

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2021; 11:1-16. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.29>
Artigo Original. Recebido: 09/03/2021. Aceito: 14/06/2021. Publicado: 21/06/2021. Chave: e2021-21.

Detecção molecular de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum* e alterações hematológicas em cães infectados

Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* and hematological changes of infected dogs

Octavio Merino-Charrez ^{ID}, Valeria Badillo-Moreno ^{ID}, Jorge Loredo-Osti ^{ID}, Hugo Barrios-García ^{ID}, Verónica Carvajal-de-la-Fuente* ^{ID}

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "Dr. Norberto Treviño Zapata". Universidad Autónoma de Tamaulipas, km 5, Carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, CP 87000, México. *Autor para correspondência: Verónica Carvajal-de-la-Fuente. Carretera Victoria-Mante km 5. CP. 87000, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. omerino@docentes.uat.edu.mx, valeria.badillo@live.com, jlored@docentes.uat.edu.mx, hbarrios@docentes.uat.edu.mx, vcarvajal@docentes.uat.edu.mx

RESUMO

A ehrlichiose e a anaplasmoze canina são doenças transmitidas por carrapatos causadas por bactérias dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Devido às suas múltiplas manifestações clínicas, o seu diagnóstico é um desafio para o veterinário. A distribuição destes hemoparasitas inclui áreas onde o seu principal vector, *Rhipicephalus sanguineus*, está presente. Este estudo foi concebido para determinar a presença de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum*, bem como factores associados e achados hematológicos comuns em cães no centro de Tamaulipas. Um total de 384 amostras de sangue de animais de diferentes clínicas veterinárias e dum abrigo foram avaliadas por PCR. A análise de dados foi realizada utilizando o teste Qui-quadrado com um nível de significância de 0,05. Os resultados mostram que, do número total de amostras 103 (26,8%) foram positivas para *E. canis*, enquanto que nenhum caso foi detectado para *A. phagocytophilum*. Não foi observada nenhuma associação significativa em relação ao sexo, raça ou local de origem ($p>0,05$), ao contrário da idade, onde foi encontrada uma maior prevalência de *E. canis* para adultos (15-84 meses) ($p<0,05$). Em relação ao hematócrito, contagem de plaquetas, proteína plasmática total, contagem de leucócitos e diferencial, não houve diferenças significativas ($p>0,05$).

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, PCR, valores hematológicos.

ABSTRACT

Ehrlichiosis and anaplasmosis are tick-borne diseases caused by bacteria of the genera *Ehrlichia* and *Anaplasma*. Since clinical manifestations are varied and nonspecific, the diagnosis in clinical practice, remains a challenge for veterinarians. Furthermore, the distribution of these infections includes areas where its tick vector, *Rhipicephalus sanguineus* is present. This study was designed to evaluate the prevalence and factors associated with the presence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs from the central area of Tamaulipas. PCR screened 384 canine blood samples obtained from different veterinary clinics and a shelter. The data were analyzed using the Chi-square test (P level <0.05 for statistical significance). The results showed that 103 (26.8%) out of 384 samples were positive for *E. canis*, while *A. phagocytophilum* was not detected. Statistical analysis did not show relationship between *E. canis* and variables like gender, breed, and origin ($P>0.05$). Nonetheless, there was a statistically significant difference between infected adult dogs (15-84 months) compared to other age groups evaluated ($p<0.05$). Regarding hematocrit, platelets count, plasma protein, total and differential white blood cells counts, none of these parameters were significantly different ($P>0.05$).

Keywords: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, PCR, hematological findings.

INTRODUÇÃO

A ehrlichiose e a anaplasmosose são doenças de grande importância tanto para a saúde veterinária como para a saúde pública, pois são responsáveis por doenças como a Ehrlichiose Monocítica e a Anaplasmosose Granulocítica Humana (Vieira *et al.*, 2013; Farhan 2015; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2019). São causadas por bactérias intracelulares obrigatórias Gram-negativas conhecidas como *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp respectivamente (Harrus e Waner 2011; Stuen *et al.*, 2013). Globalmente, os casos aumentaram consideravelmente nos últimos anos, principalmente em áreas tropicais e subtropicais onde os vectores de carraças (*Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes* spp.) proliferam (Beugnet e Chalvet-Monfray 2013; Irwin 2014; Little *et al.*, 2014; Battilani *et al.*, 2017). Devido à crescente proximidade das pessoas aos seus animais de estimação, a probabilidade de serem mordidos por estes ectoparasitas está a aumentar consideravelmente e estas infecções estão a tornar-se zoonoses reemergentes (Bhadesiya e Modi 2015; Ismail e McBride 2017).

No México, a Ehrlichiose canina foi relatada pela primeira vez em 1996, desde então o número de casos aumentou consideravelmente (Maggi e Krämer 2019); contudo, o diagnóstico baseia-se frequentemente em sinais clínicos sem a realização de testes laboratoriais que directa ou indirectamente corroborem a sua presença. O diagnóstico definitivo centra-se em técnicas microscópicas; contudo, estes métodos têm baixa sensibilidade e especificidade em doentes com baixa bacteremia, o que impede o estabelecimento de terapêuticas apropriadas (Harrus e Waner 2011; Allison e Little 2013). Em resposta a isto, a Polymerase Chain Reaction (PCR) surge como uma ferramenta importante para apoiar os métodos de diagnóstico convencionais (Almazan *et al.*, 2016; Cetinkaya *et al.*, 2016; de la Fuente *et al.*, 2017).

