
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* EM CÃES DE GOIÂNIA, BRASIL

Sabrina Castilho Duarte¹, Juliana Alves Parente² e Guido Fontgalland Coelho Linhares³

RESUMO

Ehrlichia canis é um parasito bacteriano intracelular obrigatório, agente da Erliquiose Monocítica Canina. O método de diagnóstico laboratorial de rotina é realizado pela demonstração microscópica direta das inclusões intraleucocitárias. Mais recentemente a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi introduzida como um método para aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de *Ehrlichia* em cães na cidade de Goiânia, Goiás, por métodos de diagnóstico molecular. Para o estudo, foram obtidas 40 amostras de sangue de cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás. Todas as amostras, após a extração de DNA, foram testadas pela PCR empregando-se oligonucleotídeos gênero-específicos e, posteriormente, espécie-específicos para o gene 16S rRNA. Em seguida, foi realizada a purificação do produto de PCR espécie-específico para a realização de sequenciamento. Destas, 17 mostraram-se PCR positivas tanto nas reações para gênero quanto para a espécie *E. canis*. Os produtos de PCR foram sequenciados e as sequências com melhor qualidade (n=5) foram escolhidas para estudos subsequentes. A análise de similaridade pelo BLASTn demonstrou correspondência com a espécie *Ehrlichia canis*. Graças à utilização do programa Mega4 foi possível verificar que as amostras de *E. canis* provenientes de cães da cidade de Goiânia apresentam elevado grau de similaridade molecular com os isolados de referência para a mesma subespécie de outras regiões do Brasil e do mundo. Amostras de *E. canis* de cães avaliados neste estudo formam grupo filogenético bem definido, juntamente com amostras de referência de *E. canis* de diferentes regiões geográficas. As sequências obtidas foram depositadas no *GenBank* como sequências parciais do gene 16S rRNA de *E. canis*, procedentes de Goiânia.

DESCRITORES: Erliquiose monocítica canina; pancitopenia tropical canina; filogenia; epidemiologia molecular; similaridades genéticas.

1 Faculdades Objetivo, Goiânia, Brasil.

2 Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), Brasil.

3 Escola de Veterinária da UFG, Brasil.

Endereço de correspondência: Guido F. C. Linhares. Laboratório de Doenças Parasitárias, Escola de Veterinária da UFG, Campus II, Cx postal 131. CEP 74001-970, Goiânia, GO. Brasil. E-mail: sabrinacd@gmail.com, guidofcl@vet.ufg.br.

ABSTRACT

Molecular diagnostics of *Ehrlichia canis* in dogs from Goiânia state of Goiás, Brazil

The obligate intracellular bacterial parasite known as *Ehrlichia canis* is the etiological agent of the Canine Monocytic Ehrlichiosis. The most frequent applied method for routine laboratory diagnosis is based on the microscopic direct detection of intraleucocytic inclusions. More recently the polymerase chain reaction (PCR) has been introduced to improve mainly the sensitivity and specificity of diagnosis. The objective of this study was to investigate the presence of *Ehrlichia* in dogs from the city of Goiânia, Goiás by molecular techniques. Blood samples were collected from 40 symptomatic dogs referred to the Veterinary Hospital of the Federal University of Goiás. All samples were processed for DNA extraction and PCR using both genus and species-specific oligonucleotides for the 16S rRNA gene. PCR reactions resulted positive for both genus and species assays for 17 out of 40 tested samples. The species-specific PCR products of the 17 samples were purified and sequenced but only five of these were considered for subsequently molecular studies due to the quality analysis results of the sequences. These five sequences were then analyzed for similarity by BLASTn algorithm in which they could be identified as *Ehrlichia canis*. Using Mega4 software it was confirmed that these isolates of *E. canis* from dogs of Goiânia are highly similar to other reference isolates of the same species from other regions of Brazil and worldwide. The isolates of *E. canis* evaluated in this study are phylogenetically similar to those reference isolates from other geographic regions of the world. Sequences were deposited in the GenBank as *E. canis* 16S rRNA partial sequences from Goiânia

KEY WORDS: Canine monocytic ehrlichiosis; tropical canine pancytopenia; phylogeny; molecular epidemiology; genetic similarities; ehrlichiosis.

INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa, da ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC) (Dumler et al., 2001). De seu principal mecanismo de transmissão participam carrapatos vetores. Nas Américas, a espécie de carrapato envolvida é o *Rhipicephalus sanguineus* (Dagnone et al., 2001).

Os canídeos são suscetíveis a diferentes espécies de riquetsias da família *Anaplasmataceae* como: *E. canis*; *E. ewingii*, *E. chaffeensis*; *A. platys*, *A. phagocitophilum*, *Neorickettsia sennetsu*, *N. risticii* e *N. helminthoeca* (Headley et al., 2006). Entre estas, as espécies *E. chaffeensis* e *A. phagocitophilum* são os principais agentes envolvidos nos casos de erliquioses em seres humanos (Hoskins, 1991; Greene, 2006), ainda que *E. ewingii*, *E. canis* e *N. sennetsu* também possam causar infecções em humanos (Buller et al., 1999; Dumler et al., 2007).

Alguns autores têm atribuído a *E. canis* um possível envolvimento em infecções humanas na América do Sul, com alguns casos reportados na Venezuela (Perez et al., 1996), Argentina (Ripoli et al., 1999) e Brasil (Calic et al., 2004).

E. canis apresenta distribuição mundial, enquanto *E. ewingii* é restrita aos Estados Unidos e *E. chaffeensis* é a principal causa da Erliquiose Monocítica Humana (EMH) nos Estados Unidos, mas ocorre também em outras regiões da

América do Norte, Ásia e Europa (Greene, 2006). No Brasil, estudos sorológicos demonstraram o possível contato de seres humanos com esta espécie (Calic et al., 2004; Costa et al., 2007).

Cães com EMH apresentam sinais clínicos inespecíficos, como anemia, febre, secreção ocular, anorexia, depressão, perda de peso, poliartrite e alterações hematológicas, como anemia arregenerativa e trombocitopenia (Dagnone et al., 2001).

O método de diagnóstico laboratorial de rotina é a demonstração microscópica direta das inclusões intraleucocitárias a partir de preparações coradas de esfregaço sanguíneo ou do creme leucocitário (Woody & Hoskins, 1991). Este exame é de rápida execução e de baixo custo, entretanto nem sempre é eficaz em virtude da constante flutuação da parasitemia durante o curso da enfermidade (Alves et al., 2005).

Técnicas moleculares de diagnóstico reconhecidamente mais sensíveis, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido recentemente empregadas para o diagnóstico de *E. canis* visando oferecer um diagnóstico mais seguro e que permita a diferenciação da espécie de *Ehrlichia* envolvida na enfermidade (Harrus et al., 1998; Alves et al., 2005; Martin et al., 2005; Dumler et al., 2007).

Para estudos moleculares das espécies do gênero *Ehrlichia* tem sido utilizada a análise filogenética de fragmentos do gene 16S rRNA amplificados pela nested-PCR (Machado et al., 2006; Carvalho et al., 2008; Santos et al., 2009; Oliveira et al., 2009) e pela PCR (Pinyoowong et al., 2008).

No Brasil, ainda existem poucos estudos com abordagem filogenética e de caracterização molecular, entretanto algumas pesquisas têm sido feitas envolvendo agentes da família Anaplasmataceae por pesquisadores de diferentes regiões do país. Na Bahia, estudos envolvendo a caracterização molecular de *E. canis* foram conduzidos por Carvalho et al. (2008). No estado do Rio de Janeiro, Macieira et al. (2005) realizaram estudo utilizando a PCR como método de diagnóstico.

No estado de São Paulo, Aguiar et al. (2008) fizeram o isolamento *in vitro* de *E. canis* utilizando a cepa Jaboticabal DH82; Santos et al. (2009) estudaram a incidência de *E. canis* nos cães de Ribeirão Preto e, no mesmo ano, Oliveira et al. (2009) detectaram, pela primeira vez, *E. ewingii* em cães no Brasil.

