e investigação do nicho fundamental da distribuição mundial das linhagens de *Ehrlichia canis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de concentração: Comportamento, Ecologia e Sistemática.

Aprovada em 22 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira
Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Millke Jasmine Arminini Morales
Universidade Estadual de Campinas

Dedico este trabalho ao meu avô Oenés (*in memorian*) e minha avó Maria (*in memorian*) que sempre acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus e à espiritualidade** por me trazer luz e sabedoria, principalmente nos momentos desafiadores e de provas.

À minha mãe **Márcia** e ao meu pai **Carlos Augusto**, por nunca deixarem de me apoiar e me incentivar em qualquer momento que seja. Ao meu irmão **Matheus**, pelo companheirismo.

Ao **Gabriel**, meu amor, agradeço por estar comigo nessa trajetória da Veterinária desde o início, por estar ao meu lado a cada passo para a realização de cada sonho meu, por seu carinho, amizade e paciência.

Aos meus filhos caninos, **Duda, Uikki, Lobinha e Luna**, agradeço pelo amor incondicional e pelos “lambeijos”. Em especial, ao **Lucky**, por ter sido tão presente durante os momentos mais desafiadores do mestrado, por ter me ensinado muito mais do que um dia eu imaginei que poderia. Você foi e é luz na minha vida!

Ao prof. Dr. **Roberto Júnio Pedroso Dias**, agradeço pela sua orientação, paciência e inspiração ao longo deste processo.

Aos amigos do **LabProto**, agradeço pelos conhecimentos compartilhados, pelas risadas e alegria que trouxeram leveza no meu dia a dia. Agradeço em especial, os doutorandos **Fabíola Costa** e **Pedro de Souza**, pela amizade e parceria, vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À minha amiga **Franciane Cedrola**, que eu tenho profunda admiração, agradeço pelos “puxões de orelha”, pelos conselhos, ensinamentos e paciência dedicados a mim desde o início da minha jornada, na Iniciação Científica. Sua presença foi fundamental para o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

À minha **família e amigos**, que estiveram ao meu lado durante todo o processo, oferecendo suporte emocional e incentivo, meu profundo agradecimento.

Aos professores do **Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza** que enriqueceram minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, agradeço pela concessão da bolsa de Mestrado.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas.
Pessoas transformam o mundo”.

Paulo Freire

RESUMO

Os patógenos transmitidos por carrapatos são uma crescente preocupação diante das mudanças climáticas recentes. A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) em cães é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l., havendo atualmente, relatos desse parasito infectando hospedeiros não convencionais, incluindo humanos. O diagnóstico clínico da EMC, causado por *Ehrlichia canis*, é desafiador visto a inespecificidade dos sinais clínicos. Os métodos imunológicos e moleculares são os diagnósticos mais usado, sendo a PCR seguida de sequenciamento de DNA o método com maior acurácia. Embora haja um número representativo de linhagens de *E. canis* e do vetor *R. sanguineus* s.l. nos bancos de dados genéticos, estudos que investiguem a diversidade, variabilidade genética e distribuição mundial dessas linhagens são escassos. Assim sendo, este estudo teve como objetivos: ¹avaliar a frequência, epidemiologia e alterações em hemogramas causadas pela infecção por *Ehrlichia* spp. em cães na região sudeste do Brasil, ²realizar a caracterização molecular das linhagens de *E. canis* obtidas neste estudo e investigar suas relações genéticas com outras distribuídas globalmente, e ³modelar o nicho ecológico fundamental *E. canis* e de *R. sanguineus* s.l. na América Latina. Os resultados obtidos revelam ¹heterogeneidade na frequência da infecção por *Ehrlichia* spp. na região sudeste do Brasil, com frequências que variam conforme o sexo, raça e localidade dos animais avaliados, além de ter sido identificadas diferentes manifestações hematológicas em cães afetados; ²variações dentro e entre localidades (continentes) no que diz respeito à diversidade genética de *Ehrlichia canis*; e ³similaridades entre os modelos de adequabilidade para *E. canis* e *R. sanguineus* s.l., com as variáveis-chave sendo a área urbana construída e a temperatura média do trimestre mais frio. Estes resultados representam uma valiosa contribuição para a ampliação do entendimento sobre a Erliquiose Canina (EC) na região sudeste do Brasil, tendo relevância direta para a prática veterinária cotidiana, com implicações significativas tanto para a compreensão epidemiológica e genética de *E. canis* em escala regional e global. A abordagem integrada usada nesse estudo é fundamental para uma compreensão mais abrangente e eficaz para a gestão adequada não apenas da EMC, mas também para outras doenças transmitidas por carrapatos na América Latina.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*; *Rhipicephalus sanguineus*; Snap 4Dx Plus; Diversidade genética; Modelagem de Nicho Ecológico.

ABSTRACT

Tick-borne pathogens are a growing concern amid recent climate changes. Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) in dogs is transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus* s.l., with current reports of this parasite infecting non-conventional hosts, including humans. Clinical diagnosis of CME, caused by *Ehrlichia canis*, is challenging due to the nonspecificity of clinical signs. Immunological and molecular methods are the most commonly used diagnostics, with PCR followed by DNA sequencing being the most accurate method. Although there is a representative number of *E. canis* strains and *R. sanguineus* s.l. vectors in genetic databases, studies investigating the diversity, genetic variability, and worldwide distribution of these strains are scarce. Therefore, this study aimed to: ¹evaluate the frequency, epidemiology, and hematological alterations caused by *Ehrlichia* spp. infection in dogs in the southeastern region of Brazil; ²perform molecular characterization of *E. canis* strains obtained in this study and investigate their genetic relationships with others distributed globally; and ³model the fundamental ecological niche of *E. canis* and *R. sanguineus* s.l. in Latin America. The results obtained reveal ¹heterogeneity in the frequency of *Ehrlichia* spp. infection in the southeastern region of Brazil, with frequencies varying according to the sex, breed, and locality of the evaluated animals, as well as different hematological manifestations identified in affected dogs; ²variations within and between localities (continents) regarding the genetic diversity of *Ehrlichia canis*; and ³similarities between the suitability models for *E. canis* and *R. sanguineus* s.l., with key variables being built-up urban areas and the average temperature of the coldest quarter. These results represent a valuable contribution to expanding the understanding of Canine Ehrlichiosis (CE) in the southeastern region of Brazil, with direct relevance to everyday veterinary practice and significant implications for both the epidemiological and genetic understanding of *E. canis* on a regional and global scale. The integrated approach used in this study is essential for a more comprehensive and effective understanding of the proper management not only of CME but also of other tick-borne diseases in Latin America.

Keywords: *Ehrlichia canis*; *Rhipicephalus sanguineus*; Snap 4Dx Plus; Genetic diversity; Ecological niche modeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Mapa ilustrando os municípios na região Sudeste do Brasil, que serviram como origem dos cães submetidos ao teste 4Dx Plus® para *Ehrlichia* spp. durante o período analisado.....11

Figura 2. Distribuição dos animais testados para *Ehrlichia* spp. usando o teste 4Dx Plus®, categorizados por diagnóstico (positivo e negativo) na região sudeste do Brasil.....12

CAPÍTULO 2

Figura 1. Rede de haplótipos Median Joining de *Ehrlichia canis* com base no gene mitocondrial 16S rRNA.....34

Figura 2. Reconstrução filogenética por Máxima Verossimilhança para *Ehrlichia canis* utilizando o marcador molecular 16S-rDNA.....35

CAPÍTULO 3

Figura 1. Mapas de adequabilidade projetados para *Ehrlichia canis* (A) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (B) utilizando o algoritmo MaxEnt no momento presente para a América Latina.....46

Figura 2. Mapa de distribuição utilizando da variável ecológica de áreas com concentração de centros urbanizados (A, B, C) e da média de temperatura durante o semestre mais frio do ano (D) para a América Latina.....47

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Distribuição dos Indivíduos Amostrados por Sexo, Idade, Raça e Cidade dos Cães Analisados, Frequência da Doença por Cada Parâmetro e Intervalos de Confiança (IC) usando o Método de Clopper-Pearson.....13

Tabela 2. Perfis Hematológicos de Cães Testados Negativos e Positivos para *Ehrlichia* spp. Utilizando o Teste Snap 4Dx Plus® na Região Sudeste do Brasil.....14

Tabela suplementar 1. Distribuição do Total de Indivíduos Amostrados por Sexo, Idade, Raça e Cidade de Cães Analisados, Frequência da Doença por Cada Parâmetro e Intervalos de Confiança (CI) utilizando o Método de Clopper-Pearson.....26

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Fontes das 9 variáveis preditoras ambientais usadas na modelagem de distribuição de espécies de *Ehrlichia canis* e de *Rhipicephalus sanguineus* sensu latu.....43

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUÇÃO GERAL.	1
2. CAPÍTULO 1: Desvendando a Distribuição e Frequência de Erliquiose Canina no Sudeste do Brasil: Percepções a partir de Análises Epidemiológicas e Hematológicas.....	4
Resumo	5
Introdução.....	6
Materiais e métodos.....	7
1.1. Aquisição e Padronização de Dados.....	7
1.2. Protocolos Laboratoriais.....	8
1.3. Análise estatística e Georreferenciamento.....	9
Resultados.....	9
Discussão	14
Conclusão.....	18
Referências.....	18
3. CAPÍTULO 2: Caracterização molecular de novas linhagens (16S-rDNA) de <i>Ehrlichia canis</i> do Brasil em uma perspectiva global.....	28
Resumo	29
Introdução.....	30
Metodologia.....	30
Resultados e discussão.....	31
Conclusão.....	35
Referências.....	36
4. CAPÍTULO 3: Modelagem da Distribuição de Vetores e Patógenos: Implicações na Propagação da Erliquiose Monocítica Canina.....	39
Resumo.....	40

Introdução.....	41
Materiais e métodos.....	41
Resultados e discussão.....	43
Referências.....	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os patógenos transmitidos por carrapatos são de grande importância na saúde tanto animal quanto humana, por destacarem-se como causadores de infecções emergentes e com potencial zoonótico (FUENTE et al., 2023). Recentemente, os carrapatos têm atraído considerável atenção devido às atuais mudanças ecológicas e climáticas que propiciaram a formação de ambientes favoráveis em diversas paisagens para a sobrevivência e desenvolvimento desses animais, resultando em uma expansão geográfica desses vetores e de seus patógenos (AZIZ et al., 2023).

Dentre os patógenos transmitidos por carrapatos, estão as bactérias do gênero *Ehrlichia*, que compreende diversas espécies com a capacidade de infectar uma ampla variedade de hospedeiros (VIEIRA et al., 2011). A Erliquiose é desencadeada por bactérias intracelulares obrigatórias e Gram-negativas, com destaque para a *Ehrlichia canis* DONATIEN & LESTOQUARD (1935), agente etiológico responsável pela Erliquiose Monocítica Canina (EMC) em cães (ZORZO et al., 2023). Essa condição afeta as células mononucleares desses animais, sendo o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato LATREILLE (1806) o vetor (PELEG et al., 2010).

A EMC gera manifestações clínicas multissistêmicas inespecíficas em seus hospedeiros caninos, tornando a sua identificação desafiadora. Esses sinais clínicos incluem apatia, inapetência, anorexia, perda de peso, hipertermia, mucosas pálidas, hemorragia, linfadenopatia, esplenomegalia e uveítes (BAI et al., 2016). A intensidade dos sinais clínicos varia de acordo com as diferentes fases da doença, sendo classificada como aguda, subaguda ou crônica (HARRUS & WANER, 2011).

Apesar dos cães serem tradicionalmente descritos na literatura como espécie-específica para a ocorrência de *Ehrlichia canis*, estudos recentes têm registrado a sua presença em diversos outros hospedeiros não convencionais, incluindo felinos domésticos e silvestres, bovinos, aves, roedores, veados e até mesmo em seres humanos (LU et al., 2022; NEVES et al., 2014; SILVA et al., 2011; VIEIRA et al., 2011). Essa possível baixa especificidade parasitária suscita importantes considerações sobre a epidemiologia e o potencial impacto desta doença em diferentes populações, enfatizando a necessidade contínua de pesquisa e monitoramento abrangente.

Para que seja feita a identificação da infecção por *Ehrlichia canis* nos seus hospedeiros é necessário recorrer às ferramentas diagnósticas laboratoriais específicas, como

o método parasitológico como o esfregaço sanguíneo, métodos sorológicos como o Snap 4Dx Plus e abordagens moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (PIRATAE et al., 2019). A PCR seguida do sequenciamento destaca-se não apenas como o método mais confiável, mas também possibilita a identificação de diferentes linhagens (SELIM et al., 2020), fornecendo informações genéticas cruciais, as quais ainda são escassas para *E. canis*.

Atualmente, é reconhecido que *E. canis* está globalmente disseminada e documentada em vários países e continentes, com diferentes níveis de prevalência, abrangendo a América, África, Ásia, Europa e Oriente Médio (LYRA-AMAYA et al., 2023). No Brasil, a presença dessa patologia foi documentada em cães na maioria dos estados, com a região sudeste em destaque, ao apresentar o maior número de casos (VIEIRA et al., 2011). Embora numerosos estudos tenham documentado casos de *Ehrlichia* spp. em várias regiões brasileiras, relativamente poucos se aprofundaram nos aspectos epidemiológicos da doença, incluindo fatores como sexo, idade, raça e localidade precisa (AGUIAR et al., 2007; BORIN et al., 2009; COSTA et al., 2007; DINIZ et al., 2009; PAULINO et al., 2018; SPOLIDORIO et al., 2013; ZUCHI et al., 2020). Essa lacuna destaca a necessidade premente de estudos mais específicos para uma compreensão mais aprofundada da epidemiologia da *E.* em seus hospedeiros.

Apesar da distribuição global de *E. canis*, estudos sobre sua variabilidade genética são escassos na literatura (LYRA-AMAYA et al., 2023). É imperativo adotar ferramentas que aprofundem nosso entendimento sobre sua diversidade molecular e genética, não apenas para identificar padrões de disseminação e adaptação ao longo do tempo, mas também para desenvolver estratégias eficazes de prevenção e controle de doenças (BRENER & WAINBERG, 2013). Tais investigações oferecem insights valiosos sobre as diferentes linhagens, suas patogenicidades variadas e sua correlação com a gravidade das manifestações clínicas, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada da epidemiologia e patogenicidade dessa patologia. Essa abordagem é essencial para uma compreensão aprofundada dos aspectos fundamentais relacionados à EMC (GUTIERREZ et al., 2016).

Embora a presença global de *Ehrlichia canis* e de seu vetor *Rhipicephalus sanguineus* seja observada em diversos habitats, há uma lacuna no entendimento dos fatores ambientais que efetivamente influenciam a distribuição dessas espécies. Portanto, destaca-se a importância de conduzir estudos aprofundados sobre as condições climáticas e ecológicas que favorecem a presença desses vetores. Pesquisas que empregam a modelagem de nicho climático oferecem informações valiosas sobre como variáveis bioclimáticas moldam a

distribuição geográfica de espécies, sendo escassas quando se trata de *E. canis* e *R. sanguineus* (ALKISHE et al., 2020). Essas abordagens possibilitam antecipar potenciais alterações na distribuição de carrapatos e identificar áreas propícias à sua ocorrência. Ao considerar fatores climáticos e ambientais, esses estudos proporcionam uma visão abrangente das interações entre carrapatos, hospedeiros e ecossistemas, destacando a relevância dessa abordagem para um gerenciamento eficaz da saúde pública e da biodiversidade.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivos ¹avaliar a frequência de *Ehrlichia* spp. em cães residentes em parte da região sudeste do Brasil, diagnosticados através do Snap 4Dx Plus®, de modo a expandir os conhecimentos epidemiológicos básicos e correlacionar esses dados à perfis hematológicos (capítulo 1), ²realizar a caracterização molecular de linhagens de *Ehrlichia canis* encontrados em cães na mesma região, bem como explorar as relações filogenéticas e haplotípicas de sequências de 16S-rDNA amostradas em cinco continentes (capítulo 2), e ³modelar o nicho fundamental de *Ehrlichia canis* e *Rhipicephalus sanguineus* para a América Latina para o momento atual (capítulo 3). Assim sendo, os três próximos capítulos foram organizados para iniciar um estudo epidemiológico local sobre *Ehrlichia* spp. em cães na região sudeste do Brasil, analisar dados locais e globais sobre as linhagens de *Ehrlichia canis* (16S-rDNA) em bancos de dados e aprofundar nosso conhecimento sobre a distribuição geográfica desse patógeno e seu hospedeiro na América Latina. Ao agir localmente e pensar globalmente, buscamos contribuir para uma compreensão aprimorada da epidemiologia, diversidade genética e distribuição geográfica da Erliquiose Monocítica Canina. O primeiro capítulo desta Dissertação foi submetido ao Brazilian Journal of Veterinary Parasitology (Qualis A3), enquanto os capítulos 2 e 3 serão enviados ao Parasitology Research (Qualis A1), na seção "Brief Report" (com limite máximo de 2550 palavras).