O estado de Tamaulipas, devido à sua localização geográfica, tem características ideais que favorecem o desenvolvimento da vectorização destas doenças (Tinoco-Gracia *et al.*, 2009); no entanto, desconhece-se a verdadeira magnitude deste problema. Portanto, o principal objectivo desta investigação foi determinar a presença de *E. canis* e *A. phagocytophilum*, através da PCR, em cães naturalmente infectados na área central de Tamaulipas; bem como avaliar alguns factores associados com a presença destas doenças.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O presente trabalho foi realizado com amostras de sangue de cães submetidas (durante o período de Março de 2020 a Março de 2021) ao Laboratório de Parasitologia e Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia "Dr. Norberto Treviño Zapata", pertencente à Universidade Autónoma de Tamaulipas (Universidad Autónoma de Tamaulipas). Também, com amostras de várias clínicas veterinárias privadas na capital de Tamaulipas e em alguns municípios vizinhos.

População do estudo

Foi utilizada uma amostragem não probabilística, na qual foram analisadas amostras de doentes referidos com os seguintes critérios de inclusão: 1) sendo do estado de Tamaulipas (zona central), 2) apresentando sinais clínicos relacionados com hemoparasitas (febre, diarreia, uveíte, petéquias, epistaxe, osteoarticulares, respiratórias, reprodutivas e neurológicas), 3) apresentando ou tendo estado em contacto com carrças, e 4) tendo o consentimento do proprietário do animal de estimação. O tamanho da amostra foi de 384 animais, que é o tamanho mínimo de amostra obtido a partir da fórmula de (n) para proporções populacionais infinitas, uma vez que não existe um censo da população canina na área a ser avaliada (Wayne e Chade 2013). Todos os cães foram tratados de acordo com as normas oficiais de bem-estar animal estabelecidas pelo Comité de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Autónoma de Tamaulipas.

Colección de muestras

Um mínimo de 3 ml de sangue foi obtido por punção venosa (veia cefálica) e rapidamente transferido para um tubo (BD Vacutainer®) com anticoagulante EDTA K₂ (ácido etilenodiaminotetracético potássico). As amostras foram mantidas refrigeradas (8°C) por não mais de 24 horas antes do processamento para avaliação hematológica. Uma alíquota de sangue foi armazenada em frascos de 1,5 ml e armazenada a -20°C para subsequente extracção de ADN e testes PCR. Em todos os casos, foram registados a idade, sexo, raça e época do ano em que a amostra foi retirada dos indivíduos estudados.

Análise hematológica

A determinação dos parâmetros hematológicos foi realizada imediatamente, não mais de 4 horas após a colheita de sangue para evitar alterações morfológicas das células. As amostras foram analisadas em equipamento automatizado (Auto Hematology Analyzer, MINDRAY, BC-2800 Vet; Shenzhen, China). Para a determinação das proteínas plasmáticas, foi utilizado o método do microhematócrito utilizando tubos capilares sem heparina; estes foram preenchidos com $\frac{3}{4}$ peças com sangue, seladas e centrifugadas (centrifugadora KHT-410E Kendal Import S.A.C Gemmy Taiwan) a 11.500 rpm durante 5 min. O plasma obtido foi colocado num refractómetro (Óptica americana) e foram obtidas proteínas totais. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada manualmente. O primeiro consistiu em avaliar e contar 100 células nucleadas num esfregaço de sangue (corado com Diff-Quik™) para obter a contagem percentual dos diferentes leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos. Para determinar se a anemia estava presente, o valor do hematócrito foi tido em conta e categorizado em dois grupos, com e sem anemia. As contagens de plaquetas e proteínas totais foram divididas em 2 grupos, animais com e sem trombocitopenia e com e sem a presença de hiperproteinemia respectivamente. Os leucócitos totais e as suas diferentes populações foram agrupados como normais, elevados e com contagem decrescente.

Identificação de hemoparasitas por microscopia

Para a pesquisa de hemoparasitas por microscopia, foram preparados esfregaços de sangue, fixados com metanol durante 5 min e corados com solução de Giemsa a 10% durante 15 min. Posteriormente, foram avaliadas ao microscópio múltiplas áreas aleatórias da monocamada e cauda do esfregaço com um objectivo de imersão (100x); aqui, foi procurada a presença de mórulas (agregados citoplasmáticos basofílicos) ou qualquer outro corpo de inclusão compatível com hemoparasitas (Dulmer *et al.*, 2001).

ANÁLISE MOLECULAR

Obtenção de ácidos nucleicos

A partir das alíquotas de sangue EDTA armazenadas, as extracções de ADN foram realizadas utilizando o kit comercial de extracção e purificação de ADN (Wizard[®] Genomic DNA Purification-Promega), de acordo com os protocolos estabelecidos pela empresa. O ADN total extraído foi quantificado utilizando um espectrofotómetro (NanoDrop2000[®], Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e armazenado a -20 °C até nova utilização em ensaios de PCR.