No estado do Paraná, Dagnone et al. (2003) executaram a identificação molecular de *E. canis* e Headley et al. (2006) detectaram, pela primeira vez, *N. helminthoteca* em cães desta região. Labruna et al. (2007), utilizando amostras de Rondônia, avaliaram amostras sanguíneas provenientes de carrapatos, seres humanos com histórico febril, cães e capivaras buscando possíveis amostras de *Ehrlichia* spp. Nos cães, foi detectada *E. canis*; nas demais amostras, nenhuma espécie de *Ehrlichia* foi detectada.

Nos diferentes estudos conduzidos mundialmente, os genes mais frequentemente utilizados relativos à filogenia de microrganismos do gênero *Ehrlichia* são o gene 16S rRNA, que codifica a enzima citrato sintetase (*gltA*), o gene *groESL* e genes que codificam proteínas de superfície. O gene 16S rRNA

foi utilizado por Dumler et al. (2001) para a reorganização de gêneros e espécies, pois apresenta baixas frequências de mutação, sendo altamente conservado entre populações de diferentes regiões geográficas (Dumler et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de *Ehrlichia canis* em cães da cidade de Goiânia, estado de Goiás, por métodos de diagnóstico molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e extrações de DNA

Para a realização do estudo foram obtidas 40 amostras de sangue coletadas de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás (HV-UFG) no período de janeiro a agosto de 2008. Todas as amostras eram oriundas de cães que apresentavam sinais clínicos compatíveis com hemoparasitose no momento da consulta como: febre, palidez de mucosa, inapetência, prostração, associados ou não a alterações da coagulação sanguínea ou à infestação por carrapatos. As amostras de sangue foram coletadas em tubo estéril contendo EDTA (Anticoagulante Universal, Doles). As amostras foram aliquotadas em tubos do tipo *Eppendorf* de 1,5 mL e mantidas a -20°C para posterior extração de DNA genômico. Para a extração, foi utilizado *kit* comercial (Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit, GE, Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante para o volume inicial de 200mL de sangue. Posteriormente, 5 µL do eluato obtido da extração de cada amostra foram utilizados para a realização das reações de PCR.

Oligonucleotídeos para amplificação do fragmento do gene 16S rRNA

Inicialmente foi selecionado um oligonucleotídeo gênero-específico para o gene 16S rRNA de *Ehrlichia* spp. O oligonucleotídeo genérico foi, portanto, selecionado a partir de uma área conservada no alinhamento das seguintes sequências de referência (*GenBank* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com seus respectivos números de acesso: *E. canis* (AF162860), *E. canis* Japão (AF536827), *E. ewingii* (U96436), *Anaplasma platys* (AF1567844), *E. chaffeensis* (U86665), *Anaplasma phagocytophila* (U02521), *E. bovis* (AF294789), *Neorickettsia risticii* (M21290). O alinhamento das sequências foi realizado pelo método de Clustal W (Thompson et al., 1999), empregando-se o programa Megalign (LaserGene, DNASTar, Inc.).

Após a seleção, o oligonucleotídeo foi avaliado quanto à similaridade com as sequências do *GenBank*, utilizando-se o algoritmo BLAST-N® (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotides*) (Altschul et al., 1990). Após a confirmação da identidade para o gênero, a sequência foi sintetizada (*Prodimol*, *IDT*) sob a designação Ebr6. Esse oligonucleotídeo foi utilizado em combinação com o oligonucleotídeo gênero-específico Ebr5 (*anti-sense*), anteriormente publicado por

Alves et al. (2005), visando à obtenção de fragmento-alvo gênero-específico de, aproximadamente, 840pb pela PCR.

Para as reações de PCR espécie-específicas, foram empregados os oligonucleotídeos Ebr1 (*sense*) e Ebr5 (*anti-sense*) para a amplificação do fragmento-alvo de 765pb do gene 16S rRNA de *E. canis* (Alves et al., 2005) (Quadro 1).

Quadro 1. Iniciadores utilizados para a amplificação de fragmentos gênero e espécie-específicos de *Ehrlichia* sp. pela PCR

Especificidade analítica	Oligo	Sequências	T _a (°C)
<i>Ehrlichia</i> spp.	Ebr6	5'-CGA ACG CTG GCG GCA AG-3'	53
<i>Ehrlichia</i> spp..	*Ebr5	5'-GGA GTG CTT AAC GCG TTA G-3'	53
<i>E. canis</i>	*Ebr1	5'- CCT CTG GCT ATA GGA AAT TG -3'	53

*Ebr 5 e Ebr1 descritos por Alves et al., 2005. Ta = temperatura de anelamento.