2. CAPÍTULO 1:

**Desvendando a Distribuição e Frequência de Erliquiose Canina no Sudeste do Brasil:
Percepções a partir de Análises Epidemiológicas e Hematológicas**

Resumo

A Ehrlichiose Canina (EC) é importante para a saúde animal e é considerada potencialmente zoonótica. *Ehrlichia canis*, o agente causador da Ehrlichiose Monocítica Canina, parasita células mononucleares em cães globalmente e é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. No Brasil, essa doença tem sido extensivamente documentada, principalmente na região sudeste, onde a maior incidência tem sido registrada. No entanto, poucos estudos exploraram seus aspectos epidemiológicos em detalhes. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a frequência de *Ehrlichia* spp. em 711 cães da região sudeste do Brasil usando o teste Snap 4Dx Plus®, ampliar o conhecimento epidemiológico básico sobre a doença e também correlacionar perfis hematológicos com a presença do patógeno. A frequência da doença foi avaliada quanto a sexo, idade, raça e cidade. A análise do hemograma também foi realizada em 603 animais. Os resultados obtidos demonstraram que a infecção por *Ehrlichia* spp. na região estudada é heterogênea, com frequências variáveis em relação ao sexo, raça e cidade, bem como diferentes alterações hematológicas em cães afetados. Esses resultados contribuem para expandir o conhecimento sobre a EC na região sudeste do Brasil e para a prática veterinária rotineira, dada a importância dessa doença para a saúde global.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, Frequência, Epidemiologia, Ehrlichiose Monocítica Canina, 4Dx Plus.

Introdução

A Ehrlichiose Canina (EC) é uma doença de significativa importância tanto para a saúde animal quanto humana (BOUZA-MORA et al., 2016; PEREZ et al., 2006; PEREZ et al., 1996). A EC é causada por bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias pertencentes ao gênero *Ehrlichia* MOSHKOVSKI (1945). Esse gênero está amplamente distribuído pelo Brasil, com três espécies descritas até o momento (VIEIRA et al., 2011): *Ehrlichia canis* DONATIEN & LESTOQUARD (1935), *Ehrlichia ewingii* DAWSON et al. (1991) e *Ehrlichia chaffeensis* ANDERSON et al. (1991).

Ehrlichia canis é o principal agente etiológico responsável pela Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC), caracterizada pela parasitação de células mononucleares em cães afetados. Essa espécie tem distribuição global e é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato LATREILLE (1806) (PELEG et al., 2010). Embora essa bactéria tenha sido descrita na literatura clássica como específica de espécies, alguns estudos recentes relataram sua presença em outros hospedeiros, como gatos domésticos e selvagens, bovinos, aves, roedores, cervídeos e até mesmo seres humanos, destacando o potencial zoonótico e emergente da EMC em todo o mundo (LU et al., 2022; NEVES et al., 2014; SILVA et al., 2011; VIEIRA et al., 2011).

No Brasil, essa doença foi relatada em cães em mais de 50% dos estados (AGUIAR et al., 2007; DAGNONE et al., 2003; FONSECA et al., 2017; LABARTHE et al., 2003; PAULINO et al., 2018; SANTOS et al., 2013; SOUZA et al., 2010; SPOLIDORIO et al., 2013; TRAPP et al., 2006; ZUCHI et al., 2020), com uma concentração significativa em estados da região sudeste, onde foram registrados números mais elevados de ocorrências (VIEIRA et al., 2011). Embora numerosos estudos tenham documentado casos de *Ehrlichia* spp. em várias regiões brasileiras, relativamente poucos se aprofundaram nos aspectos epidemiológicos da doença, incluindo fatores como sexo, idade, raça e localidade precisa (AGUIAR et al., 2007; BORIN et al., 2009; COSTA et al., 2007; DINIZ et al., 2009; PAULINO et al., 2018; SPOLIDORIO et al., 2013; ZUCHI et al., 2020).

Embora apenas um número limitado de artigos explore mais extensivamente os aspectos epidemiológicos da Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC), as taxas significativas de morbidade e mortalidade associadas a essa doença em cães têm motivado uma ampla gama de estudos destinados a analisar várias facetas dessa condição (RODRÍGUEZ ALARCÓN et al., 2020), como seus sintomas e diagnóstico. Essa doença gera manifestações clínicas

multisistêmicas não específicas, incluindo apatia, anorexia, perda de apetite, perda de peso, hipertermia, membranas mucosas pálidas, hemorragia, linfadenopatia, esplenomegalia e uveíte (VIEIRA et al., 2011). Esses sinais clínicos variam em intensidade de acordo com as fases da doença, que podem ser classificadas como aguda, subaguda ou crônica (RAMAKANT et al., 2020). Trombocitopenia e anemia são os achados hematológicos mais comumente observados em casos de infecção por *E. canis*, embora a extensão dessas alterações tenha variado em diferentes estudos (MORAIS et al., 2011; DAGNONE et al., 2003; BANETH et al., 1996).

Devido à variabilidade nos sintomas associados a essa doença, seu diagnóstico pode ser desafiador. Tipicamente, é diagnosticado por meio da observação de sinais clínicos e/ou análises laboratoriais básicas, no entanto, esse método diagnóstico nem sempre é confiável. Para obter um diagnóstico mais definitivo, são necessários testes laboratoriais mais complexos (AGUIAR et al., 2007), como exame parasitológico específico, métodos sorológicos e diagnóstico molecular. Entre os métodos sorológicos mais comumente usados, destaca-se o teste rápido Snap 4Dx Plus® (Idexx Laboratories Inc., EUA). Esse teste é amplamente utilizado na prática veterinária para triagem de doenças transmitidas por vetores (HARRUS & WANER, 2011), devido à sua acessibilidade, capacidade de detectar um amplo espectro de patógenos e simplicidade de aplicação. No entanto, como esse teste se baseia na detecção de anticorpos para o diagnóstico, pode encontrar desafios em distinguir entre infecções atuais e passadas.

Materiais e Métodos

1.1. Aquisição e Padronização de Dados

Os dados processados neste estudo foram fornecidos em parceria com um laboratório de análises clínicas veterinárias privado localizado no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Este laboratório oferece serviços para consultórios veterinários, clínicas e hospitais veterinários, atendendo às áreas da Zona da Mata Mineira (Minas Gerais) e as regiões dos Lagos e Fluminense (Rio de Janeiro) (Figura 1). Recebemos informações de 711 cães doentes suspeitos de ter Ehrlichiose Canina (EC), que foram testados usando o teste diagnóstico Snap 4Dx Plus® entre 2016 e 2022. As informações disponíveis incluíam dados sobre sexo, raça, idade e localização desses animais. Utilizamos esses dados para delinear um perfil epidemiológico básico de cães afetados pela EC e para investigar a distribuição e

frequência de *Ehrlichia* spp. nas regiões amostradas. Para realizar cálculos de frequência e análises estatísticas, os dados coletados desses 711 cães passaram por um processo de triagem, padronização e categorização para permitir uma comparação mais precisa. Dados que não continham todas as informações essenciais para análise, como sexo, raça, idade e município, foram excluídos do conjunto de dados, resultando em 607 itens de dados válidos. As informações sobre a idade dos animais foram distribuídas em três categorias: "jovem" para animais com idade entre 0 e 12 meses, "adulto" para aqueles com idade entre 13 e 96 meses, e "idoso" para aqueles com mais de 97 meses de idade. Essas etapas foram conduzidas utilizando a biblioteca Python Pandas (REBACK et al., 2021). Além disso, dados do perfil hematológico estavam disponíveis para 458 cães dos 607 animais previamente selecionados. Os parâmetros analisados incluíram: eritrograma, leucograma, contagem de plaquetas (por μL) e proteínas (g/dL). Os índices do eritrograma utilizados foram os seguintes: glóbulos vermelhos ($10^6 \mu\text{L}$), volume corpuscular médio (VCM) (por fL), hemoglobina (g/dL), volume corpuscular médio (VCM) (por fL) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%). Para os dados do leucograma, utilizamos os seguintes índices: contagem total de leucócitos (por μL) e contagens específicas para basófilos, eosinófilos, mielócitos, metamielócitos, neutrófilos (bastões e segmentados), linfócitos e monócitos (valores absolutos em μL).

1.2. Protocolos Laboratoriais

As amostras de sangue utilizadas para o diagnóstico de *Ehrlichia* spp. e para avaliação da saúde geral dos animais analisados foram coletadas por meio de venopunção usando seringas descartáveis de diferentes volumes. Essas amostras foram colocadas em tubos plásticos contendo anticoagulante EDTA para a contagem completa de células sanguíneas e em tubos sem anticoagulante para o teste Snap 4Dx Plus®. Para a contagem completa de células sanguíneas, as amostras de sangue foram primeiro homogeneizadas invertendo os tubos por um mínimo de 20 repetições. Em seguida, foram colocadas na máquina "Nihon Kohden - Celltak MEK 6550J/K" para pipetagem, análise e leitura do material sanguíneo. Este equipamento realiza contagens gerais em três linhagens celulares: hematimetria, leucometria e contagem de plaquetas. A morfologia celular foi avaliada e contagens diferenciais de células foram realizadas por meio de hematoscopia, com magnificação de 1000x de esfregaços de sangue fixados e corados com um corante panóptico rápido

(BERNDT et al., 2019). Para o teste Snap 4Dx Plus®, foi utilizado o kit comercial da Idexx Laboratories, seguindo as recomendações do fabricante.

1.3. Análise Estatística e Georreferenciamento

Para evitar conclusões imprecisas decorrentes de desequilíbrios amostrais, apenas conjuntos de dados derivados de mais de 10 testes foram usados na análise de frequência e na comparação de dados hematológicos entre animais positivos e negativos (Tabela S1). As análises de frequência, juntamente com seus intervalos de confiança de 95%, foram conduzidas usando o software Quantitative Parasitology Web (QPweb) (REICZIGEL et al., 2019), empregando o método Clopper-Pearson. Essas análises foram realizadas considerando vários agrupamentos, como sexo (macho ou fêmea), faixa etária (jovem, adulto ou idoso), localização e raça. Além disso, comparações estatísticas foram realizadas usando o teste de Wilcoxon não paramétrico para avaliar as médias dos parâmetros obtidos nos exames de sangue de animais positivos e negativos. Este teste estatístico foi escolhido devido aos dados não atenderem aos pressupostos necessários para testes paramétricos, como o teste t.

Para visualizar a distribuição dos testes e as localizações dos animais amostrados, os dados foram georreferenciados usando o software Google Maps. Posteriormente, essas informações foram mapeadas na região sudeste do Brasil por meio do software QGIS 3.22 (Equipe de Desenvolvimento QGIS). A base cartográfica usada para criar este mapa aderiu ao Sistema de Referência Geocêntrico das Américas (SIRGAS 2000, s.d.) e foi fornecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019).

Resultados

Entre os 607 testes analisados, foram avaliados animais de ambos os sexos, machos (303) e fêmeas (304), abrangendo diferentes grupos etários (81 animais jovens, 344 adultos e 182 idosos), representando 50 raças diferentes e residindo em 19 municípios localizados em parte da região sudeste do Brasil (Figura 1; Figura 2). A frequência de detecção de *Ehrlichia* spp. para os 607 animais analisados com o teste Snap 4Dx Plus® foi de 41% (IC 95%: 37-44). A Erliquiose Canina (CE) foi registrada em 42% (IC 95%: 37-48) dos machos e em 41% (IC 95%: 36-47) das fêmeas (Tabela 1). Essa infecção afetou 16% (IC 95%: 9-26) da população

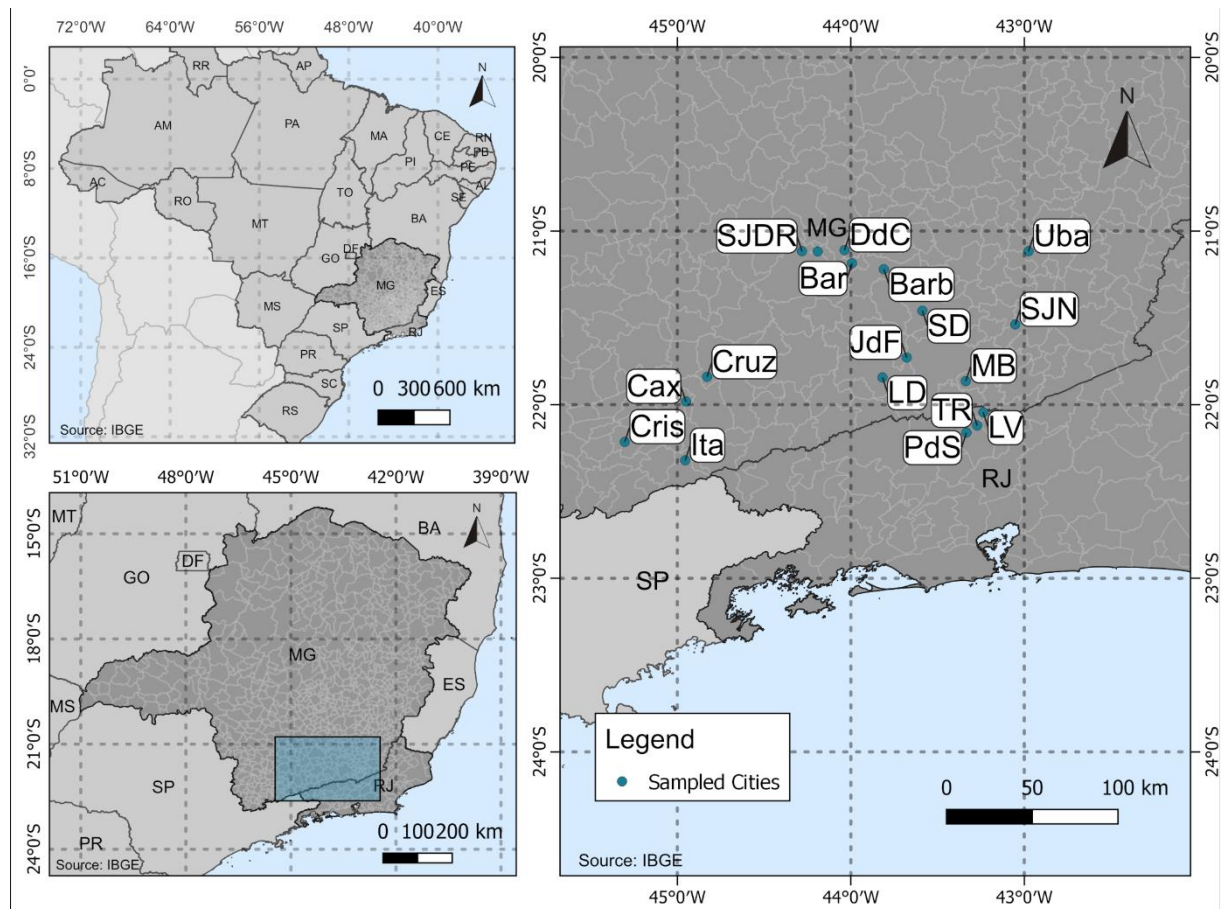
jovem, 41% (IC 95%: 36-47) da população adulta e 55% da população idosa (IC 95%: 47-62) (Tabela 1).