Reacção em cadeia da polimerase

Para a análise molecular, uma região do gene *GltA* (utilizado para a identificação da codificação de rickettsiae para a enzima citrato sintase) foi amplificada para *E. canis* e uma região do gene *MSP4* (complexo de superfície principal) para *A. phagocytophilum*. O kit GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, Madison, WI USA. Cat. Num. Cat.: M7122) foi utilizado de acordo com os protocolos estabelecidos pela empresa. Para isto, foram utilizados 21 µl de solução de kit, 1 µl de primário de sentido, 1 µl de primário de anti-senso e 2 µl de ADN de cada amostra para atingir um volume final de 25 µl. As amostras foram então amplificadas no termociclador (aplicado Biosystems[™] Num:2720) com o protocolo de amplificação mostrado na tabela 1. Os produtos amplificados foram analisados por electroforese de gel de agarose a 2% em 600 ml de tampão TAE, 1X (Promega, Madison, WI USA. Cat. Num: V4271) a 120 V durante 40 minutos utilizando o corante ácido nucleico corante ácido nucleico Diamond (Promega, Madison, WI USA. Cat.Num: H1181) e posteriormente visualizado sob luz UV do transiluminador UVP (Ultraviolet Products, Inc., California, USA. Cat. Num: TFM-30). Foram utilizados fragmentos de ADN de comprimento conhecido (*E. canis*, 200 bp; *A. phagocytophilum*: 980 bp) e um marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI USA. Cat. Num: G210A) como controlo positivo para referência.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleótidos utilizados para cada agente patogênico, protocolo de amplificação e tamanho do produto amplificado

Organismo e gene alvo	Sequência de oligonucleótidos (5'-3')	Programa de amplificação	Tamanho do amplificado (pb)	Referência
<i>E. canis</i> (GltA)	<i>E. canis</i> Fw ATAAACACGCTGACTTTACTGTTCC <i>E. canis</i> Rev GTGATGAGATAGAGCGCAGTACC	95°C por 5 min 94°C por 30 s 60 °C por 30 s 72 °C por 1 min 72 °C por 7 min 35 ciclos	200	Stich et al., 2002
<i>A. phagocytophilum</i> (Msp4)	MSP4AP5 ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG MSP4AP3 TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG	94°C por 5 min 94°C por 30 s 50 °C por 30 s 72 °C por 30 s 72 °C por 7 min 35 ciclos	849	Yousefi et al., 2019

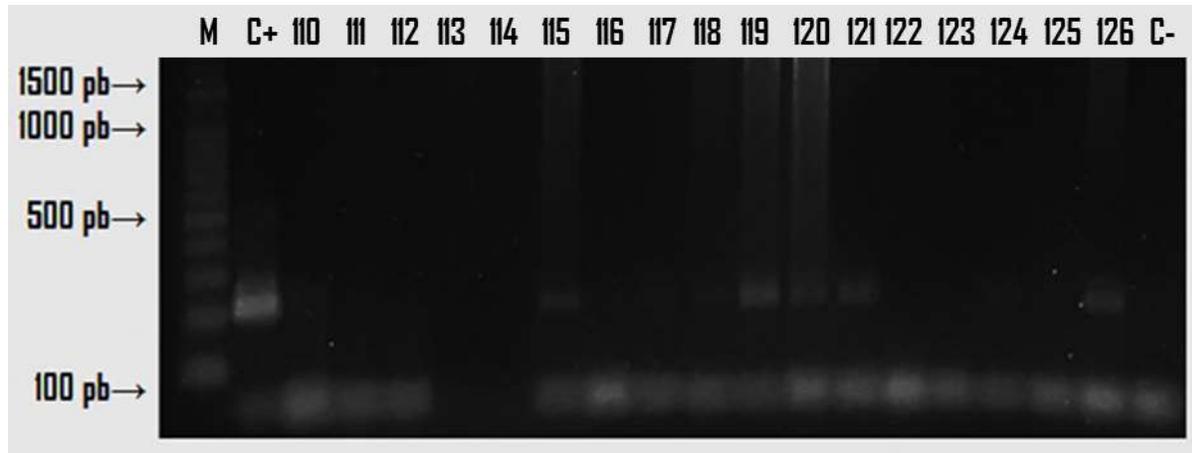
Análise estatística

Foram traçadas frequências absolutas e percentagens de casos positivos e achados hematológicos. O grau de associação entre a presença de agentes patogênicos e as variáveis avaliadas (sexo, idade, raça, época do ano e parâmetros hematológicos) foram analisados utilizando o teste de independência Chi-quadrado com um nível de significância de 0,05, utilizando o programa estatístico MedCalc. V. 7.0.

RESULTADOS

Presença de *E. canis* e *A. phagocytophilum*

Do número total de amostras testadas (384) durante o período de estudo, 103 foram positivas para *E. canis* (frequência 26,8%) pela técnica PCR, onde o gene GltA foi amplificado com um tamanho molecular esperado de 200 bp, como pode ser visto na figura 1. Dos esfregaços de sangue testados, *E. canis* foi identificado em apenas 41 das amostras testadas (10,7%). Foram observadas morulas no citoplasma de linfócitos e monócitos como estruturas redondas, de tamanho entre 4 e 6 µm de diâmetro e corando fortemente basofílica, como mostra a figura 2. Por outro lado, nenhum dos cães testados por PCR ou avaliação de esfregaço foi positivo para *A. phagocytophilum* (figura 3).