Diagnóstico gênero e espécie-específico por PCR

Os eluatos obtidos com as extrações de DNA a partir do sangue dos cães amostrados (n=40) foram utilizados para testes de triagem, empregando-se ensaio de PCR gênero-específico com os oligonucleotídeos Ebr5 e Ebr6. Em seguida, as amostras com resultados positivos nesta etapa foram submetidas a novas reações de PCR empregando-se o par de oligonucleotídeos Ebr1 e Ebr5 para amplificação espécie-específica de *E. canis*, conforme descrito acima.

Os ensaios da PCR foram realizados em volume de 50 µL com as seguintes concentrações de reagentes: 1x de Tampão para PCR (PCR *buffer* 10X, *Invitrogen*), 2,0 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) (*Invitrogen*); 0,2 mM de dNTP (*Amersham Biosciences*); 10 pM do oligonucleotídeo *sense* (Ebr6 para as reações *Ehrlichia*-específicas e Ebr1 para *E. canis* específicas); 10 pM do oligonucleotídeo *antisense* (Ebr5); 1,25U de Taq DNA polimerase (Taq DNA Polymerase 5 U/µL, *Invitrogen*) e 5 µL do DNA genômico extraído da amostra conforme descrito anteriormente.

Como controle positivo para as reações da PCR, foi utilizada uma amostra de DNA genômico de referência para *E. canis* obtida no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias (LDDP) da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% (Agarose NA, *Amersham Biosciences*) em tampão TBE 1x contendo 10 µL de amostra, após a eletroforese a 90 volts, durante 60 minutos, com marcador de massa molecular de 100 pb (*DNA Ladder* 100 bp *Invitrogen*).

Após as corridas, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL) por 10 minutos. A visualização foi feita em transiluminador de UV (*Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum*) e a documentação fotográfica, em equipamento fotodocumentador de géis (Vilber Lourmat).

Purificação e sequenciamento das amostras

Os produtos da PCR *E. canis*-específicos (Ebr1/Ebr5-PCR) foram cortados e removidos do gel de agarose sob iluminação de UV e imediatamente submetidos ao processo de purificação empregando-se *kit* comercial (QIAquick Gel Extraction Kit Protocol, *Qiagen*). Após a identificação, as amostras foram encaminhadas sob refrigeração para a realização do sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado por sequenciador automático MegaBACE1000. Para este processo foi utilizado o método da incorporação de dideoxi (ddNTP), empregando-se o *DYEnamicÔ ET dye terminator kit MegaBACEÔ (GE Healthcare)*. As sequências obtidas foram analisadas pelo programa estatístico Phred e somente aquelas com índice igual ou superior a 20 foram mantidas no estudo.

Análises dos isolados pelo método de múltiplo alinhamento e testes de similaridade

Para a determinação da identidade molecular, as sequências dos produtos da PCR espécie-específicos dos isolados regionais foram, individualmente, submetidas à análise de similaridade pelo algoritmo BLASTn, tendo como base o banco de sequências do *GenBank* (Altschul et al., 1990).

As mesmas sequências foram então analisadas comparativamente quanto à porcentagem de identidade molecular, empregando-se o método de múltipla progressão de Clustal W (Thompson et al., 1999) pelo programa MEGA4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Software Version 4*; Tamura et al., 2007). A mesma análise de identidade foi realizada comparando-se os isolados obtidos neste estudo com as sequências de referência (*GenBank*) para *E. canis* de outras regiões geográficas.