Quanto às raças, entre aquelas com tamanho amostral maior que 10, a frequência de infecção por CE variou de 8 a 71% (Tabela 1), com considerável sobreposição de intervalos de confiança. Entre os grupos analisados, os únicos que apresentaram diferença significativa foram Border Collie e Chow-Chow (71%; IC 95%: 42-92) e *Mixed-Breed* (52%; IC 95%: 46-58), ambos apresentando frequência menor (8%; IC 95%: 0-36). Shih-tzu também mostrou frequência menor (18%; IC 95%: 7-34), em comparação com Chow-Chow, *Mixed-Breed* e Poodle (53%; IC 95%: 35-70).

Finalmente, em relação aos municípios com tamanhos amostrais maiores que 10, a frequência de infecção por CE variou de 20 a 53% (Tabela 1), também com considerável sobreposição de intervalos de confiança. Os únicos municípios com frequências estatisticamente diferentes foram Barbacena, que teve frequência menor (20%; IC: 8-37) do que Ubá (53%; IC: 44-62) e Santos Dumont (48%; IC: 38-58); e Juiz de Fora, que teve frequência menor (33%; IC: 26-41) do que Ubá (53%; IC: 44-62).

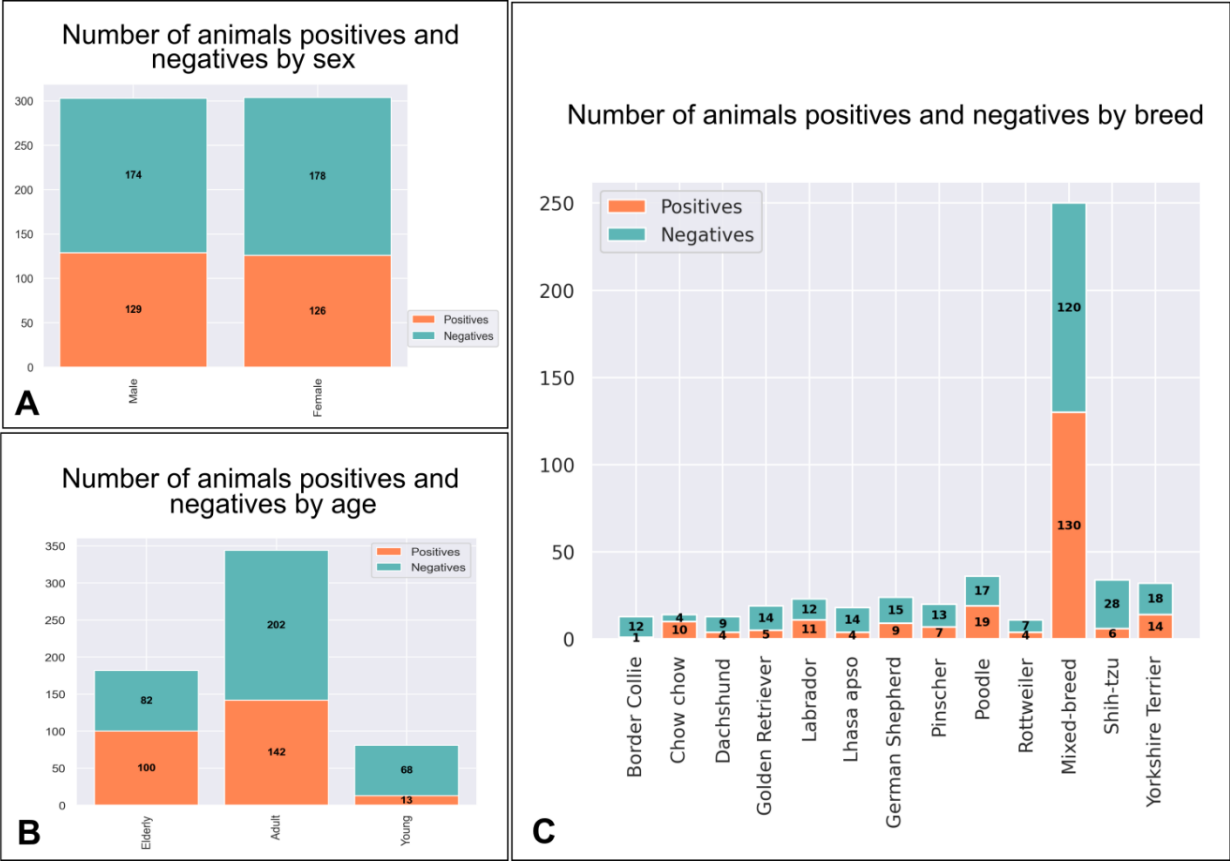
Em relação ao perfil hematológico (Tabela 2), os animais infectados com *Ehrlichia* spp. apresentaram valores significativamente reduzidos ($p < 0,05$) para eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), eosinófilos e plaquetas; e concentração elevada de proteínas em comparação com aqueles com resultados negativos. Além disso, ao comparar os valores médios dos parâmetros sanguíneos entre animais positivos e negativos, em relação aos valores de referência, identificamos que os animais com resultados positivos exibiam níveis reduzidos de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas, juntamente com níveis elevados de metamielócitos, neutrófilos (bastões e segmentados) e proteínas. Por outro lado, entre os animais com resultados negativos, foram registrados valores superiores aos parâmetros de referência para metamielócitos e basófilos (Tabela 2).

Figura 1. Mapa ilustrando os municípios na região Sudeste do Brasil, que serviram como origem dos cães submetidos ao teste 4Dx Plus® para *Ehrlichia* spp. durante o período analisado. Abreviações: JdF = Juiz de Fora, SD = Santos Dumont, TR = Três Rios, Barb = Barbacena, SJDR = São João Del Rei, LD = Lima Duarte, SJN = São João Nepomuceno, PdS = Paraíba do Sul, SL = São Lourenço, DdC = Dolores do Campo, CdG = Campos dos Goytacazes, Cris = Cristina, ARD = Alto Rio Doce, BjdM = Bom Jardim de Minas, Camp = Campanha, Bar = Barroso, RC = Resende Costa, Cata = Cataguases, RC = Resende Costa. Brasil.



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Figura 2. Distribuição dos animais testados para *Ehrlichia* spp. usando o teste 4Dx Plus®, categorizados por diagnóstico (positivo e negativo) na região sudeste do Brasil. A: Distribuição por sexo; B: Distribuição por idade; C: Distribuição por raça, representando as dez raças mais comumente afetadas.



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Tabela 1. Distribuição dos Indivíduos Amostrados por Sexo, Idade, Raça e Cidade dos Cães Analisados, Frequência da Doença por Cada Parâmetro e Intervalos de Confiança (IC) usando o Método de Clopper-Pearson. A tabela fornece o número total de cães analisados categorizados por sexo, idade, raça e cidade, juntamente com a frequência de positivos no teste 4Dx Plus® para cada parâmetro. Além disso, inclui os intervalos de confiança máximo e mínimo correspondentes para o índice de Clopper-Pearson, calculado em um nível de confiança de 95%.

Características Epidemiológicas	Amostragem	Frequência (%)	Intervalo de Confiança (95%)	
			Mínimo	Máximo
Sexo				
Fêmea	304	41	36	47
Macho	303	42	37	48
Idade				
Adulto	344	41	36	47
Idoso	182	55	47	62
Jovem	81	16	9	26
Raça				
Mixed-breed	250	52	46	58
Poodle	36	53	35	70
Shih-tzu	34	18	7	34
Yorkshire Terrier	32	44	26	62
German Shepherd	24	37	19	59
Labrador	23	48	27	69
Pinscher	20	35	15	59
Golden Retriever	19	26	9	51
Lhasa Apso	18	22	6	48
Chow Chow	14	71	42	92
Border Collie	13	8	0	36
Dachshund	13	31	9	61
Rottweiler	11	36	11	69
Cidade				
Juiz de Fora	174	33	26	41
Ubá	128	53	44	62
Santos Dumont	96	48	38	58
Três Rios	62	45	32	58
Barbacena	35	20	8	37
Lima Duarte	25	48	28	69
São João Nepomuceno	23	43	23	65
Paraíba do Sul	20	45	23	68
São João Del Rei	18	22	6	48
São Lourenço	10	50	19	81

Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Tabela 2. Perfis Hematológicos de Cães Testados Negativos e Positivos para *Ehrlichia* spp. Utilizando o Teste Snap 4Dx Plus® na Região Sudeste do Brasil. A significância estatística é indicada por a-b em $p < 0,05$. As seguintes abreviações são utilizadas: VCM (Volume Corpuscular Médio), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), Bas (Basófilo), Eos (Eosinófilo), Miel (Mielócito), Meta (Metamielócito), Band (Neutrófilo em Bastonete), Seg (Neutrófilo Segmentado), Lin (Linfócito), Mon (Monócito), PLT (Plaquetas) e PRT (Proteína).

Parâmetros Hematológicos	Unidade	Valores de Referência	Negativos (n= 262)	Positivos (n= 196)
Eritrócitos	$10^6/\mu\text{L}$	5,5-8,5	5.88 ± 1.66^a	4.8 ± 1.81^b
Hematócrito	%	37-55	40.6 ± 11.11^a	32.9 ± 12.18^b
Hemoglobina	g/dL	12-18	13.7 ± 3.92^a	10.96 ± 4.26^b
MCV	fL	60-77	69.58 ± 5.08^a	69.13 ± 5.11^b
MCHC	%	32-36	33.6 ± 1.31^a	33.13 ± 2.01^b
Leucometria	$/\mu\text{L}$	6000-17000	12362.98 ± 9162.89^a	12506.67 ± 11115.63^a
Bas	$/\mu\text{L}$	Raro	1.34 ± 21.71^a	0 ± 0^a
Eos	$/\mu\text{L}$	100-1250	433.71 ± 631.91^a	335.16 ± 525.39^b
Miel	$/\mu\text{L}$	0	0 ± 0^a	0 ± 0^a
Meta	$/\mu\text{L}$	0	8.77 ± 91.45^a	15.49 ± 119.06^a
Band	$/\mu\text{L}$	0-300	241.63 ± 807.94^a	396.64 ± 1140.07^a
Seg	$/\mu\text{L}$	3000-11500	9167.64 ± 7808.16^a	9300.91 ± 8765.03^a
Lin	$/\mu\text{L}$	1000-4800	1529.54 ± 1174.03^a	1803.55 ± 4363.18^a
Mon	$/\mu\text{L}$	150-1350	566.2 ± 723.31^a	585.85 ± 829.66^a
PLT	$10^3/\mu\text{L}$	175-500	207.42 ± 120.86^a	152.36 ± 97.03^b
PRT	g/dL	5,5-8	7.25 ± 1.13^a	8.24 ± 1.66^b

Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Discussão

A Erliquiose Canina (CE) tem se mostrado uma doença de significativa importância veterinária (SELIM et al., 2020) com potencial de transmissão zoonótica (BOUZA-MORA et al., 2016; PEREZ et al., 2006; PEREZ et al., 1996). Atualmente, numerosos casos estão sendo relatados em todo o mundo (BORGES et al., 2023; NAVARRETE et al., 2022; NEAVE et al., 2022; PURISARN et al., 2022), e o Brasil não é exceção (PAULA et al., 2022; PEREIRA et al., 2023; ZORZO et al., 2022). Além do aumento no número de regiões afetadas recentemente, alta frequência desta doença na população canina também tem sido relatada (ALMEIDA et al., 2021; PEREIRA et al., 2023; TAQUES et al., 2020; ZUCHI et al., 2020). Os resultados encontrados aqui confirmam esses dados, já que aproximadamente 41% da amostra de 607 animais analisados aqui testaram positivo para CE (95% CI: 37-44). Esses

testes foram conduzidos em cães suspeitos de ter CE, usando a tecnologia Snap 4Dx Plus®, o que pode ter influenciado nos resultados, mas ainda assim, esse percentual representa uma alta frequência.

O fato de que os animais na população analisada já haviam sido suspeitos de ter CE indica que essa população não está saudável, o que pode levar a alterações na frequência encontrada (VIEIRA et al., 2011). Além disso, o teste Snap 4Dx Plus® é um tipo de ensaio que usa reagentes altamente purificados para avaliar anticorpos para *Ehrlichia* spp. Portanto, ele não é capaz de distinguir a reatividade devido a infecções passadas da doença ativa (PARMAR et al., 2013), um fator que também pode ter impactado o resultado da frequência. Por causa disso, não podemos afirmar que o resultado encontrado aqui reflita a frequência total de CE nas regiões dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro analisadas, já que eles não tinham registros publicados de CE até agora. Além disso, dada a grande quantidade de animais analisados e a extensa lista de características epidemiológicas avaliadas para esses animais, discussões sobre o efeito e distribuição dessa doença na região permanecem plausíveis.

Idade, localização, raça, sexo e perfil hematológico estavam entre as características investigadas para cada animal. Entre os grupos etários analisados, a população idosa foi a que apresentou o maior número de animais positivos para CE (55%; 95% CI: 47-52), seguida pela população adulta (41%; 95% CI: 36-47) e por último a população jovem (16%; 95% CI: 9-26) (Figura 2 - B). Os resultados encontrados aqui demonstram que a população idosa pode ter uma chance maior de contrair CE e isso ocorre porque esses animais, devido à sua vida mais longa, tiveram uma exposição mais prolongada ao vetor e, consequentemente, à *Ehrlichia* spp. Eles também têm um sistema imunológico mais debilitado e, portanto, são mais suscetíveis a infecções (BARRANTES-GONZALEZ et al., 2016; SOUSA et al., 2010) e também devido ao tipo de método de diagnóstico, Snap 4Dx Plus®. A população adulta mostrou resultados próximos aos encontrados para a população idosa, o que pode estar relacionado ao observado no presente estudo, onde a idade do animal foi associada à probabilidade de infecção com *Ehrlichia* spp. Por outro lado, a população jovem mostrou resultados significativamente menores de infecção do que os outros, indicando assim que os animais nessa faixa etária podem ser menos suscetíveis à contaminação por CE.

Entre os municípios analisados, a frequência de CE variou de 20 a 53% (Tabela 1). No entanto, pouca parte dessa variação pôde ser confirmada estatisticamente, já que o tamanho da amostra variou significativamente entre os municípios, levando assim a um amplo intervalo

de confiança para os dados de frequência. Entre os locais analisados, os únicos que mostraram diferenças estatísticas foram Barbacena, que teve frequência menor (20%; CI: 8-37) do que Ubá (53%; CI: 44-62) e Santos Dumont (48%; CI: 38-58); e Juiz de Fora, que teve uma frequência menor (33%; CI: 26-41) do que Ubá (53%; CI: 44-62). Além do número de testes realizados que mostraram grande variabilidade, também podemos correlacionar os resultados com o Índice de Desenvolvimento Sustentável dos Municípios - Brasil (IDSCBR, 2023), que avalia várias áreas importantes como saúde, educação, renda, habitação, assistência social e emprego, entre outras. Barbacena é classificada como uma cidade de desenvolvimento médio pelo IDSC-BR, enquanto Ubá e Santos Dumont são classificados como cidades de baixo desenvolvimento. Da mesma forma, Juiz de Fora tem uma classificação mais alta do que Ubá. Um município com uma classificação média de IDSC-BR pode ser interpretado como tendo uma população com mais conhecimento técnico e uma maior oferta de profissionais e estabelecimentos qualificados, o que pode refletir que esta localidade tem uma menor chance de infecção por CE.

As raças analisadas, como os locais, mostraram ampla variação na frequência de infecção por CE, variando de 8 a 71% (Tabela 1), mas pouca parte dessa variação pode ser estatisticamente confirmada, mais uma vez devido a discrepâncias no tamanho da amostra. As únicas raças que mostraram diferenças significativas foram Border Collie, que teve um número menor de indivíduos positivos (frequência 8%; 95% CI: 0-36) do que Chow-Chow (71%; 95% CI: 42-92) e *Mixed-Breed* (52%; 95% CI: 46-58); e Shih-tzu, que teve uma frequência menor (18%; 95% CI: 7-34) do que Chow-Chow, *Mixed-Breed* e Poodle (53%; 95% CI: 35-70). Os resultados obtidos indicam possível variação na resistência à CE entre diferentes raças de cães, como visto na comparação entre Border Collie e Chow-Chow. Esses resultados corroboram relatos anteriores, um exemplo notável relatado anteriormente é a raça Beagle, que foi identificada na literatura como mais resistente, em contraste com a raça Pastor Alemão, que foi caracterizada como mais vulnerável (HARRUS et al., 1997; NYINDO et al., 1980).