(M) Marcador de peso molecular, (C+) controlo positivo com peso molecular de 200 bp, (115, 117, 118, 119, 120, 121, 126) amostras positivas, (C-) controlo negativo com água bidestilada. 2% de gel de agarose, corado com Diamond.

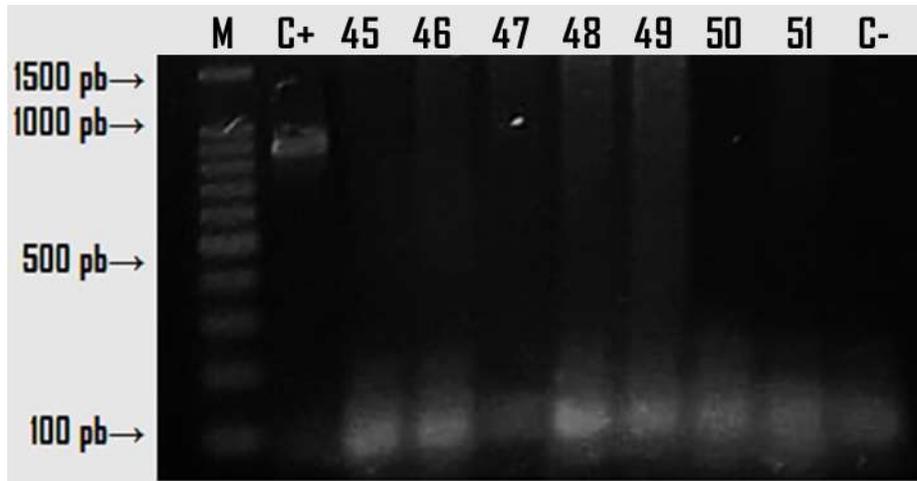
Figura 1. Amplificação por PCR de *E. canis* em amostras de sangue colhidas de caninos

Características da população canina

Foi avaliado um total de 192 fêmeas (50%) e 192 machos (50%), com idades compreendidas entre os 3 meses e os 20 anos. Os resultados observados mostram que *E. canis* não distingue entre os géneros, uma vez que dentro do grupo infectado as percentagens de mulheres (29,7) e homens (24,0) não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Ao avaliar a relação entre a idade do cão (cachorros, adultos ou idosos) e a percentagem de *E. canis* positivos, foi determinado que existe uma relação significativa entre ambas as variáveis, em que a condição do adulto (1 a 7 anos) está relacionada com a presença da doença ($p < 0,05$) (Tabela 2).



Figura 2. Linfócito do sangue periférico dum canino infectado com uma *E. canis* morula (seta). Coloração Giemsa 10%



(M) Marcador de peso molecular, (C+) controlo positivo com peso molecular de 849 bp, (45-51) amostras negativas, (C-) controlo negativo com água bidestilada. 2% de gel de agarose, corado com Diamond.

Figura 3. Amplificação por PCR de *A. phagocytophilum* em amostras de sangue colhidas de caninos

Os cães de raça pura representavam 81% (311/384) da população do estudo e os mestiços constituíam 19% (73/384); no entanto, o teste de independência de qui-quadrado não encontrou diferença estatística significativa entre *E. canis* resultado positivo em relação a grupos raciais definidos e mestiços ($p > 0,05$) (Tabela 2). Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças significativas entre a presença da Ehrlichiose e a época do ano (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências e percentagens de *E. canis* positivos e negativos agrupados por característica animal e época do ano

Variável	Presença de <i>E. canis</i>				Valor de p
	Positivo		Negativo		
	Frequência	%	Frequência	%	
Sexo					0.205
Macho	42	24.0	146	76.0	
Fêmea	57	29.7	135	70.3	
Idade					0.016
Cachorrinho (0-12 meses)	16	22.2	56	77.8	
Adulto (1 a 7 anos)	69	32.5	143	67.5	
Sênior (>7 anos)	18	18.0	82	82.0	
Raça					0.981
Mestiço	19	26.0	54	74.0	
Da raça	84	27.0	227	73.0	
Época do ano					0.816
Primavera- -Verão	71	26.3	199	73.7	
Outono - Inverno	32	28.1	82	71.9	

Variáveis hematológicas

Em relação aos resultados laboratoriais para cães *E. canis* positivos, não houve diferenças significativas nos que mostraram anemia, trombocitopenia ou hiperproteinemia em relação aos animais negativos, muitos dos quais mostraram percentagens semelhantes às do grupo infectado ($p>0,05$). Por outro lado, foram encontradas diferenças significativas para alguns parâmetros dos glóbulos brancos, tais como contagem total de leucócitos e neutrófilos ($p<0,05$). No entanto, para estes analistas, o maior número de cães infectados com *Ehrlichia* foram os que apresentavam valores dentro dos intervalos de referência, em comparação com os animais que apresentaram resultados negativos, o que mostrou um grande número de cães com leucocitose ou neutrofilia. Para o resto dos parâmetros hematológicos avaliados, o teste estatístico não encontrou diferenças significativas ($p>0,05$), como se pode ver na tabela 3.