Análises filogenéticas

Foram realizadas pela construção de dendograma que incluía sequências distintas obtidas a partir dos isolados regionais e as seguintes sequências de referência para outras riquetsias oriundas de diferentes regiões geográficas, com seus respectivos números de acesso no *GenBank*: *E. canis* Peru (DQ915970), *E. canis* Venezuela (AF373613), *E. canis* Brazil-CO2 (EF195135), *E. canis* China (EF162826), *E. canis* África do Sul (U54805), *E. canis* Brazil-SP (DQ460714), *E. canis* Japão (AF536827), *E. canis* Espanha (AY530806), *E. canis* EUA (M73226),

E. ewingii (U96436), *E. chaffeensis* (U23503, EU181144, DQ345720), *A. phagocytophilum* (EU287434, GU111747), *A. platys* (AF156784, DQ401045), *N. risticii* (AF380257), *N. sennetsu* (M73219) e *Brucella* sp. (GU085225).

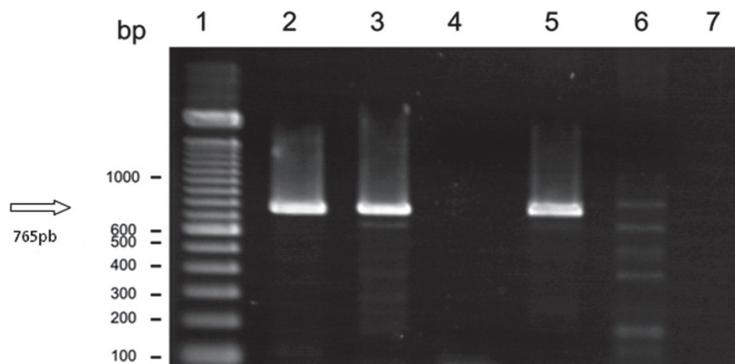
Os alinhamentos foram realizados pelo método de Clustal W para construir árvore filogenética do tipo *Neighbor-Joining*, com *bootstrap* de 1.000 replicatas e parâmetros de distância evolutiva ajustados pelo método de substituição Kimura 2-parâmetros. Para esta finalidade foi utilizado o programa MEGA4.

RESULTADOS

Detecção gênero e espécie-específica do gene 16S rRNA

Pelos testes de triagem com o par de oligonucleotídeos Ebr6/Ebr5, foram obtidos produtos de amplificação de 17 amostras, aplicados as 40 amostras selecionadas com tamanho de, aproximadamente, 840pb correspondente ao fragmento-alvo previsto para o gene 16S rRNA de *Ehrlichia* sp.

As mesmas amostras (n=17) que apresentaram positividade neste primeiro teste de PCR também foram positivas com o par de oligonucleotídeos Ebr1 e Ebr5, gerando o produto espécie-específico de 765pb do gene 16S rRNA de *E. canis* (Figura 1).



1- marcador de 100 pb; linha 2 - controle positivo; linhas 3 e 5: isolados *E. canis* GO 01 e 07; linha 4 - amostra negativa; linha 6 - reação inespecífica; linha 7 - controle negativo.

Figura 1. Eletroforese de produtos de amplificação espécie-específica de *E. canis* por PCR, obtidos a partir de amostras provenientes de cães anêmicos, procedentes da cidade de Goiânia-GO.

Sequenciamento dos isolados de *Ehrlichia* sp.

Após o sequenciamento dos produtos de PCR purificados, foram mantidas no estudo apenas as sequências que apresentavam valores de *Phred* igual

ou superior a 20, reduzindo, assim, o número de amostras para cinco. Após este procedimento, as cinco sequências restantes destes isolados, submetidas à avaliação de similaridade pelo BLASTn, apresentaram porcentagem de identidade de 100% para a maioria das sequências de referência para *E. canis* registradas no *GenBank*. Os isolados obtidos neste estudo foram então depositados no *GenBank* como novas sequências para o gene 16S rRNA de *E. canis* sob os números GU386285, GU386286, GU386287, GU386288 e GU386289.

Em seguida, as sequências destes isolados foram ajustadas para o comprimento comum de 463pb antes da realização do alinhamento múltiplo.

No Quadro 2, é apresentado o resultado da comparação proporcional do polimorfismo dos nucleotídeos entre as sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados deste estudo e as de outras nove amostras representativas da espécie *E. canis*, de outras regiões geográficas.

Pela análise comparativa foi verificado que os isolados *E. canis* 01, 02, 03 e 05 eram 100% idênticos aos provenientes do Brasil-CO2, China, Espanha, Japão, Peru e Venezuela. A cepa dos EUA apresentou uma substituição na posição 72 do alinhamento, taxa de similaridade em 99,78%. O isolado *E. canis* GO 04 apresentou uma inserção de um nucleotídeo na posição 414 do alinhamento, demonstrando 99,78% de similaridade.