Em relação ao sexo dos animais (Tabela 1), embora uma leve diferença na frequência de positividade tenha sido observada entre fêmeas e machos, ou seja, 41% (95% CI: 36-47) e 42% (95% CI: 37-48), respectivamente, essa disparidade não foi considerada significativa com base nos intervalos de confiança. Esses achados estão alinhados com dados na literatura, que relataram uma frequência maior de cães positivos entre fêmeas e machos (BORIN et al.,

2009; COSTA et al., 2007; PAULINO et al., 2018; PIRATAE et al., 2019; SPOLIDORIO et al., 2013; ZUCHI et al., 2020).

As alterações hematológicas observadas (Tabela 2) mostram que os cães positivos para *Ehrlichia* spp. são comumente afetados em termos de seus valores para eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, VCM, CHCM, eosinófilos, plaquetas e proteínas ($p < 0,05$). Os resultados relacionados a eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas em cães positivos foram menores do que os valores de referência e indicaram condição de anemia e trombocitopenia. Por outro lado, os níveis de metamielócitos, neutrófilos de bastão e proteínas estavam elevados, indicando assim um desvio à esquerda e hiperproteinemia. No entanto, esses resultados podem não estar diretamente relacionados à condição de CE, considerando que o tipo de teste usado para o diagnóstico (Snap 4Dx Plus) é um teste sorológico (PARMAR et al., 2013).

No entanto, o perfil apresentado pelos animais positivos foi consistente com o que é observado em animais com CE, considerando que a anemia pode ser causada pela ação de *Ehrlichia* spp. nos eritrócitos. A doença pode levar a uma reação imune mediada pelo próprio corpo, resultando assim na destruição dessas células e liberação de células jovens (THONGSAHUAN et al., 2020). Os resultados encontrados neste estudo são consistentes com dados na literatura que mostram que a anemia é a alteração mais frequente no eritrograma (BORIN et al., 2009; MOYA-ARAUJO et al., 2012). Além disso, a trombocitopenia é comumente relatada na CE e é uma condição usada como triagem para um diagnóstico conclusivo. Essa alteração é causada pelo aumento do consumo/destruição de plaquetas durante o período agudo de infecção, como resultado do mecanismo inflamatório (MYLONAKIS & TTHEODORU, 2017). Esse achado é consistente com dados na literatura (ASGARALI et al., 2012; FONSECA et al., 2017; HARRUS & WANER, 2011; MOYA-ARAUJO et al., 2012). O desvio à esquerda é caracterizado pela presença de formas jovens de células de defesa na corrente sanguínea, principalmente associadas a infecções bacterianas como *Ehrlichia* spp., em que há intenso consumo de neutrófilos, levando assim a medula óssea a liberar células imaturas na tentativa de controlar a infecção (MYLONAKIS & THEODORU, 2017). Contagens leucocitárias normais são consistentes com os achados de WALDEMARIN et al. (2003), mas houve relatos de leucopenia (HARRUS & WANER, 2011). Em relação às contagens diferenciais, o achado mais significativo é um desvio à esquerda regenerativo (BORIN et al., 2009). A hiperproteinemia tem sido observada em casos

de estimulação imunológica como devido a infecções por *Ehrlichia* spp., a estimulação imunológica é comumente observada em casos de CE (ASGARALI et al., 2012).

Vale ressaltar que os animais que foram negativos para *Ehrlichia* spp. também mostraram alterações em suas contagens sanguíneas, de modo que alguns parâmetros apresentaram valores médios que estavam acima da faixa de referência (Tabela 2), incluindo mielócitos, metamielócitos e neutrófilos de bastão. Este resultado era esperado, já que este grupo incluía animais que não estavam saudáveis e havia suspeita de infecção por *Ehrlichia* spp. Essas células são geralmente encontradas em grande número quando há um processo infeccioso ou neoplásico ocorrendo. Isso pode ter sido a razão para a suspeita de Erliquiose Canina, dado que o aumento dessas contagens celulares é bastante genérico e pode ser observado em animais afetados por essa doença (NELSON & COUTO, 2015).

Conclusão

Os resultados descritos aqui demonstram que a infecção por *Ehrlichia* spp. nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro ocorre frequentemente, com mais de 290 casos ao longo de um período de 6 anos. Eles também mostram que a frequência dessa doença não é homogênea na região estudada, e que diferentes raças de cães e grupos etários podem apresentar frequências variáveis. Os resultados apresentados aqui também demonstram que a infecção por *Ehrlichia* spp. pode causar alterações hematológicas em cães afetados. No entanto, é importante notar que outros parasitas podem causar coinfeção, potencialmente levando a confusão no processo de diagnóstico. Além disso, as limitações do teste Snap 4Dx Plus podem ter influenciado os resultados encontrados neste estudo, destacando assim a necessidade de mais pesquisas sobre este tema nesta região.

Referências

AGUIAR, D. M., CAVALCANTE, G. T., PINTER, A., GENNARI, S. M., CAMARGO, L. M. A., LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 44(1): 126-132, 2007.

ALMEIDA, V. G. F., XAVIER, M. S., da CUNHA, N. C., TEIXEIRA, R. S., BAX, J. C., ALMOSNY, N. R. P. Clinical and Laboratory Profile of Dogs Seroreactive to Ehrlichiosis Treated at the Veterinary Medical Teaching Hospital in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, 49, 2021.

ANDERSON, B. E., DAWSON, J. E., JONES, D. C., WILSON, K. H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 29(12): 2838–2842, 1991.

ASGARALI, Z., PARGASS, I., ADAM, J., MUTANI, A., EZEOKOLI, C. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. **Ticks Tick-Borne Disease**, 3(4): 207– 211, 2012.

BANETH, G., WANER, T., KOPLAH, A., WEINSTEIN, S., KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Veterinary Record**, 138(11): 257–259, 1996.

BARRANTES-GONZÁLEZ, A. V., JIMÉNEZ-ROCHA, A. E., ROMERO-ZUÑIGA, J. J., DOLZ, G. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. **Ticks Tick-Borne Disease**, 7(6): 1245-51, 2016.

BERNDT, T. R., ECCO, L. M. J. L., SANTI, F. S. C., NETO, J. B., VASCONCELOS, A. L., MENEZES, A. M., KATAOKA, A., NOVAIS, A. A. Comparative evaluation of peripheral blood smear preparation techniques as a diagnostic method for hemoparasitosis in dogs (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758). **Scientific Electronic Archives**, 12(1): 116-123, 2019.

BORGES, K. I. N., PEREIRA, N. A., AGUIAR, D. M., TAQUES, I. I. G. G., ALVES-RIBEIRO, B. S., RAMOS, D. G. S., BRAGA, I. A. Costa Rican Genotype of *Ehrlichia canis*: A Current Concern. **Veterinary Sciences**, 10: 316, 2023.

BORIN, S., CRIVELENTI, L. Z., FERREIRA, F. A. Epidemiological, clinical, and hematological aspects of 251 dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp. morulae. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61(3): 566-571, 2009.

BOUZA-MORA, L., DOLZA, G., SOLÓRZANO-MORALES, A., ROMERO-ZUNIGA, J. J., SALAZAR-SANCHEZ, L., LABRUNA, M. B., AGUIAR, D. M. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks Tick-Borne Disease**, 8(1): 36-40, 2016.

BRAZILIAN STATISTICS INSTITUTE (IBGE). *Base Cartográfica Nacional IBGE – Escala 1250 mil* [online]. 2019 [cited 2023 Dez 04]. Available from: <https://portaldemapas.ibge.gov.br/portal.php#mapa222602>

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

DAGNONE, A. S., de MORAIS, H. S. A., VIDOTTO, M. C., JOJIMA, F. S., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, 117(4): 285–290, 2003.

DAWSON, J. E., ANDERSON, B. E., FISHBEIN, D. B., SANCHEZ, J. L., GOLDSMITH, C. S., WILSON, K. H., DUNTLEY, C. W. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 29(12): 2741-5, 1991.

DINIZ, P. P. V. P., SCHWARTZ, D. S., De MORAIS, H. S. A., BREITSCHWERDT, E. B. Surveillance for Zoonotic Vector-Borne Infections Using Sick Dogs from Southeastern Brazil. **Vector-borne Zoonotic Disease**, 7(4): 689-697, 2007.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chein. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, 28: 418–419, 1935.

FONSECA, J. P., BRUHN, F. R. P., RIBEIRO, M. J. M., HIRSCH, C., ROCHA, C. M. B. M., GUEDES, E., GUIMARÃES, A. M. Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. **Ciência Animal Brasileira**, 18: 1-9, 2017.

GEODETIC REFERENCE SYSTEM OF THE AMERICAS (SIRGAS). *Sistema Referenceamento Geocéntrico para las Américas* [online]. 2000 [cited from 2023 Dez 04]. Available from: <http://www.sirgas.org/pt/sirgas-realizations/sirgas2000/>

HARRUS, S., WANER, T., BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, 36: 431-447, 1997.

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

LU, M., TIAN, J., PAN, X., QIN, X., WANG, W., CHEN, J., WENPING, G., KUN, L. Identification of *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., and an *Ehrlichia* canis-like agent in *Rhipicephalus microplus* from Southwest and South Central China. **Ticks Tick-borne Disease**, 13(2): 101884, 2022.

MORAIS, N. C., de CASTRO, J. R., MUNDIM, A. V., BASTOS, J. E. D., FERREIRA, F. A., SOUZA, M. A., SALABERRY, S. R. S. LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Clinical and hematological aspects of dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp. and *Leptospira interrogans*. **Bioscience Journal**, 27(3): 452–459, 2011.

MOSHKOVSKI, S. D. Cytotropic inducers of infection and the classification of the Rickettsiae with Chlamydozoa. **Adv. Mod. Biol.**; 19: 1-44, 1945.

MOYA-ARAUJO, C. F., BATISTA, G. A. H., RIBEIRO, M. G., STURION, T. T., ARAÚJO, D. C., ARAÚJO, J. P. J. Correlation of clinical and hematological with definitive diagnosis of canine ehrlichiosis by PCR. **Semina: Ciências Agrárias**, 33(6): 2301-2305, 2012.

MYLONAKIS, M. E., THEODOROU, K. N. Canine monocytic ehrlichiosis: a update of diagnosis and treatment. **Acta Veterinaria Belgrade**, 67(3): 299-317, 2017.

NAVARRETE, M. G., HODZIC, A., CORONA-GONZÁLEZ, B., CORDEIRO, M. D., SILVA, C. L., BÁEZ, L. C., OBREGÓN, D., AGUIAR, D. M., CAMPOS, A. N. S., TAQUES, I. I. G. G., WU-CHUANG, A., LÓPEZ, E. R., PILOTO-SARDIÑAS, E., ABUIN-DENIS, L., FONSECA, A. H., CABEZAS-CRUZ, A. Novel *Ehrlichia canis* genogroup in dogs with canine ehrlichiosis in Cuba. **Parasites & Vectors**, 15, 295, 2022.

NEAVE, M. J., MILETO, P., JOSEPH, A., REID, T. J., SCOTT, A., WILLIAMS, D. T. Comparative genomic analysis of the first *Ehrlichia canis* detections in Australia. **Ticks & Tick-borne Disease**, 13(3): 1-11, 2022.

NELSON, R., COUTO, C. G. *Small Animal Internal Medicine*. 5. ed, Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

NEVES, E. C., DE SOUZA, S. F., DE CARVALHO, Y. K., RIBEIRO, V. M. F., MEDEIROS, L. S. Canine Monocytic Ehrlichiosis: A zoonotic disease on the rise and its diagnostic limitations in Brazil. **Medvop – Revista Científica de Medicina Veterinária**, 12(40): 1-637, 2014.

NYINDO, M., HUXSOLL, D. L., RISTIC, M., KAKOMA, I., BROWN, J. L., CARSON, C. A., STEPHENSON, E. H. Cellmediated and humoral responses of German Shepherd dogs and Bleagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, 41(2): 250-254, 1980.

PARMAR, C., PEDNEKAR, R., JAYRAW, A., GATNE, M. Comparative diagnostic methods for canine ehrlichiosis. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, 37(3): 282-290, 2013.

PAULA, W. V. F., TAQUES, I. I. G. G., MIRANDA, V. C., BARRETO, A. L. G., PAULA, L. G. F., MARTINS, D. B., DAMASCENO, A. D. , MUÑOZ-LEAL, S., SEVÁ, A. P., DANTAS-TORRES, F., AGUIAR, D. M., KRAWCZAK, F. S. Seroprevalence and hematological abnormalities associated with *Ehrlichia canis* in dogs referred to a veterinary teaching hospital in central-western Brazil. **Ciência Rural**, 52(2), 2022.

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

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

PEREIRA, M. E., CANEI, D. H., CARVALHO, M. R., DIAS, A. F. L. R., ALMEIDA, A. B. P. F., NAKAZATO, L., SOUSA, V. R. F. Molecular prevalence and factors associated with *Ehrlichia canis* infection in dogs from the North Pantanal wetland, Brazil. **Veterinary World**, 16(6): 1209–1213, 2023.

PÉREZ, M., BADOR, M., ZHANG, C., XIONG, Q., RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1078(1212): 110–117, 2006.

PIRATAE, S., SENAWONG, P., CHALERMCHAT, P., HARNARSA, W., SAE-CHUE, B. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* and the association of infections with hematological responses in naturally infected dogs in Kalasin, Thailand. **Veterinary World**, 12(1): 131-135, 2019.

PURISARN, A., WICHIANHOT, S., MANEERUTTANARUNGRO, J. C., MANGKIT, B., RAKSAJIT, W., KAEWMONGKOL, S., JARUDECHA, T., SRICHARERN, W., RUCKSAKEN, R. Molecular detection and phylogeny of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in naturally infected dogs in Central and Northeast Thailand. **Veterinary World**, 15(12): 2877–2889, 2022.

REBACK, J., JBROCKMENDEL, MCKINNEY, W., VAN DEN BOSSCHE, J., AUGSPURGER, T., CLOUD, P., HAWKINS, S., GFYOUNG, ROESCHKE, M., SINHRKS, KLEIN, A., PETERSEN, J., TRATNER, J., SHE, C., AYD, W., HOEFLE, P., NAVEH, S., GARCIA, M., SCHENDEL, J., HAYDEN, A., SAXTON, D., DARBYSHIRE, J.,

SHADRACH, R., GORELLI, M. E., LI, F., JANCAUSKAS, V., MCMASTER, A., ZEITLIN, M., BATTISTON, P., SEABOLD, S. Pandas-dev/pandas: pandas 1.3.3., 2021.

REICZIGEL, J., MAROZZI, M., FABIAN, I., ROZSA, L. Biostatistics for parasitologists – a primer to Quantitative Parasitology. **Trends in Parasitology**, 35(4): 277-281, 2019.

RODRÍGUEZ-ALARCÓN, C. A., BERISTAIN-RUIZ, D. M., OLIVARES-MUÑOZ, A., QUEZADA-CASASOLA, A., PÉREZ-CASIO, F., ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, J. A., TAPIA-ALANÍS, J., LIRA-AMAYA, J. J., RIVERA-BARRENO, R., CERA-HURTADO, O. S., IBANCOVICH-CAMARILLO, J. A., SOON-GÓMEZ, L., ADAME-GALLEGOS, J. R., FIGUEROA-MILLÁN, J. V. Demonstrating the presence of *Ehrlichia canis* DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. **Parasites & Vectors**, 13(518): 1-7, 2020.

SELIM, A., ABDELHADY, A., ALAHADEB, J. Prevalence and first molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Egyptian dogs. **Pakistan Veterinary Journal**, 41(1): 117-121, 2021.

SILVA, M. V. M., FERNANDES, R. A., NOGUEIRA, J. L., AMBRÓSIO, C. E. Canine ehrlichiosis: review of literature. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 14(2): 139-143, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L., LLUL, J., OSSO, M., HEGARTY, B., BREITSCHWERDT, E. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. **Veterinary Research**, 37(2): 231–244, 2005.

SOUSA, V. R. F., ALMEIDA, A. B. P. F., BARROS, A. L., SALES, K. G., JUSTINO, C. H. S., DALCIN, L., BOMFIM, T. C. B. Clinical and molecular evaluation of dogs with ehrlichiosis. **Ciência Rural**, 40(6): 1309-1313, 2010.