DISCUSSÃO

Actualmente, a ehrlichiose canina e a anaplasose ganharam mais importância a nível mundial, o que é principalmente atribuído ao facto de o seu vector (*Rhipicephalus sanguineus*) ser considerado a espécie de carraça com a distribuição geográfica mais ampla (Aguiar *et al.*, 2007; Parola *et al.*, 2013; Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). Neste trabalho de investigação, verificou-se que do número total de cães testados (384), 103 foram positivos para *E. canis* (26,8%) pela técnica de PCR e apenas 41 (10,7%) pela avaliação de esfregaços de sangue. Esta discrepância dos 2 métodos utilizados é semelhante à relatada por Happi *et al.*, (2018), que de um total de 116 amostras de cães apenas 10,3% foram positivos por microscopia, em comparação com a técnica PCR, onde foram obtidos 42 resultados positivos (36,2%). Estes resultados eram de esperar, pois embora o diagnóstico por visualização microscópica das típicas inclusões intracelulares ou morules dentro do citoplasma de monócitos ou linfócitos em esfregaços de sangue periférico (figura 3) tenha sido de grande importância; Esta técnica tem certas desvantagens, tais como falta de sensibilidade durante a fase inicial da infecção, quando há baixa bacteremia, ou quando a bactéria se multiplica em microcolónias intracitoplasmáticas em órgãos linfóides onde adquirirá mecanismos que asseguram a evasão da resposta imunitária dentro da célula hospedeira (Bai *et al.*, 2017; Manasa *et al.* 2017; McClure *et al.*, 2017; Tominello *et al.*, 2019; Franco-Zetina *et al.*, 2019). Além disso, foram relatados falsos negativos em casos crónicos ou transitórios, porque as morules desaparecem geralmente cinco a oito dias após a infecção, como revelado em estudos experimentais em cães e bovinos (Gal *et al.*, 2008; Stuen *et al.*, 2013).

No México, estas doenças são frequentemente sub-diagnosticadas, com poucos estudos a determinar a sua prevalência. Em 2009 em Yucatan, foi registada uma seroprevalência da ehrlichiose canina de 45% (Jiménez-Coello *et al.*, 2009) e noutro estudo envolvendo 28 estados do México, onde a presença de anticorpos contra *Anaplasma* spp, *Borrelia*

burgdorferi e *E. canis*; registrando uma elevada prevalência para *E. canis* (55%) e moderada para *Anaplasma* spp (16,4%), para alguns estados do nordeste como Coahuila e Nuevo León (Movilla *et al.*, 2016). Geograficamente, os animais que participaram neste estudo pertencem à área nordeste do México; contudo, se compararmos a prevalência obtida na área central de Tamaulipas para *E. canis* (26,8%) com estes dois estados, seria muito inferior. No entanto, é importante mencionar que foram utilizados testes serológicos neste estudo, o que pode ter a desvantagem de se cruzar com outros microrganismos estreitamente relacionados, sobrestimar os resultados da prevalência e aumentar a necessidade de estudos com técnicas moleculares que permitam evidências mais precisas do tipo de patógeno envolvido (Cetinkaya *et al.*, 2016).

Tabela 3. Frequências e percentagens de *E. canis* positivos e negativos agrupados por séries vermelhas e plaquetas

Variável	Presença de <i>E. canis</i>				Valor de p
	Positivo		Negativo		
	Frequência	%	Frequência	%	
Hematócrito					0.280
Anemia (< 0,37 L/L)	49	24.3	153	75.7	
Sem anemia (≥0.37 L/L)	54	29.7	128	70.3	
Proteína de Plasma					0.739
Sem hiperproteinemia (<75 g/L)	45	25.7	130	74.3	
Com hiperproteinemia (>75 g/L)	58	27.8	209	72.2	
Plaquetas					0.946
Trombocitopenia (<180X10 ⁹ /L)	6	28.6	15	71.4	
Sem trombocitopenia (≥180X10 ⁹ /L)	97	26.7	266	73.3	
Leucócitos					0.005
Leucopenia (<6x10 ⁹ /L)	3	15.8	16	84.2	
Normal (6-17x 10 ⁹ /L)	71	33.3	142	66.7	
Leucocitose (>17x10 ⁹ /L)	29	19.1	123	80.9	
Monócitos					0.060
Sem Monocitose (≤1.4x10 ⁹ /L)	31	21.1	116	78.9	
Monocitose (>1,4x10 ⁹ /L)	72	30.4	165	69.6	
Linfócitos					0.235
Linfocitose (>4,8x10 ⁹ /L)	12	18.5	53	81.5	
Normal (1,0-4,8x10 ⁹ /L)	72	28.1	184	71.9	
Linfopenia(<1,0x10 ⁹ /L)	19	30.2	44	69.8	
Neutrófilos segmentados					0.004
Neutropenia (<3,0 x10 ⁹ /L)	30	18.4	133	81.6	
Normal (3,0-11,5x10 ⁹ /L)	70	33.8	137	66.2	
Neutrofilia (>11,5x10 ⁹ /L)	3	21.4	11	78.6	
Eosinófilos					0.575
Sem eosinofilia (<0,9x10 ⁹ /L)	90	26.2	253	73.8	
Com Eosinofilia (>0,9x10 ⁹ /L)	13	31.7	28	68.3	

Em 2019, foi realizado um estudo de detecção molecular de *E. canis* em zonas rurais de Yucatan, encontrando uma prevalência de 29,26% (Ojeda-Chi et al., 2019), que se aproxima da registada neste trabalho (26,8%); mas muito mais elevada em comparação com a prevalência encontrada em cães testados na Comarca Lagunera (4%) (Almazán et al., 2016).