Quadro 2. Comparação das sequências do gene 16S rRNA de *E. canis* provenientes de Goiânia, Goiás, Brasil com outras sequências de diferentes regiões geográficas

Genótipos/isolados	Acesso GenBank	Identidade ^a (%)	Polimorfismo na posição dos nucleotídeos		
			72	228	414
<i>E. canis</i> GO 01	GU386285	-	G	C	-
<i>E. canis</i> GO 02	GU386286	100,00	•	•	-
<i>E. canis</i> GO 03	GU386287	100,00	•	•	-
<i>E. canis</i> GO 04	GU386288	99,78	•	•	A
<i>E. canis</i> GO 05	GU386289	100,00	•	•	-
África do Sul	U54805	100,00	•	-	-
Brasil CO2	EF195135	100,00	•	•	-
Brasil SP	DQ460714	100,00	•	•	-
China	AF162860	100,00	•	•	-
Espanha	AY530806	100,00	•	•	-
EUA	M73226	99,78	A	•	-
Japão	AF536827	100,00	•	•	-
Peru	DQ915970	100,00	•	•	-
Venezuela	AF373613	100,00	•	•	-

(•) indica nucleotídeo conservado, (-) deleção, ^a A porcentagem de idênticas da sequência de 463 pb alinhada pelo ClustalW.

Análise filogenética dos isolados de *Ehrlichia* sp.

A árvore filogenética gerada pelo confronto entre as sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados regionais do presente estudo com as sequências de referência para outras espécies de riquetsias, incluídas nesta análise, revelou que as espécies do gênero *Ehrlichia* ficaram divididas em dois “clados” distintos. Um destes “clados” foi formado pelas espécies *E. canis*; o outro, pelas espécies *E. chaffensis* e *E. ewingii*. Os isolados *E. canis* GO 01 , 02, 03 e 05 formaram agrupamento bem definido juntamente com as cepas de referência para *E. canis* de outras regiões geográficas incluídas nesta análise molecular. O isolado de *E. canis* proveniente dos EUA foi o mais distante filogeneticamente entre os isolados de *E. canis* avaliados.

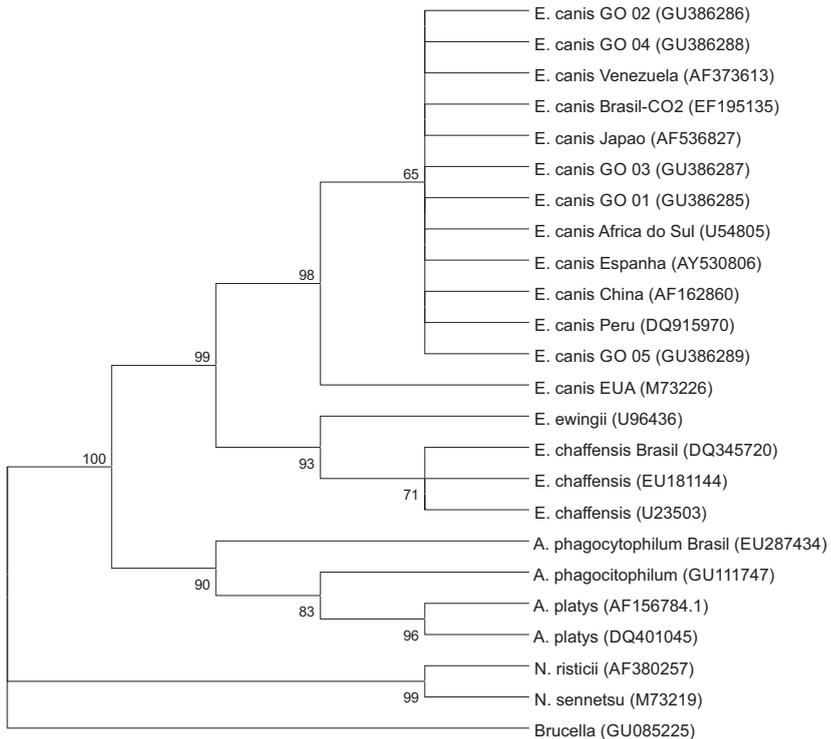


Figura 2. Árvore filogenética obtida pela utilização dos cinco nucleotídeos de *Ehrlichia canis* provenientes de Goiânia-GO, amplificadas pelos oligonucleotídeos Ebr1/Ebr5 agrupadas pelo método neighbor-joining no programa Mega4.