SPOLIDORIO, M. G., MINERVINO, A. H. H., VALADAS, S. S. O. B., SOARES, H. S., NEVES, K. A. L., LABRUNA, M. B., RIBEIRO, M. F. B., GENNARI, S. M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Vet.**, 22(2): 214-219, 2013.

SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS (IDSC). Perfis das cidades brasileiras [online]. 2023 [cited 2023 Dez 04]. Available from: <https://idsc.cidadessustentaveis.org.br/profiles/>

TAQUES, I. I. G. G., CAMPOS, A. N. S., KAVASAKI, M. L., ALMEIDA, S. L. H., AGUIAR, D. M. Geographic Distribution of *Ehrlichia canis* TRP Genotypes in Brazil. **Journal of Veterinary Science**, 7 (165) 1-8, 2020.

THONGSAHUAN, S., CHETHANOND, U., WASIKSIRI, S., SAECHAN, V., THONGTAKO, W., MUSIKACHAROEN, T. Hematological profile of blood parasitic infected dogs in Southern Thailand. **Veterinary World**, 13(11): 2388-2394, 2020.

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

VIEIRA, R. F. C., BIONDO, A. W., GUIMARÃES, A. M. S., SANTOS, A. P., SANTOS, R. P., DUTRA, L. H., DINIZ, P. P. V. P., MORAIS, H. A., MESSICK, J. B., LABRUNA, M. B., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 20(1): 1-12, 2011.

ZORZO, C., PEREIRA, N. A., HONGYU, K., AGUIAR, D. M. Correlation between canine biochemical analytes and TRP36 ELISA seropositivity for *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, 00: 1–7, 2023.

ZUCHI, T. L. V. L., CORASSA, L., BONETTO, G., LOPATINI, C. L., SPRICIGO, J. B., SURIAN, S. R. S., DEZEN, D. FARIA, J. L. M. Serological Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and *Leishmania infantum* in a Brazilian Canine Population. **Journal of Advanced Veterinary Research**, 10(2): 61-65, 2020.

WALDEMARIN, K. C. A., MUNDIM, A. V., BASTOS, J. E. D., CUNHA, G. N. Hematological changes in dogs (*Canis familiaris*) naturally infected with *Ehrlichia* spp. **Veterinária Notícias**, 9: 23-29, 2003.

Material suplementar 1. Distribuição do Total de Indivíduos Amostrados por Sexo, Idade, Raça e Cidade dos Cães Analisados, Frequência da Doença por Cada Parâmetro e Intervalos de Confiança (CI) utilizando o Método de Clopper-Pearson. A tabela fornece o número total de cães analisados categorizados por sexo, idade, raça e cidade, juntamente com a frequência de testes positivos para o 4Dx para cada parâmetro. Além disso, inclui os intervalos de confiança máximo e mínimo correspondentes para o índice de Clopper-Pearson, calculados com um nível de confiança de 95%.

Características Epidemiológicas	Amostragem	Frequência (%)	Intervalo de Confiança (95%)	
			Mínimo	Máximo
Sexo				
Fêmea	304	41	36	47
Macho	303	42	37	48
Idade				
Adulto	344	41	36	47
Idoso	182	55	47	62
Jovem	81	16	9	26
Raças				
Mixed-breed	250	52	46	58
Poodle	36	53	35	70
Shih-tzu	34	18	7	34
Yorkshire Terrier	32	44	26	62
German Shepherd	24	37	19	59
Labrador	23	48	27	69
Pinscher	20	35	15	59
Golden Retriever	19	26	9	51
Lhasa Apso	18	22	6	48
Chow Chow	14	71	42	92
Border Collie	13	8	0	36
Dachshund	13	31	9	61
Rottweiler	11	36	11	69
Boxer	8	37	8	75
Pitbull	7	43	20	82
French Bulldog	6	33	4	78
Akita	5	0	0	52
American Bully	5	0	0	52
Bull Terrier	5	0	0	52
Schnauzer	5	1	1	72
Siberian Husky	4	25	1	81
Spitz	4	25	1	81
Pug	4	100	40	100
Dwarf German Spitz	3	33	0	71
English Bulldog	3	0	0	71
Maltese	3	0	0	71
Basset Hound	3	33	1	91
Beagle	3	33	1	91

Brazilian Terrier	3	33	1	91
Jack Russell Terrier	2	0	0	84
Rhodesian Ridgeback	2	0	0	84
Brazilian Mastiff	2	50	1	99
Cocker Spainel	2	50	1	99
Dalmatian	2	50	1	99
Toy Poodle	2	50	1	99
Blue Heeler	2	100	16	100
White Shepherd	2	37	16	100
Afghan Hound	1	0	0	97
Cane Corso	1	0	0	97
Chihuahua	1	0	0	97
Dobermann	1	0	0	97
German Shorthaired				
Pointer	1	0	0	97
Great Dane	1	0	0	97
Kuvasz	1	0	0	97
Pekingese	1	0	0	97
Weimaraner	1	0	0	97
Australian Shepherd	1	100	2	100
Basenji	1	100	2	100
Maremma Sheepdog	1	100	2	100
Samoyed	1	100	2	100
Cidade				
Juiz de Fora	174	33	26	41
Ubá	128	53	44	62
Santos Dumont	96	48	38	58
Três Rios	62	45	32	58
Barbacena	35	20	8	37
Lima Duarte	25	48	28	69
São João Nepomuceno	23	43	23	65
Paraíba do Sul	20	45	23	68
São João Del Rei	18	22	6	48
São Lourenço	10	50	19	81
Campos dos Goytacazes	5	0	0	52
Alto Rio Doce	2	100	16	100
Bom Jardim de Minas	2	50	1	99
Campanha	2	50	1	99
Barroso	1	100	2	100
Cataguases	1	0	0	97
Cristina	1	100	2	100
Dores do Campo	1	100	2	100
Resende Costa	1	0	0	97

Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

3. CAPÍTULO 2:

Caracterização molecular de novas linhagens (16S-rDNA) de *Ehrlichia canis* do Brasil em uma perspectiva global

Resumo

Ehrlichia canis é um patógeno transmitido pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, com relevância para a saúde médico-veterinária e com considerável potencial zoonótico. Apesar de sua distribuição global, há uma escassez de estudos sobre a diversidade genética associada a essa enfermidade. Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo (1) realizar a caracterização molecular de populações de *Ehrlichia canis* encontrados em cães residentes em regiões ainda pouco exploradas do sudeste brasileiro e (2) explorar as relações filogenéticas e haplotípicas de sequências de 16S-rDNA disponíveis amostradas em hospedeiros diferentes provenientes de de cinco continentes. Os resultados revelaram uma diversidade genética notável em *Ehrlichia canis*, evidenciando variações intra e interlocalidades, e entre hospedeiros. A análise de haplótipos identificou tanto linhagens amplamente distribuídas globalmente quanto linhagens específicas de regiões geográficas. A filogenia sugeriu que a mudança de hospedeiro pode desempenhar um papel crucial na especiação e evolução da *E. canis*. Esses resultados têm importantes implicações para a compreensão epidemiológica e genética de *E. canis* em escala regional e global.

Palavras-chave: Erliquiose Monocítica Canina, sudeste brasileiro, diversidade genética, filogenia molecular, rede de haplótipos.

Introdução

A Erliquiose Canina (EC) é uma doença causada por um patógeno que é transmitido por carrapatos com importância médico-veterinária e de considerável potencial zoonótico (VIEIRA et al. 2011). Comumente ocasionada pela bactéria *Ehrlichia canis* DONATIEN & LESTOQUARD (1935), que parasita células mononucleares principalmente dos cães, tem distribuição global e seu vetor é o *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato LATREILLE (1806) (PELEG et al. 2010). Clinicamente, manifesta-se de forma multissistêmica e inespecífica (RAMAKANT et al. 2020). O seu diagnóstico pode ser realizado através de diversas abordagens, destacando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como o método mais confiável, permitindo também, a identificação de diferentes linhagens (SELIM et al. 2020). Embora *Ehrlichia canis* seja globalmente disseminada, a compreensão de sua diversidade genética permanece limitada, com poucos estudos abordando essa importante questão (AGUIAR et al., 2013; AKTAS & ÖZUBEK, 2019; HSIEH et al., 2010; LYRA-AMAYA et al., 2023). Assim, o presente estudo teve como objetivos (1) realizar a caracterização molecular de populações de *Ehrlichia canis* encontrados em cães residentes em regiões ainda pouco exploradas do sudeste brasileiro e (2) explorar as relações haplotípicas e filogenéticas de sequências de 16S-rDNA disponíveis amostradas em hospedeiros diferentes provenientes de cinco continentes.

Metodologia

Amostras de sangue de dois cães, um residente em Juiz de Fora (21°45'51"S, 43°20'59" O) e outro em Viçosa (20°45'17"S, 42°52'57"O), Minas Gerais, Brasil, previamente positivos para *Ehrlichia canis* foram coletadas por meio de venopunção e utilizadas para realizar a caracterização molecular do gene 16S-rDNA das populações de *E. canis* analisados. A amostra proveniente de Juiz de Fora foi dividida em três alíquotas por ter sido possível coletar uma quantidade maior de sangue, enquanto que a de Viçosa por sua vez, não foi alíquotada devido a disponibilidade menor de sangue. Posteriormente, todo o material foi armazenado a -20°C até o momento da extração.

A extração do DNA das amostras (quatro alíquotas) foi feita utilizando o kit DNeasy da QIAGEN, seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000, ThermoFisher), padronizadas para uma concentração de 60 ng/μL com tampão Tris-EDTA (TE, QIAGEN) e então, armazenadas em um ultracongelador (-80°C) antes de serem empregadas em reações de PCR. Após essa etapa,

as amostras foram então submetidas a duas rodadas de PCR (Nested) para amplificar o 16S-rDNA de *E. canis*. Os protocolos foram seguindo o descrito por UNVER et al. (2001), utilizando dois pares de iniciadores: A17-5'GTTTGATCCTGGCTCAG' e 817R-5'-GAGTTTAGTCTTGCGAC para o primeiro PCR, e 750F-5'TAGTCCACGCTGTAAACG' e EC3-5'ACCCTAGTCACTAACCCAAC3' para o segundo PCR. Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pelo método de Sanger, utilizando os mesmos iniciadores das reações de PCR. O sequenciamento foi conduzido no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (Brasil), em sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

Para a caracterização molecular das populações de *Ehrlichia canis* encontrados, as quatro sequências resultantes do sequenciamento foram adicionadas a um dataset contendo sequências de *E. canis* (62 sequências) e *E. chaffensis* utilizada como outgroup (5 sequências), com mais de 1.200 pares de bases (pb) e registro de localidade coletadas no banco de dados Genbank. O dataset final com 67 sequências, foi alinhado pelo MAFFT v.7.0 (KATO et al. 2019) utilizando as configurações padrão e editado no GBlocks (TALAVERA & CASTRESANA, 2007), resultando em uma matriz de 1368 pb. Além disso, uma rede de haplótipos foi construída por meio do software PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) (LEIGH & BRYANT, 2015) usando o método Median Joining. Por fim, construímos uma filogenia utilizando o Método da Máxima Verossimilhança (ML) no software RAxML (STAMATAKIS, 2014) com 400 pseudoréplicas, utilizando o melhor modelo evolutivo inferido, que foi o K2, selecionado por meio do software JModelTest (DARRIBA et al., 2012) integrado à plataforma MEGA-X (KUMAR et al., 2018).

Resultados e discussão

A Erliquiose Canina (EC) destaca-se globalmente como uma enfermidade hemoparasitária significativa, emergindo como ameaça aos cães e também sendo identificada em outros animais e seres humanos (PAULINO et al. 2018). No Brasil, *Ehrlichia* spp. é comumente identificada em todo o território nacional (PAULA et al. 2022; PEREIRA et al. 2023; ZORZO et al. 2022), embora haja uma escassez de estudos dedicados à investigação da diversidade genética dentro do gênero *Ehrlichia* (AGUIAR et al. 2013). Assim, os resultados obtidos neste estudo têm o potencial de contribuir significativamente para a compreensão da

diversidade genética de *Ehrlichia canis*, representando a primeira iniciativa a abordar as relações evolutivas da espécie em um contexto global.

A partir de quatro amostras sequenciadas de sangue de cães advindos da região sudeste do Brasil, foi possível realizar a caracterização molecular de linhagens de *Ehrlichia canis* encontrados nesta região. Essas linhagens, representadas como A1, A2 e A3 de um cão de Juiz de Fora - MG, e B1 de um cão de Viçosa - MG, foram analisadas e comparadas com outras linhagens por meio da rede de haplótipos e reconstrução filogenética. A análise de haplótipos revelou que as sequências A2 e A3 pertencem ao haplótipo Hap1, que é compartilhado por 61% das amostras e amplamente distribuído (Figura 1). A linhagem A1 corresponde ao haplótipo Hap18 e apresenta maior divergência dentre as demais linhagens brasileiras, indicando maior variação genética acumulada. Esta linhagem foi retirada do mesmo animal em que foram obtidas as sequências idênticas A2 e A3, sugerindo assim uma coinfeção de diferentes linhagens afetando um mesmo hospedeiro. Esse resultado ainda não foi observado na literatura, sendo assim de suma importância. É reconhecido que distintas linhagens de *E. canis* podem exibir diferentes patogenicidades, resultando em manifestações clínicas variadas, sendo assim, estudos que investiguem a diversidade genética em cada região tornam-se de suma relevância, visando correlacioná-los com o grau de gravidade da doença (GUTIÉRREZ et al., 2016). A linhagem B1, por sua vez, compartilha o haplótipo Hap2 com uma linhagem advinda de outro estado brasileiro (Genbank ID EF195135).