As infecções por *A. phagocytophilum* têm sido cada vez mais diagnosticadas em animais de companhia e de criação em todo o mundo (McMahan et al., 2016). No México, *A. phagocytophilum* foi detectado em opossuns e cães no estado de Campeche, com uma prevalência de 3 e 27%, respectivamente (Rojero et al., 2017); no entanto, neste trabalho nenhum dos cães testados foi positivo por PCR ou esfregaço de sangue. Isto não é surpreendente, uma vez que *Ixodes* spp. e *Dermacentor* spp., carrças pouco frequentes na área de estudo, foram reconhecidos como os vectores mais importantes no ciclo de transmissão desta bactéria, o que pode ter contribuído para a sua presença nula (Tinoco-García et al., 2009; Guzmán-Cornejo et al., 2016; Rodríguez-Vivas et al. 2019).

Os resultados observados nesta investigação mostram que *E. canis* não tem predileção pelo género, uma vez que dentro do grupo infectado as percentagens de mulheres (29,7) e homens (24,0) não foram estatisticamente significativas ($p > 0,005$). Esta mesma variável foi estudada por vários autores (Nuñez, 2003; Rodríguez-Vivas et al., 2005), encontrando resultados semelhantes. Contudo, isto discorda do que tem sido relatado por outros investigadores, onde argumentam que as fêmeas, especialmente durante o cio, gravidez ou parto, favorecem o risco de contrair infecções de *E. canis* (Salazar et al., 2014; Abdelfattah et al., 2021).

Em relação aos achados hematológicos associados à presença de ehrlichiose canina e anaplasmose, foi relatado que estas alterações dependerão da fase da doença (Afusat et al., 2020). Durante a fase aguda, a presença de anemia é comum, que é normalmente ligeira a moderada (normalmente normocítica, normocrómica, não regenerativa) (Eberts et al., 2011).

Neste trabalho, a presença de anemia não foi significativamente associada a nenhuma das doenças. A trombocitopenia tem sido um achado hematológico tradicionalmente associado à ehrlichiose canina (Piratae et al., 2019). Contudo, neste estudo, a presença de trombocitopenia (< 200.000) não teve qualquer associação com animais *E. canis* positivos. Vários estudos relataram uma associação entre a contagem de plaquetas e a presença de *E. canis*, particularmente em animais com contagem de células plaquetárias inferior a $100 \times 10^9/L$ (Bulla et al., 2004; Tngsahuan et al., 2020). Embora muitos animais com anemia e hiperproteinemia tenham sido notificados neste estudo, não existe associação estatística significativa quando comparados com animais que apresentaram resultados negativos; isto pode ser devido à possível presença de outros hemoparasitas como *Ehrlichia ewingii* ou *Anaplasma platys*, que podem produzir graus de anemia e

hiperproteïnemia semelhantes aos notificados em cães infectados com *E. canis* (Piratae *et al.*, 2019).

Por outro lado, é possível que muitos dos indivíduos *E. canis* positivos com resultados hematológicos inalterados possam ter estado na fase subclínica da doença; esta última seria de grande importância como se a doença não fosse detectada durante esta fase poderia progredir para uma fase crônica, produzindo danos irreversíveis graves, tais como trombocitopenia, leucopenia e anemia não regenerativa grave resultante da supressão da medula óssea (Little *et al.*, 2014).

Quanto à avaliação do hemograma, observa-se que apesar da existência de diferenças significativas entre os casos *E. canis* negativos e positivos para a contagem total de leucócitos, neutrófilos e monócitos, os resultados não foram os esperados, pois verificou-se que os cães negativos tiveram mais alterações nestas células (ou aumentaram ou diminuíram) em comparação com os positivos. Estas descobertas são consistentes com os resultados obtidos por Asgarali e colaboradores (2012), que relataram que cães com Ehrlichiose apresentavam níveis de neutrófilos e monócitos dentro dos intervalos de referência, em contraste com os animais negativos, que tiveram um aumento significativo de neutrófilos e monócitos. Uma possível explicação para o facto de muitos dos cães positivos não terem tido alterações na contagem de glóbulos brancos é que estes animais podem ter estado na fase subclínica da doença, onde a maioria é assintomática e não apresentam alterações hematológicas significativas (de Castro *et al.*, 2004).

CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que as alterações hematológicas avaliadas em cães com suspeita de *Ehrlichia canis* não eram específicas, uma vez que um grande número destes animais não estava infectado. Por outro lado, muitos dos cães que deram resultados positivos permaneceram sem alterações aparentes no seu hemograma, o que é de grande relevância, uma vez que estes indivíduos, se não forem diagnosticados precocemente, podem ser reservatórios para outros hospedeiros, incluindo humanos. Além disso, o clínico veterinário deve considerar que estas doenças podem ser subclínicas sem sinais ou com a presença de co-infecções que produzam sinais semelhantes, o que tornaria difícil o diagnóstico e, portanto, o tratamento adequado. Sugere-se mais investigação, incluindo a detecção de outras espécies de hemoparasitas na região, devido à sua importância como agentes potencialmente zoonóticos.

AGRADECIMENTOS

Ao Projecto PRODEP Nº 511-6/2019.-13905 intitulado "Provas moleculares de agentes patogénicos transmitidos por carraças e a sua associação com alterações hematológicas em caninos naturalmente infectados no Cd. Victoria, Tam., México" concedido pela Promoção da Geração e Aplicação Inovadora do Conhecimento (GAC) como parte do Apoio à reincorporação de ex-bolsistas.

LITERATURA CITADA

ABDELFATTAH S, Alanazi AD, Alireza S, Domenico O. 2021. Seroprevalence and associated risk factors for vector-borne pathogens in dogs from Egypt. *Parasit Vectors*. 14:175. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04670-0>

AFUSAT JJ, Obokparo GO, Oluwafemi AA, Latifat AA. 2020. Haematology and serum chemistry in clinical canine ehrlichiosis. *Vom Journal of Veterinary Science*. 15(1):61-66. <https://www.researchgate.net/publication/346785733>

AGUIAR DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LMA, Labruna MB. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 44:126-132. <https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.126>

ALLISON RW, Little SE. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*. 42:127-144. <https://doi.org/10.1111/vcp.12040>

ALMAZÁN C, Gonzalez-Alvarez VH, de Mera IGF, Cabezas-Cruz A, Rodríguez-Martínez R, de la Fuente J. 2016. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7:276-283. <https://doi:10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>

ASGARALI Z, Pargass I, Adam J, Mutani A, Ezeokoli. 2012. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. *Ticks and Tick Borne Diseases*. 3(4): 207-211. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.03.006>

BAI L, Goel P, Jhambh R, Kumar P, Joshi V G. 2017. Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in dogs in and around Hisar, Haryana, India. *J Parasit Dis*. 41(3): 647-54. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0860-8>

BATTILANI M, De Arcangeli S, Balboni A, Dondi F. 2017. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection Genetics and Evolution*. 49:195-211. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017>

BEUGNET F, Chalvet-Monfray K. 2013. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 36:559–566. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.003>

BHADESIYA CM, Modi DV. 2015. Correlation of epidemiology of *Rhipicephalus sanguineus* and canine ehrlichiosis in nine different localities of middle Gujarat. *International Agricultural Science and Veterinary Medicine*. 3(1): 2320-3730. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.740.420&rep=rep1&type=pdf>

BULLA C, Kiomi R, Pessoa J, Trinca LA, Souza R, Wiedmeyer CE. 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*. 35:141-146. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003038>

CABEZAS-CRUZ A, Allain E, Ahmad AS, Saeed MA, Rashid I, Ashraf K, Estrada-Peña A. 2019. Low genetic diversity of *Ehrlichia canis* associated with high co-infection rates in *Rhipicephalus sanguineus* (sl). *Parasites & Vectors*. 12:12. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3194-9>

CETINKAYA H, Matur E, Akyazi I, Ekiz EE, Aydin L, Toparlak M. 2016. Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. *Ticks and Tickborne Diseases*. 7:706-714. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.021>

DE CASTRO MB, Machado RZ, de Aquino LP, Alessi AC, Costa MT. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol*. 119:73-86. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2003.10.012>

DE LA FUENTE J, Antunes S, Bonnet S, Cabezas-Cruz A, Domingos AG, Estrada-Peña A, et al. 2017. Tick-pathogen interactions and vector competence: identification of molecular drivers for tick-borne diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 7:114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>

DUMLER JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(6):2145-2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

EBERTS MD, Vissotto de Paiva Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. 2011. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 47:86-94. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5578>

FARHAN AA. 2015. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol Res*. 114(11):3941-57. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2>

FRANCO-ZETINA M, Adame-Gallegos J, Dzul-Rosado K. 2019. Effectivity of diagnostic methods for the detection of human and canine monocytic ehrlichiosis. *Rev. Chilena Infectol*. 36(5):650–655. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000500650>

GAL A, Loeb E, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. 2008. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Journal*. 175:212-217. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2007.01.013>

GUZMÁN-CORNEJO C, Robbins RG, Guglielmone AA, Montiel-Parra G, Rivas G, Pérez TM. 2016. The Dermacentor (Acari, Ixodida, Ixodidae) of Mexico: hosts, geographical distribution and new records. *ZooKeys*. 569:1-22. <https://doi.org/10.3897/zookeys.569.7221>

HAPPI AN, Toepp AJ, Ugwu CA, Petersen CA, Sykes JE. 2018. Detection and identification of blood-borne infections in dogs in Nigeria using light microscopy and the polymerase chain reaction. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 11: 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.12.002>

HARRUS S, Waner T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*. 187:292-296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>

IRWIN PJ. 2014. It shouldn't happen to a dog ... or a veterinarian: clinical paradigms for canine vector-borne diseases. *Trends Parasitology* 30:104–12. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.001>

ISMAIL N, McBride JW. 2017. Tick-borne emerging infections: ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine*. 37:317-340. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.006>

JIMÉNEZ-COELLO M, Pérez-Osorio C, Vado-Solís I, Rodríguez-Buenfil JC, Ortega-Pacheco A. 2009. Serological survey of *Ehrlichia canis* in stray dogs from Yucatan, Mexico, using two different diagnostic tests. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 9:209-212. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0039>

LITTLE E, Beall MJ, Bowman DD, Chandrashekar R, Stamaris J. 2014. Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2010-2012. *Parasites & Vectors*. 7:1-9. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-257>

MAGGI RG, Krämer F. 2019. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasitic Vectors*. 12:145. doi: [10.1186/s13071-019-3407-x](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x)

MANASA RK, Pritpal SD, Lachhman DS, Baljinder KB, and Sanjeev KU. 2017. Clinical and hematobiochemical response in canine monocytic ehrlichiosis seropositive dogs of Punjab. *Veterinary World*. 10(2): 255–261. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.255-261>

MCCLURE EE, Chávez ASO, Shaw DK, Carlyon JA, Ganta RR, Noh SM, Wood DO, Ba voil PMA, Brayton KA, Martinez JJ, McBride JW, Valdivia RH, Munderloh UG, Pedra JHF. 2017. Engineering of obligate intracellular bacteria: progress, challenges and paradigms. *Nat Rev Microbiol*. 15:544–558. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.59>

MCMAHAN CS, Wang D, Beall MJ, Bowman DD, Little SE, Pithua PO, Julia L, Sharp JL, Stich RW, Yabsley MJ, Lund RB. 2016. Factors associated with *Anaplasma* spp. seroprevalence among dogs in the United States. *Parasites & Vectors*. 9:169. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1431-7>

MOVILLA R, García C, Siebert S, Roura X. 2016. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. *Parasites & Vectors*. 9:421. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1686-z>

NÚÑEZ OL. 2003. Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies*. 14:83-85. <https://www.researchgate.net/publication/291003826>

OJEDA-CHI MM, Rodriguez-Vivas RI, Esteve-Gasent MD, Pérez de León A, Modarelli JJ, Villegas-Perez SL. 2019. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 67:101351. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101351>

PAROLA P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*. 26:657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>

PIRATAE S, Senawong P, Chalermchat P, Harnarsa W, Sae-chue B. 2019. 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*. 12:131. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.131-135>

RODRÍGUEZ-VIVAS RI, Albornoz REF, Bolio GME. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology*. 127:75-79. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2004.08.022>

RODRÍGUEZ-VIVAS RI, Ojeda-Chi MM, Bolio-González ME, Rosado-Aguilar JA. 2019. Las garrapatas como vectores de enfermedades zoonóticas en México. *Bioagrocencias*. 12(1):19-26. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/BAC/article/view/2993>

ROJERO-VÁZQUEZ R, Gordillo-Pérez G, Weber M. 2017. Infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. in opossums and dogs in Campeche, Mexico: the role of tick infestation. *Frontiers in Ecology Evolution*. 5:161. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00161>

SALAZAR H, Edwin F, Buriticá EF, Echeverry DF, Barbosa I. 2014. Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* y su relación con algunos parámetros clínicos y hematológicos en caninos admitidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 7 (1):56-63. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/ciencianimal/article/view/542>

STICH RW, Rikihisa Y, Ewing SA, Needham GR, Grover DL, Jittapalapong S. 2002. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:540-546. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.540-546.2002>

STUEN S, Granquist EG, Silaghi C. 2013. *Anaplasma phagocytophilum* a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3:31. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00031>

TINOCO-GRACIA L, Quiroz-Romero H, Quintero-Martinez MT, Renteria-Evangelista TB, Gonzalez-Medina Y, Barreras-Serrano A, *et al.* 2009. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Veterinary Record*. 164:59-61. <https://doi.org/10.1136/vr.164.2.59>

TOMINELLO TR, Oliveira ERA, Hussain SS, Wells AEJ, Golden B, Ismail N. 2019. Emerging roles of autophagy and inflammasome in ehrlichiosis. *Front Immunol*. 10:1011. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01011>

TNGSAHUAN S, Chethanond U, Wasiksiri S, Saechan V, Thongtako W, Musikacharoen T. 2020. Hematological profile of blood parasitic infected dogs in Southern Thailand. *Vet World*. 13(11): 2388-2394. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2388-2394>

VIEIRA RFDC, Vieira TSWJ, Nascimento, DDAG, Martins TF, Krawczak FS, Labruna MB, Vidotto O. 2013. Serological survey of Ehrlichia species in dogs, horses, and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 55:335-340. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500007>

WAYNE WD, Chad LC. 2013. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 10th Edition Wiley. Pp. 191. ISBN 978-1-118-30279-8.

YOUSEFI A, Chaechi Nosrati MR, Golmohammadi A, Azami S. 2019. Molecular Detection of *Anaplasma Phagocytophilum* as a Zoonotic Agent in Owned and Stray Dogs in Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute*. 74:33-38. <https://doi.org/10.22092/ARI.2018.114893.1142>