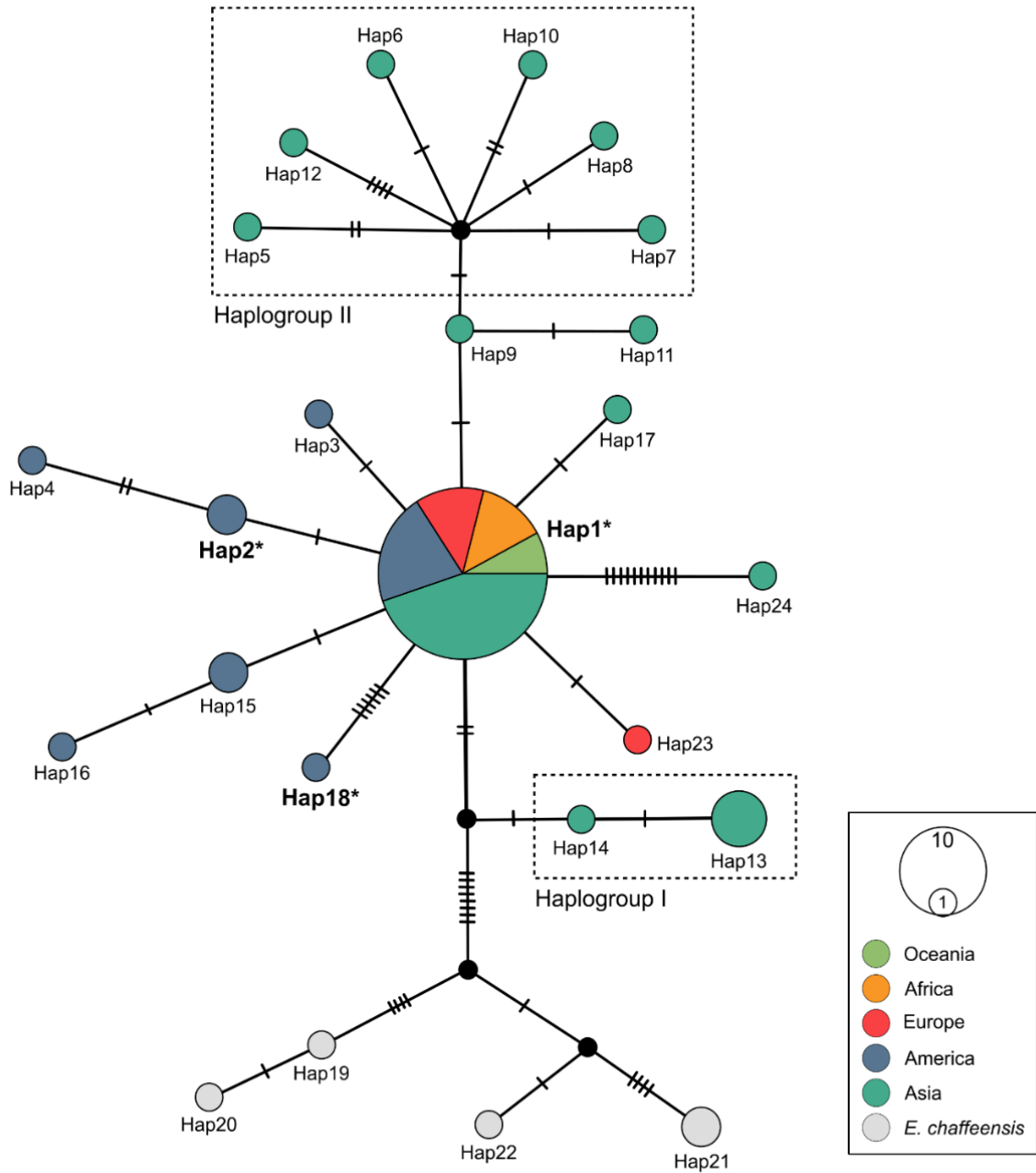
Foram recuperados um total de 24 haplótipos para o dataset analisado advindos de diferentes localidades (Figura 1). A Ásia foi o continente mais amostrado e consequentemente, com maior representatividade dentro das análises, seguido pela América. Isso evidencia a necessidade de estudos em outros continentes, visto a escassez de amostras de outras localidades, a fim de compreender como a variação genética da espécie está estruturada em *E. canis*. O haplótipo mais amostrado foi o Hap1 que agrupou 38 sequências de 5 continentes diferentes (Oceania, África, Europa, América e Ásia), incluindo duas sequências obtidas através do presente estudo (A2 e A3) e sequências derivadas da primeira descrição de *Ehrlichia canis* em humanos (Genbank ID AF373612 and AF373613). Ainda, temos que algumas linhagens que agruparam em diferentes haplogrupos possam estar evoluindo independentemente, estão restritas a alguns países como China (*Haplogroup I*) e Japão (*Haplogroup II*). Outro exemplo é o Hap2, que engloba uma das sequências aqui descritas (linhagem B1) e outra relatada para a região de São Paulo – Brasil (Genbank ID EF195135), e está próximo do haplótipo que só foi encontrado no Peru (Hap4), país que faz

fronteira com o Brasil. Esses resultados demonstram que além de existir uma linhagem disseminada mundialmente, existam também linhagens geograficamente específicas. O padrão encontrado no presente estudo, com a presença de um haplótipo amplamente disseminado e haplótipos restritos a uma região específica também foi encontrado em outros parasitos transmitidos por carrapatos ixodídeos, como *Theileria annulata* (NEHRA et al., 2022) e *Babesia gibsoni* (YIN et al., 2023).

Já na reconstrução filogenética, foi recuperado dois clados (Figura 2). O primeiro clado, A, contém cinco linhagens de *Ehrlichia canis* coletados de hospedeiro de bovinos e caprinos advindos da China. O clado B engloba as demais sequências analisadas advindas da Oceania, África, Europa, América e Ásia, e de diferentes hospedeiros, como caninos, felinos silvestres e domésticos, cervídeos e cultivo celular. Destaca-se a ampla divergência genética entre as sequências de cervídeo em relação às demais sequências que constituem o clado. Segundo a rede de haplótipos (Figura 1), esta sequência emerge do haplótipo globalmente disseminado em um possível shift de hospedeiros. A mudança de hospedeiro pode estar intimamente relacionada ao processo de especiação e evolução genômica (ZHANG et al., 2023). Porém, uma investigação mais precisa acerca da variação genética associada à mudança de hospedeiros em *E. canis* exige uma maior amostragem em diferentes organismos e a combinação com outros marcadores para análises de delimitação de espécies.

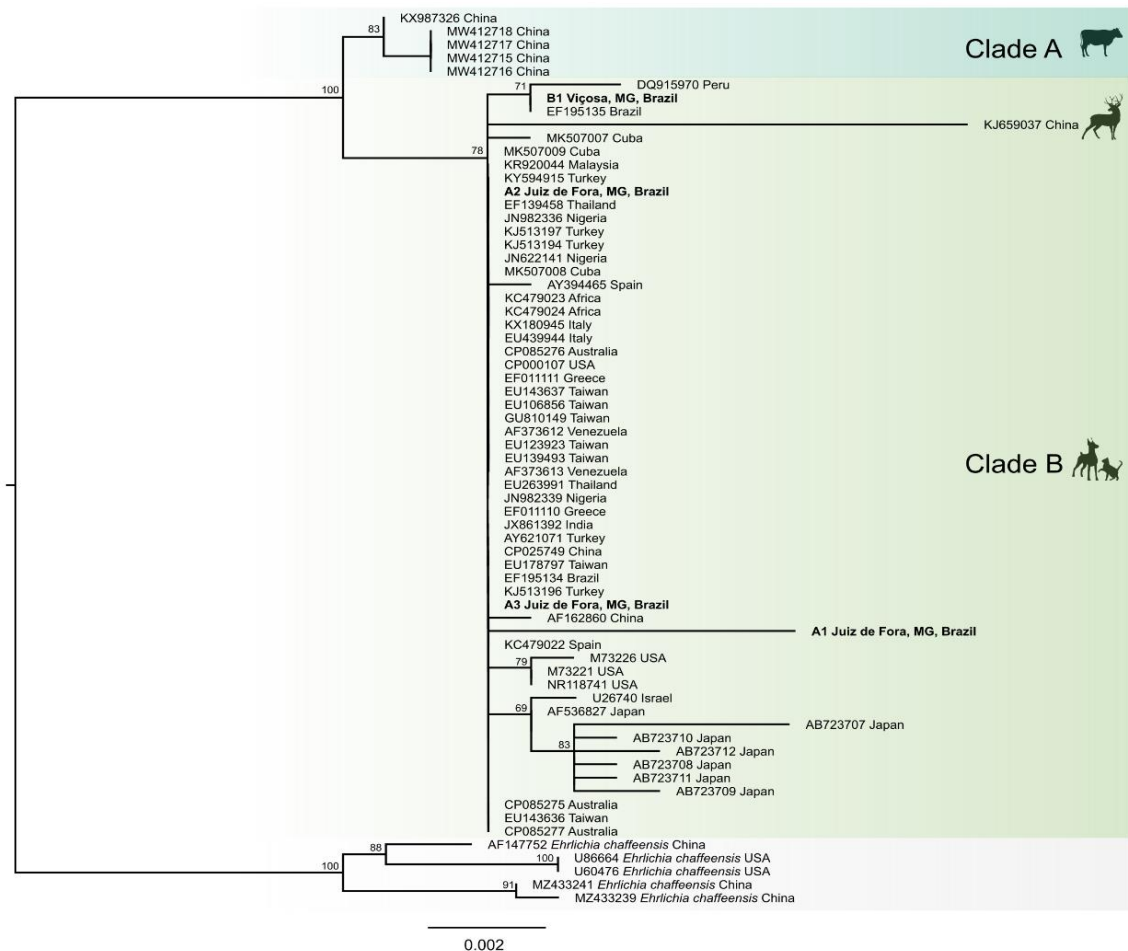
Os resultados das análises realizadas somado a diversidade genética relatada para sequências coletadas de uma mesma região, e até mesmo de um mesmo indivíduo, como a encontrada aqui, demonstra que possivelmente exista uma diversidade genética ainda desconhecida dentro do gênero *Ehrlichia*, o que tornam estudos de caracterização molecular como o aqui realizado, bastante relevantes e necessários.

Figura 1. Rede de haplótipos Median Joining de *Ehrlichia canis* usando 16S rRNA. O tamanho de cada círculo reflete o número de indivíduos que compartilham o haplótipo correspondente. Traços indicam passos mutacionais, enquanto círculos pretos denotam haplótipos não amostrados ou ancestrais.



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Figura 2. Reconstrução filogenética por Máxima Verossimilhança de *Ehrlichia canis* usando 16S-rDNA. Foram revelados dois clados: A (em azul), com cinco linhagens advindas hospedeiros bovinos e caprinos, e B (em verde), com sequências de cães, gatos e cervídeos. Os valores de suporte significativos estão acima de 65%.



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Conclusão

As análises do presente estudo revelam uma notável diversidade genética em *Ehrlichia canis*, destacando variações tanto dentro de uma mesma localidade quanto entre diferentes regiões e hospedeiros. Por meio da análise de haplótipos, foi observado não apenas uma linhagem amplamente distribuída globalmente, mas também linhagens específicas de determinadas regiões geográficas. Além disso, a filogenia indicou que a mudança de hospedeiro pode desempenhar um papel crucial no processo de especiação e evolução da *E. canis*. Esses resultados fornecem insights valiosos para a compreensão da epidemiologia e genética da patologia em níveis regional e global. Destaca-se também a limitada variabilidade

genética do marcador molecular 16S-rDNA, ressaltando a importância de utilizar marcadores mais variáveis para uma melhor delimitação dos clados entre as sequências. A homogeneidade observada no clado C sugere que essas sequências e esse marcador podem ser úteis em estudos de barcoding, o que aponta para perspectivas promissoras na taxonomia e no diagnóstico desse patógeno.

Referências

- AGUIAR, D. M., ZHANG, X., MELO, A. L. T., PACHECO, T. A., MENESES, A. M. C., ZANUTTO, M. S., HORTA, M. C., SANTARÉM, V. A., CAMARGO, L. M. A., MCBRIDE, J. W., LABRUNA, M. B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, 164, 315–321, 2013.
- AKTAS, M., OZUBEK, S. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in dogs from Turkey inferred by TRP36 sequence analysis and phylogeny. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 64, 20–24, 2019.
- DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., POSADA, D. jModel- Test 2: more models, new heuristic and parallel computing. **Nature Methods**, 9, 772, 2012.
- DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chein. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, 28: 418–419, 1935.
- GUTIÉRREZ, C. N., PÉREZ-YBARRA, L., AGRELA, I. Canine Ehrlichiosis. **Saber**, Venezuela. 28 (4), 641-665, 2016.
- HSIEH, Y., LEE, C., TSANG, C., CHUNG, Y. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, 146, 70–75, 2010.
- KATOH, K., ROZEWICKI, J., YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Brief. Bioinformatics**, 20 (4), 1160–1166, 2019.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 35, 1547–1549, 2018.

LEIGH, J. W., BRYANT, D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. Nakagawa S, editor. *Methods Ecol Evol.* 6 (9), 1110-1116, 2015.

LIRA-AMAYA, J. J., BERISTAIN-RUIZ, D.M., RACANCO-DELGADO, J., GARZA-HERNANDEZ, J. A., VITAL GARCIA, C., SANTAMARIA-ESPINOSA, M., MARTINEZ-GARCIA, G., ALVAREZ-MARTINEZ, A., QUEZADA CASASOLA, A., ROJAS-MARTINEZ, C., ALVARADO-ROBLES, B., FIGUEROA-MILLAN, J.V. Molecular Detection and Characterization of *Ehrlichia canis* Isolates from Three Geographic Regions in Mexico: A Retrospective Study. **Life**, 13, 1629, 2023.

NEHRA, A. K., KUMARI, A., KUNDAVE, V. R., VOHRA, S., RAM, H. Molecular insights into the population structure and haplotype network of *Theileria annulata* based on the small-subunit ribosomal RNA (18S rRNA) gene. **Infection, Genetics and Evolution**, 99, 105252, 2022.

PAULA, W. V. F., TAQUES, I. I. G. G., MIRANDA, V. C., BARRETO, A. L. G., PAULA, L. G. F., MARTINS, P. D. B., DAMASCENO, A. D., MUÑOZ-LEAL, S., SEVÁ, A. P., DANTAS-TORRES, F., AGUIAR, D. M., KRAWCZAK, F. S. Seroprevalence and hematological abnormalities associated with *Ehrlichia canis* in dogs referred to a veterinary teaching hospital in central-western Brazil. **Ciência Rural**, 52 (2), 2022.

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

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

PEREIRA, M. E., CANEI, D. H., CARVALHO, M. R., DIAS, A. F. L. R., ALMEIDA, A. B. P. F., NAKAZATO, L., SOUSA, V. R. F. Molecular prevalence and factors associated with *Ehrlichia canis* infection in dogs from the North Pantanal wetland, Brazil. **Veterinary World**, 16(6): 1209–1213, 2023.

RAMAKANT, KUMAR, R., VERMA, H. C., DIWAKAR, R. P. Canine ehrlichiosis: A review. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 8, 2, 1849-1852, 2020.

- SELIM, A., ABDELHADY, A., ALAHADEB, J. Prevalence and first molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Egyptian dogs. **Pakistan Veterinary Journal**, 41(1): 117-121, 2021.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, 30, 1312–1313, 2014.
- TALAVERA, G., CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and Ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, 56, 564–577, 2007.
- UNVER, A., PEREZ, M., ORELLANA, N., HUANG, H., RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, 39(8): 2788-2793, 2001.
- VIEIRA, R. F. C., BIONDO, A. W., GUIMARÃES, A. M. S., SANTOS, A. P., SANTOS, R. P., DUTRA, L. H., DINIZ, P. P. V. P., MORAIS, H. A. M., MESSICK, J. B., LABRUNA, M. B., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 20, 1, 1-12, 2011.
- ZHANG, J., HUANG, Z., FU, W., ZHANG, C., ZAN, T., NAN, P., LINFENG, L., SONG, Z., ZHANG, W., YANG, J., WANG, Y. Host shift promotes divergent evolution between closely related holoparasitic species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 186, 107842, 2023.
- ZORZO, C., PEREIRA, N. A., HONGYU, K., AGUIAR, D. M. Correlation between canine biochemical analytes and TRP36 ELISA seropositivity for *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, 00: 1–7, 2023.
- WASKOM, M. L. Seaborn: statistical data visualization. **Journal of Open Source Software**, 6, 60, p. 3021, 2021.
- YIN, F., GUO, C., TIAN, Z., LI, D., MU, D., LIU, H., GUAN, G., YIN, H., LI, F. Analysis of genetic diversity and population structure of *Babesia gibsoni*. **Frontiers in Veterinary Science**, 10, 1147958, 2024.

4. CAPÍTULO 3:

Modelagem da Distribuição de Vetores e Patógenos: Implicações na Propagação da Erliquiose Monocítica Canina

Resumo

A Erliquiose Monocítica Canina é uma doença causada pela bactéria *Ehrlichia canis* que afeta principalmente os cães e é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu latu. Apresentam uma distribuição global, no entanto, os fatores ambientais que influenciam suas ocorrências ainda não são totalmente compreendidos. Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo usar Modelagem de Nicho Ecológico para investigar nove variáveis ecológicas relacionadas à presença desses organismos na América Latina e mapear sua distribuição potencial. Os resultados revelam que os modelos de adequabilidade para *E. canis* e *R. sanguineus* s.l. apresentaram semelhanças devido à relação entre o vetor e o patógeno. As variáveis-chave para ocorrência dessas espécies foram a área urbana construída e a temperatura média do trimestre mais frio, as quais estão intimamente correlacionadas com o ciclo reprodutivo do carrapato. No entanto, notou-se uma significativa disparidade na extensão das áreas consideradas adequadas, possivelmente influenciada pela disponibilidade de registros e pelas diferentes linhagens do vetor. Portanto, é notável a importância da utilização de uma abordagem integrada, considerando não apenas a presença do vetor, mas também suas características genéticas e o ambiente circundante, para uma melhor compreensão e gestão da Erliquiose Monocítica Canina e de outras doenças transmitidas por carrapatos na América Latina.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., América Latina, Modelagem de Nicho Ecológico, MaxEnt.

Introdução

Os carrapatos desempenham um papel crucial na disseminação de doenças, sendo peças-chave para várias patologias (DANTAS-TORRES, 2010). Entre essas doenças, destaca-se a Erliquiose Monocítica Canina (EMC), causada pela bactéria intracelular Gram-negativa *Ehrlichia canis* DONATIEN & LESTOQUARD (1935), que resulta em danos graves à saúde de seus hospedeiros. Embora os cães sejam os hospedeiros mais comuns, casos foram registrados em diversos outros mamíferos, incluindo seres humanos. Esta bactéria afeta as células mononucleares dos cães, desencadeando uma variedade de sinais clínicos inespecíficos, que podem levar a complicações graves, incluindo lesões cardíacas e, em último caso, morte devido a hemorragias (VIEIRA et al., 2011). Tanto a *E. canis* quanto seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) LATREILLE (1806) possuem uma distribuição global (LIRA-AMAYA et al., 2023). Apesar de sua ampla distribuição, ainda existem lacunas na compreensão sobre a importância de fatores ambientais na ocorrência desses organismos. A Modelagem de Nicho Ecológico (MNE) surge como uma ferramenta essencial para entender as condições que determinam a distribuição de espécies como essas (TAGWIREYI et al., 2022). Portanto, este estudo teve como objetivo utilizar a MNE para investigar a relação de nove variáveis ecológicas com a ocorrência de *E. canis* e *R. sanguineus* s.l. na América Latina e assim apontar as principais áreas de risco para Erliquiose Monocítica Canina.

Materiais e métodos

Os registros de *Ehrlichia canis* foram coletados do banco de dados Global Biodiversity Information Facility (GBIF), GenBank e literatura especializada, obtida através da aplicação do algoritmo booleano 'Ehrlichia canis AND Locality OR Coordinates' nos bancos de dados Web of Science, PubMed, Scopus e Google Scholar. Para *Rhipicephalus sanguineus* s.l., empregou-se a mesma metodologia, utilizando as palavras-chave 'Rhipicephalus sanguineus' para as buscas nos bancos de dados de artigos. Além disso, para esta espécie, foram incluídos registros fornecidos pelos autores e/ou outros grupos de pesquisa. Posteriormente, os dados foram filtrados para incluir apenas registros da América Latina. As ocorrências sem coordenadas anexadas foram georreferenciadas utilizando o software Google Maps.

Para a realização das modelagens de nicho ecológico, os dados de ocorrência foram somados a nove variáveis ambientais, apontadas como significativas para a distribuição de *R. sanguineus* (PASCOE et al. 2022) (Tabela 1). As variáveis bioclimáticas foram obtidas do conjunto de dados WorldClim 2.0 (worldclim.org - acessado em 26 de janeiro de 2024), com uma resolução de aproximadamente 10 km. Já as variáveis topográficas e de uso e ocupação do solo, foram coletadas do banco de dados EarthEnv (earthenv.org - acessado em 26 de janeiro de 2024). Os pacotes "rnatualearth" e "raster" do programa R (SOUTH, 2017; HIJMANS, 2022) foram utilizados para delimitação da área de interesse.

A filtragem espacial do banco de dados foi realizada utilizando os pacotes "wallace" (KASS et al., 2018) e "sphinx" também no programa R (AIELLO-LAMMENS et al., 2019), visando reduzir o viés amostral (BORIA et al., 2014). Já modelagem foi realizada utilizando o algoritmo Maxent (PHILLIPS et al., 2006), escolhido devido à sua alta capacidade preditiva e sua ampla aceitação do meio acadêmico (KALIONTZOPOULOU et al., 2008; YACKULIC et al., 2013; ALKISHE et al., 2020; PASCOE et al., 2022). O padrão de 10.000 pontos de background foi selecionado conforme proposto por Phillips et al. (2006), utilizando o pacote "Species Distribution Models" (SDM) (NAIMI & ARAÚJO, 2016). Esse pacote também foi utilizado para realizar uma Correlação de Pearson, visando identificar qual as variáveis mais significativas para a construção dos modelos.

Dez réplicas do modelo foram geradas com uma resolução de 5 arco minutos, para a construção dessas réplicas os dados foram divididos aleatoriamente em conjuntos de treinamento (80%) e de teste (20%). O melhor modelo foi selecionado com base nos valores de AUC (Área Sob a Curva ROC) e TSS (*True Skill Statistics*) (COETZEE et al., 2009). A partir do modelo selecionado como melhor, foram gerados mapas de adequabilidade utilizando o pacote "Ggplot2" no ambiente R (WICKHAM, 2016), esses resultados em seguida foram transformados em uma camada GEOTiff, utilizando o pacote "raster", e exportados para o software QGIS 3.22 (QGIS Development Team) para a elaboração das figuras finais.

Tabela 1. Fontes das nove variáveis preditoras ambientais usadas na modelagem de distribuição de espécies de *Ehrlichia canis* e de *Rhipicephalus sanguineus* sensu latu.

Variáveis preditoras ambientais	Fonte
BIO2: Amplitude diurna média (média mensal da diferença entre temperatura máxima e mínima)	WorldClim
BIO4: Variabilidade da temperatura (desvio padrão * 100)	2.0
BIO11: Média do trimestre mais frio	dataset, 5
BIO12: Precipitação anual	arc minutis:
BIO14: Precipitação do mês mais seco	1950–2000
Classe 6: Vegetação herbácea	EarthEnv
Classe 9: Urbanização	Full version
Elevação	1.0 (with
Declividade	DISCover)
Fonte: Elaborada pelos autores (2024).	

Resultados e discussão

Os carrapatos desempenham um papel fundamental na disseminação de diversas doenças e afetam uma ampla gama de grupos animais (DANTAS-TORRES, 2010). Entre as doenças transmitidas por esses parasitos, destaca-se a Erliquiose Monocítica Canina (EMC), causada globalmente pela bactéria *Ehrlichia canis* e transmitida exclusivamente pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l., que impacta uma variedade significativa de hospedeiros (VIEIRA et al., 2011). Apesar de ser uma doença amplamente difundida e frequentemente reportada (LU et al., 2022), ainda há pouca compreensão sobre a influência dos fatores ambientais na ocorrência de *E. canis* e *R. sanguineus* s.l. Assim, os resultados obtidos neste estudo contribuem para ampliar o entendimento sobre a potencial distribuição da EMC na América Latina, ao integrar dados de ocorrência com variáveis climáticas e ambientais.

Para conduzir esta investigação, foram coletados inicialmente 843 registros de ocorrência para *Ehrlichia canis* e 3.900 para *Rhipicephalus sanguineus* s.l. na América Latina. Após uma cuidadosa filtragem dos dados, esses números foram reduzidos para 262 e 1.027, respectivamente. Na construção dos modelos de adequabilidade ecológica, nove variáveis foram testadas, das quais apenas duas mostraram-se significativas tanto para o modelo de *E. canis* quanto para o de *R. sanguineus*. Os modelos desenvolvidos indicam que, para *E. canis*, a área urbana construída (Classe 9 - 58,7%) e a temperatura média do trimestre mais frio (BIO 11 - 24,3%) são fatores determinantes para sua ocorrência. Para *R. sanguineus* s.l., um padrão

semelhante foi observado, embora com variações sutis. A área urbana construída permanece como a variável mais influente para a distribuição dessa espécie (Classe 9), seguida também pela temperatura média do trimestre mais frio (BIO 11). No entanto, sua influência é um pouco menor para esta espécie, representando 56,1% e 20,3% da variação, respectivamente.

As iterações dos modelos utilizados para investigar a adequabilidade das espécies estudadas foram realizadas através do algoritmo MaxEnt. Todas as iterações produzidas atingiram médias dos valores de AUC e TSS que são consistentes com modelos robustos (COETZEE et al., 2009; PETERSON & SOBERÓN, 2012). Para *E. canis*, os modelos alcançaram médias de 0.86 ($\pm 0,03$) e 0.61 ($\pm 0,05$) para AUC e TSS, respectivamente, enquanto que para *R. sanguineus* s.l., as médias foram de 0.85 ($\pm 0,03$) e 0.57 ($\pm 0,05$) para AUC e TSS, respectivamente.

Os resultados dos modelos para *E. canis* (Figura 1 - A) indicam que este patógeno possui uma área de adequabilidade relativamente menor em comparação com seu vetor (Figura 1 - B). As áreas de maior adequabilidade para *E. canis* são aquelas com maior concentração de centros urbanizados (Figura 2 - A, B e C) e uma média de temperatura durante o semestre mais frio do ano entre 25 a 28° Celsius (Figura 2 - D). Essas condições são predominantemente encontradas na costa oeste da Cordilheira dos Andes, no sul do México e na costa e região centro-oeste do Brasil. Em contraste, as regiões menos adequadas para este patógeno estão localizadas no norte da América Central e no sul da América do Sul (Figura 1 - A).

Os modelos relativos ao vetor, *R. sanguineus* s.l. apresentam uma abrangência mais ampla. Os resultados indicam ao menos uma adequabilidade média para quase toda a América Latina, com exceção da região sul da América do Sul, que demonstra uma baixa adequabilidade (Figura 1- B). As áreas de maior adequabilidade para essa espécie são semelhantes às identificadas para o patógeno, *E. canis*. Destacam-se a região oeste da Cordilheira dos Andes, a costa e região central do Brasil, e a região sul e costa oeste do México.

As variáveis destacadas como relevantes, Classe 9 e BIO11, para ambos os modelos são coerentes com o ciclo de vida do vetor *R. sanguineus* s.l. Este vetor possui um comportamento nidícola, o que significa que variações menores de temperatura e uma maior concentração de hospedeiros próximos ao ninho tendem a aumentar o sucesso reprodutivo desses organismos (DANTAS-TORRES et al., 2010). Essas características são

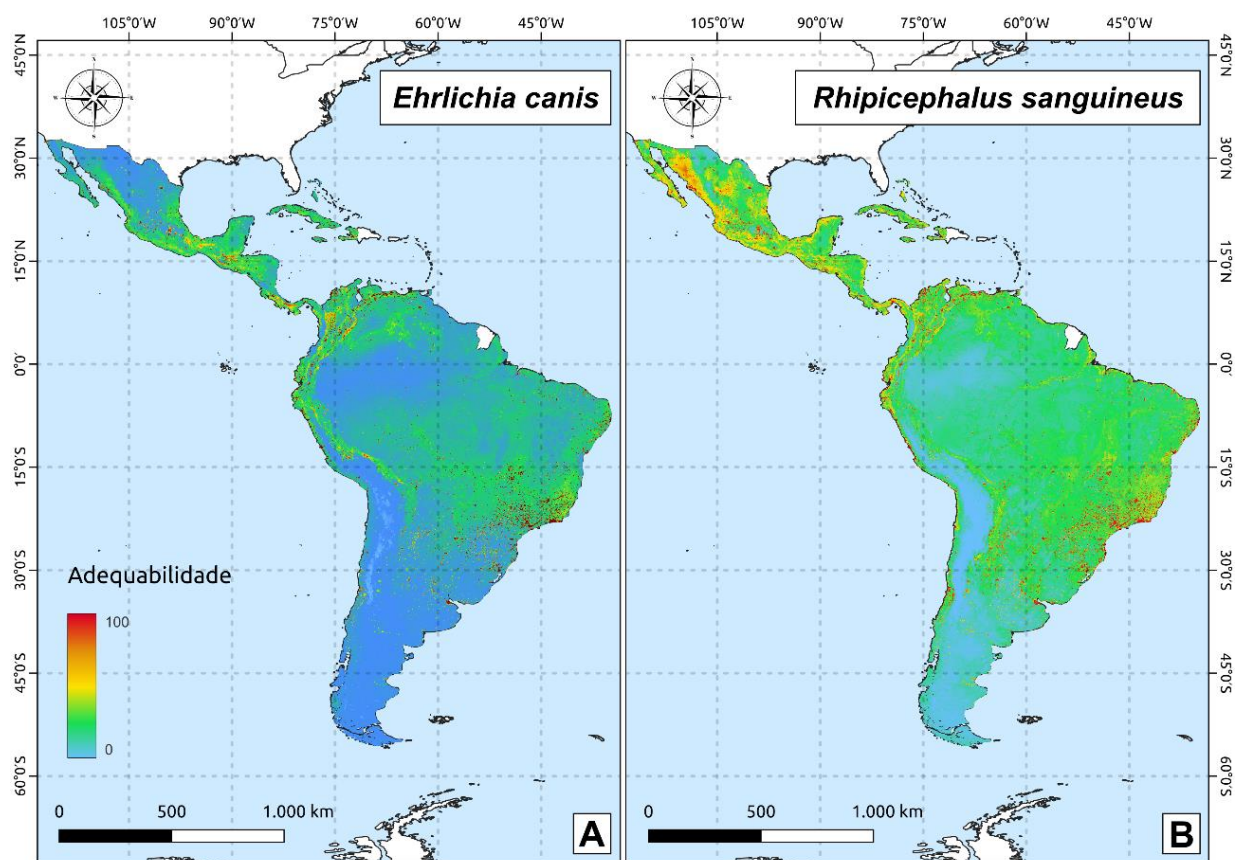
frequentemente associadas a centros urbanos ou semiurbanos (GREY et al., 2013), uma vez que tais áreas possuem uma maior concentração de possíveis hospedeiros e, devido às construções humanas, oferecem maior estabilidade térmica e disponibilidade de ninhos potenciais. A média da temperatura do trimestre mais frio, apresentada nos pontos de maior adequabilidade para essa espécie, está dentro da faixa de temperatura ideal para a reprodução desses organismos (DANTAS-TORRES et al., 2010). Além disso, o trimestre mais frio do ano na região da América Latina, geralmente associado ao período de menor pluviosidade, resulta em uma diminuição da umidade relativa e maior estabilidade, o que também pode favorecer a reprodução do vetor (PASCOE et al., 2022).

Dada a forte dependência de *E. canis* em relação ao seu vetor, *R. sanguineus* s.l., a semelhança nas áreas de maior adequabilidade identificadas para ambas as espécies pelos modelos aqui descritos é coerente. No entanto, observa-se uma notável diferença na extensão da área considerada adequada para o vetor e o patógeno. Essa disparidade pode ser explicada pela discrepância no número de registros disponíveis para cada espécie, com quase quatro vezes mais ocorrências registradas para *R. sanguineus* s.l. em comparação com *E. canis*. Além disso, para a maioria dos registros de *R. sanguineus* s.l. analisados, não há diferenciação entre as linhagens encontradas, o que pode ter influenciado os resultados, dado que tanto a linhagem tropical quanto a temperada ocorrem na América Latina, embora haja indícios de que a linhagem temperada não seja uma boa disseminadora do patógeno *E. canis* (LUZZI et al., 2021). Esta linhagem é comumente encontrada no sul do Brasil, Argentina, Chile e Uruguai, regiões apontadas como de baixa adequabilidade para *E. canis*, mas não para *R. sanguineus* s.l., conforme indicado pelos modelos apresentados aqui, o que destaca ainda mais a possível influência da linhagem na dispersão do patógeno.

Em suma, os resultados desta pesquisa fornecem informações cruciais sobre a distribuição e interação entre o patógeno *Ehrlichia canis* e seu vetor, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., na América Latina. Evidencia-se que a influência dos fatores ambientais, como a área urbana construída e a temperatura média do trimestre mais frio, desempenha um papel fundamental na ocorrência dessa doença. A análise dos modelos de adequabilidade ecológica revelou padrões consistentes de distribuição, destacando áreas-chave de maior aptidão para ambos os organismos. No entanto, é importante reconhecer que a disparidade na extensão das áreas adequadas para o vetor e o patógeno sugere uma possível influência da disponibilidade de registros e das diferentes linhagens do vetor na disseminação da doença. A predominância da linhagem temperada de *R. sanguineus* s.l. em certas regiões, apesar de ser

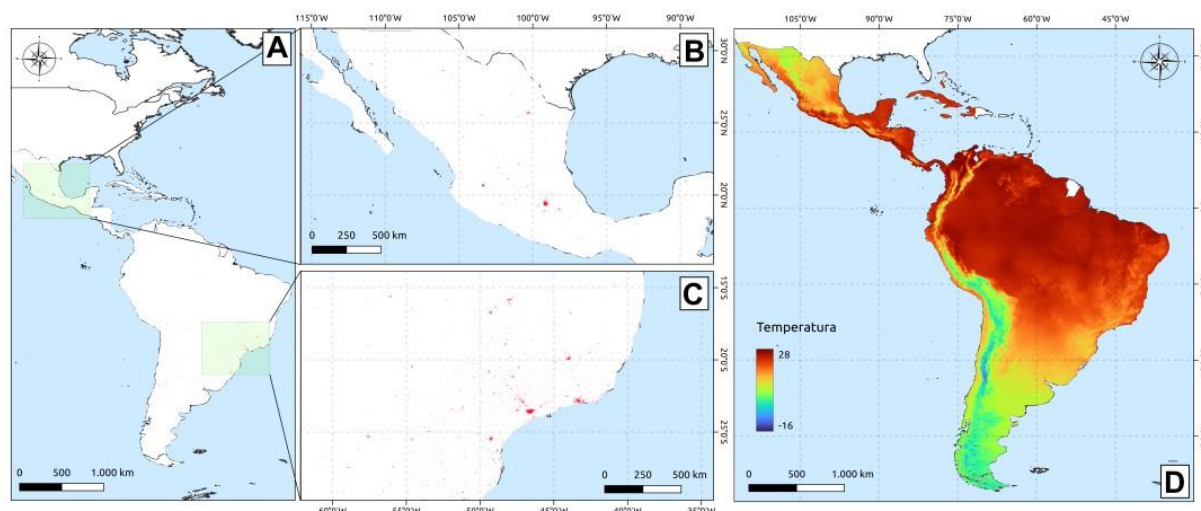
menos eficiente na transmissão de *E. canis*, sugere uma complexidade adicional na dinâmica da doença. Portanto, esses achados destacam a necessidade de uma abordagem integrada que leve em consideração não apenas a presença do vetor, mas também suas características genéticas e o ambiente circundante, para uma melhor compreensão e gestão da Erliquiose Monocítica Canina e outras doenças transmitidas por carrapatos na região latino-americana.

Figura 1. Mapas de adequabilidade projetados para *Ehrlichia canis* (A) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (B) utilizando o algoritmo MaxEnt no momento presente para a América Latina.



Fonte: Elaborada pelos autores (2024).

Figura 2. Mapa de distribuição utilizando da variável ecológica de áreas com concentração de centros urbanizados (A, B, C) e da média de temperatura durante o semestre mais frio do ano (D) para a América Latina.



Fonte: Elaborada pelos autores (2024).

Referências

- AIELLO-LAMMENS, M.E., BORJA, R.A.; RADOSAVLJEVIC, A., VILELA, B., ANDERSON, R.P., BJORNSEN, R., WESTON, S. spThin: Functions for Spatial Thinning of Species Occurrence Records for Use in Ecological Models. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/spThin/index.html> (Acesso em 13 May 2024), 2019.
- ALKISHE, A., COBOS, M. E., PETERSON, A. T., SAMY, A. M. Recognizing sources of uncertainty in disease vector ecological niche models: An example with the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Perspectives in Ecology and Conservation**, 18, 91–102, 2020.
- BORJA, R. A., OLSON, L. E., GOODMAN, S. M., ANDERSON, R. P. Spatial filtering to reduce sampling bias can improve the performance of ecological niche models. **Ecological modelling**, v. 275, p. 73-77, 2014.
- COETZEE, B. W., ROBERTSON, M. P., ERASMUS, B. F., VAN RENSBURG, B. J., THUILLER, W. Ensemble models predict Important Bird Areas in southern Africa will become less effective for conserving endemic birds under climate change. **Global Ecology and Biogeography**, v. 18, n.6, p. 701-710, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, 3:26, 2010.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chein. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, 28: 418–419, 1935.

GREY, J., DANTAS-TORRES, F., ESTRADA-PEÑA, A., LEVINE, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 4, 171– 180, 2013.

HIJMANS, R.J. Raster: Geographic Data Analysis and Modeling; R package version 3.5-15. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=raster> (Acesso em 23 Feb 2024), 2022.

KALIONTZOPOULOU, A., BRITO, J. C., CARRETERO, M. A., LARBES, S., HARRIS, D. J. Modelling the partially unknown distribution of wall lizards (*Podarcis*) in North Africa: ecological affinities, potential areas of occurrence, and methodological constraints. **Canadian Journal of Zoology**, v. 86, n. 9, p. 992-1001, 2008.

KASS, J.M., VILELA, B., AIELLO-LAMMENS, M.E., MUSCARELLA, R., MEROW, C., ANDERSON, R.P. Wallace: A flexible platform for reproducible modeling of species niches and distributions built for community expansion. **Methods in Ecology and Evolution**, 9(4),1151-1156, 2018.

LIRA-AMAYA, J. J., BERISTAIN-RUIZ, D.M., RACANCO-DELGADO, J., GARZA-HERNANDEZ, J. A., VITAL GARCIA, C., SANTAMARIA-ESPINOSA, M., MARTINEZ-GARCIA, G., ALVAREZ-MARTINEZ, A., QUEZADA CASASOLA, A., ROJAS-MARTINEZ, C., ALVARADO-ROBLES, B., FIGUEROA-MILLAN, J.V. Molecular Detection and Characterization of Ehrlichia canis Isolates from Three Geographic Regions in Mexico: A Retrospective Study. **Life**, 13, 1629, 2023.

LU, M., TIAN, J., PAN, X., QIN, X., WANG, W., CHEN, J., WENPING, G., KUN, L. Identification of Rickettsia spp., Anaplasma spp., and an Ehrlichia canis-like agent in Rhipicephalus microplus from Southwest and South-Central China. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 13(2): 101884, 2022.

LUZZI, M. C., DE CARVALHO, L. A. L., PINHEIRO, D. G., LIMA-DUARTE. L., CAMARGO, J. V., KISHI, L. T., FERNANDES, C. C., MACHADO, R. Z., SOARES, J. F., ANDRÉ, M. R., BARROS-BATTESTI, D. M. Analysis on the prokaryotic microbiome in

females and embryonic cell cultures of *Rhipicephalus sanguineus* tropical and temperate lineages from two specific localities in Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, 30(3): e005721, 2021.

NAIMI, B. & ARAUJO, M.B. “sdm”: a reproducible and extensible R platform for species distribution modelling. **Ecography**, v. 39, p. 368-375, 2016.

PASCOE, E. L., NAVA, S., LABRUNA, M. B., PADDOCK, C.D., LEVIN, M. L., MARCANTONIO, M., FOLEY, J. E. Predicting the northward expansion of tropical lineage *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks in the United States and its implications for medical and veterinary health. **PLoS ONE** 17(8): e0271683, 2022.

PETERSON, A. T., SOBERÓN, J. Species Distribution Modeling and Ecological Niche Modeling: Getting the Concepts Right. **Natureza & Conservação**, 10(2):1-6, 2012.

PHILLIPS, S.J., ANDERSON, R.P., SCHAPIRE, R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological modelling**, 190, 231–259, 2006.

SOUTH, A. Rnaturalearth: World Map Data from Natural Earth. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/rnaturalearth/index.html> (Acesso em 23 Feb 2024), 2017.

TAGWIREYI, P., NDEBELE, M., CHIKURUNHE, W. Climate change diminishes the potential habitat of the bont tick (*Amblyomma hebraeum*): evidence from Mashonaland Central Province, Zimbabwe. **Parasites & Vectors**, 15:237, 2022.

VIEIRA R. F. C., BIONDO, A. W., GUIMARÃES, A. M. S., SANTOS, A. P., SANTOS, R. P., DUTRA, L. H., DINIZ, P. P. V. P., MORAIS, H. A. M., MESSICK, J. B., LABRUNA, M. B., VIDOTTO, O. (2011) Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, 20, 1, 1-12, 2011.

YACKULIC, C.B., CHANDLER, R., ZIPKIN, E.F., ROYLE, J.A., NICHOLS, J.D., CAMPBELL GRANT, E.H., VERAN, S. Presence-only modelling using MaxEnt: When can we trust the inferences?. **Methods in Ecology and Evolution**, 4, 236–243, 2013.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag New York**, 2016.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação contribui com uma visão ampliada e inovadora sobre a Erliquiose Monocítica Canina (EMC) em nível regional e mundial, fornecendo dados sobre ¹a epidemiologia (sexo, idade, raça e localidade) da doença em cães da Zona da Mata Mineira (e cidades adjacentes), com base em dados sorológicos e hematológicos (Snap 4Dx Plus®), ²a ampla diversidade genética em *Ehrlichia canis*, com variações intra e interlocalidades, e entre hospedeiros; ³as relações filogenéticas e haplotípicas de sequências de 16S-rDNA disponíveis para *E. canis* amostradas em hospedeiros diferentes provenientes de cinco continentes; quais ⁴variáveis ecológicas estão correlacionadas com a ocorrência de *E. canis* e *R. sanguineus* s.l. na América Latina, apontando as principais áreas de risco para Erliquiose Monocítica Canina.

Iniciando com uma análise epidemiológica regional, foi possível entender os principais fatores correlacionados com a maior frequência da EMC na Zona da Mata Mineira (e cidades adjacentes), ampliando as possibilidades de investigações epidemiológicas futuras em nível nacional e mundial. Ainda em âmbito regional, foram sequenciadas novas linhagens 16S-rDNA de *E. canis* em cães da Zona da Mata Mineira, e investigada a ampla diversidade genética (filogenética e haplotípica) das linhagens desse patógeno em nível mundial, agindo localmente, mas pensando globalmente. Nesse contexto, foi desvendado pela primeira vez a ampla relação das linhagens com as diferentes espécies de hospedeiros, a baixa relação das linhagens com as localidades (países/continentes) e potencial uso do marcador 16S-rDNA como barcoding para diagnóstico de *E. canis* em cães. Com intuito de ampliar contribuição sobre a distribuição geográfica da EMC na América Latina, em estudo inédito usando modelagem de nicho climático com dados do patógeno e do vetor, foram detectados os fatores ambientais (urbanização e temperatura) mais importantes para ocorrência da EMC.

Assim sendo, a presente dissertação contribui local e globalmente para melhor entendimento da epidemiologia, diversidade genética e distribuição de *E. canis*, apresentando uma abordagem integrada e moderna sobre um patógeno veiculado por *R. sanguineus* s.l., abordagem esta que pode ser ampliada para estudo da EMC e aplicada para outros patógenos veiculados por carrapatos ao redor do mundo. Os estudos locais foram contextualizados em uma abordagem mundial, trazendo nova visão sobre a EMC, e, ressaltando a necessidade de maior colaboração internacional e investimentos em pesquisas com foco no controle e na prevenção contra essa doença, dada sua relevância tanto para a saúde pública quanto para a saúde veterinária.

6. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M., CAVALCANTE, G. T., PINTER, A., GENNARI, S. M., CAMARGO, L. M. A., LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 44(1): 126-132, 2007.
- ALKISHE, A., COBOS, M. E., PETERSON, A. T., SAMY, A. M. Recognizing sources of uncertainty in disease vector ecological niche models: An example with the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Perspectives in Ecology and Conservation**, 18, 91–102, 2020.
- AZIZ, M. U., HUSSAIN, S., SONG, B., GHOURI, H. N., ZEB, J., SPARAGANO, O. A. Ehrlichiosis in Dogs: A Comprehensive Review about the Pathogen and Its Vectors with Emphasis on South and East Asian Countries. **Veterinary Sciences**, 10, 21, 2023.
- BAI, L., GOEL, P., JHAMBH, R., KUMAR, P., JOSHI, V. G. Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in dogs in and around Hisar, Haryana, India. **Journal of Parasitic Diseases**, 41(3):647–654, 2017.
- BORIN, S., CRIVELANTI, L. Z., FERREIRA, F. A. Epidemiological, clinical, and hematological aspects of 251 dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp. morulae. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61(3): 566-571, 2009.
- BRENNER, B. G., WAINBERG, M. A. Future of Phylogeny in HIV Prevention. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 63:S248–S254, 2013.
- COSTA, L. M., REMBECK, K., RIBEIRO, M. F. B., BEELITZ, P., PFISTER, K., PASSOS, L. M. F. Seroprevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, 174(3): 673–676, 2007.
- DINIZ, P. P. V. P., SCHWARTZ, D. S., De MORAIS, H. S. A., BREITSCHWERDT, E. B. Surveillance for Zoonotic Vector-Borne Infections Using Sick Dogs from Southeastern Brazil. **Vector-borne Zoonotic Disease**, 7(4): 689-697, 2007.
- DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chein. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, 28: 418–419, 1935.

FUENTE, J., ESTRADA-PEÑA, A., RAFAEL, M., ALMAZÁN, S., BERMÚDEZ, S., ABDELBASET, A. E., KASAIJA, P. D., KABI, F., AKANDE, F. A., AJAGBE, D. O., BAMGBOSE, T., GHOSH, S., PALAVESAM, A., HAMID, P. H., OSKAM, C. L., EGAN, S. L., DUARTE-BARBOSA, A., HEKIMOGLU, O., SZABÓ, M. P. J., LABRUNA, M. B., DAHAL, A. Perception of Ticks and Tick-Borne Diseases Worldwide. **Pathogens**, 12, 1258, 2023.

GUTIÉRREZ, C. N., PÉREZ-YBARRA, L., AGRELA, I. F. Canine Ehrlichiosis. **Saber**, 28, 4: 641-665, 2016.

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

LIRA-AMAYA, J. J., BERISTAIN-RUIZ, D.M., RACANCO-DELGADO, J., GARZA-HERNANDEZ, J. A., VITAL GARCIA, C., SANTAMARIA-ESPINOSA, M., MARTINEZ-GARCIA, G., ALVAREZ-MARTINEZ, A., QUEZADA CASASOLA, A., ROJAS-MARTINEZ, C., ALVARADO-ROBLES, B., FIGUEROA-MILLAN, J.V. Molecular Detection and Characterization of *Ehrlichia canis* Isolates from Three Geographic Regions in Mexico: A Retrospective Study. **Life**, 13, 1629, 2023.

LU, M., TIAN, J., PAN, X., QIN, X., WANG, W., CHEN, J., WENPING, G., KUN, L. Identification of *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., and an *Ehrlichia canis*-like agent in *Rhipicephalus microplus* from Southwest and South Central China. **Ticks Tick-borne Disease**, 13(2): 101884, 2022.

NEVES, E. C., DE SOUZA, S. F., DE CARVALHO, Y. K., RIBEIRO, V. M. F., MEDEIROS, L. S. Canine Monocytic Ehrlichiosis: A zoonotic disease on the rise and its diagnostic limitations in Brazil. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária**, 12(40): 1-637, 2014.

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

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

PIRATAE, S., SENAWONG, P., CHALERMCHAT, P., HARNARSA, W., SAE-CHUE, B. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* and the association of infections with hematological responses in naturally infected dogs in Kalasin, Thailand. **Veterinary World**, 12(1): 131-135, 2019.

SELIM, A., ABDELHADY, A., ALAHADEB, J. Prevalence and first molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Egyptian dogs. **Pakistan Veterinary Journal**, 41(1): 117-121, 2021.

SILVA, M. V. M., FERNANDES, R. A., NOGUEIRA, J. L., AMBRÓSIO, C. E. Canine ehrlichiosis: review of literature. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 14(2): 139-143, 2011.

SPOLIDORIO, M. G., MINERVINO, A. H. H., VALADAS, S. S. O. B., SOARES, H. S., NEVES, K. A. L., LABRUNA, M. B., RIBEIRO, M. F. B., GENNARI, S. M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 22(2): 214-219, 2013.

VIEIRA, R. F. C., BIONDO, A. W., GUIMARÃES, A. M. S., SANTOS, A. P., SANTOS, R. P., DUTRA, L. H., DINIZ, P. P. V. P., MORAIS, H. A., MESSICK, J. B., LABRUNA, M. B., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 20(1): 1-12, 2011.

ZORZO, C., PEREIRA, N. A., HONGYU, K., AGUIAR, D. M. Correlation between canine biochemical analytes and TRP36 ELISA seropositivity for *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, 00: 1–7, 2023.

ZUCHI, T. L. V. L., CORASSA, L., BONETTO, G., LOPATINI, C. L., SPRICIGO, J. B., SURIAN, S. R. S., DEZEN, D. FARIA, J. L. M. Serological Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and *Leishmania infantum* in a Brazilian Canine Population. **Journal of Advanced Veterinary Research**, 10(2): 61-65, 2020.