DISCUSSÃO

O exame de PCR gênero-específico utilizado como triagem foi escolhido para possibilitar a detecção de outras espécies do gênero *Ehrlichia* entre as amostras do estudo. Após o exame espécie-específico, constatou-se que todas as amostras eram da espécie *E. canis*, o que foi confirmado pelo sequenciamento dos respectivos produtos de PCR.

De acordo com Dumler et al. (2001), o gene 16S rRNA é altamente conservado com baixas frequências de mutação. Assim, não é o gene indicado para observar variações genéticas dentro da espécie, embora seja de grande utilidade para a distinção entre espécies. A elevada similaridade encontrada neste estudo deve-se, provavelmente, a este fato. Resultados similares foram anteriormente observados por Aguirre et al. (2006) e Pinyoowong et al. (2008).

No Brasil, têm sido realizados estudos que envolvem biologia molecular na busca de outras espécies do gênero *Ehrlichia*. Entre estes, destacam-se os primeiros diagnósticos do país com base em técnica molecular para *E. chaffeensis* (Machado et al., 2006) e *E. ewingii* (Oliveira et al., 2009). No primeiro, a presença de *E. chaffeensis* foi confirmada pela técnica de *nested*-PCR em três animais silvestres (Cervo do Pantanal - *Blastocerus dichotomus*) capturados no Mato Grosso do Sul. No estudo, sete animais foram avaliados e três destes apresentaram resultado positivo para o agente em exame de PCR. O trabalho evidencia o primeiro relato da presença de *E. chaffeensis* por infecção natural em animais do Brasil. A sequência obtida nesse estudo foi incluída na árvore filogenética do presente trabalho e esta formou um *clado* distinto juntamente com outros dois isolados de *E. chaffeensis*; um destes, proveniente de uma amostra obtida de ser humano nos EUA (U23503) e outro, isolado de carrapato na Coreia (EU181144).

Considerando-se a extensão territorial brasileira, é necessário incrementar os estudos desta natureza para que se amplie o conhecimento da identidade taxonômica dos microrganismos envolvidos nas infecções por *Ehrlichia* não apenas no estado de Goiás, mas também nas diferentes áreas do país.

No Brasil, casos de erliquiose humana foram registrados por Calic et al. (2004) e Costa et al. (2007) com diagnóstico sorológico positivo para *E. chaffeensis* em indivíduos com sintomas sugestivos de erliquiose no estado de Minas Gerais, o que aponta para a importância do emprego de métodos moleculares em estudos sobre este tema.

CONCLUSÕES

Análises de similaridade molecular e testes espécie-específicos de PCR confirmam a ocorrência da espécie *E. canis* entre diferentes amostras clínicas provenientes de cães no município de Goiânia.

A análise filogenética permitiu demonstrar que isolados de *E. canis* provenientes da cidade de Goiânia-GO apresentam estreita similaridade com isolados de *E. canis* das demais regiões do Brasil e de outras regiões do mundo.

REFERÊNCIAS

1. Aguiar DM, Hagiwara MK, Labruna MB. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol* 39: 489-493, 2008.
2. Aguirre E, Tesouro M, Ruiz L, Amusategui I, Sainz A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. *J Vet Med* 53: 197-200, 2006.
3. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410, 1990.
4. Alves LM, Linhares GFC, Chaves NST, Monteiro LC, Linhares DCL. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. *Ciênc Anim Bras* 6: 49-54, 2005.
5. Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikhisa Y, Unver A, Gaudreault-Keener M, Manian FA, Liddell AM, Schmulewitz N, Storch GA. *Ehrlichia ewingii* recognized agent of human ehrlichiosis. *N Eng J Med* 341: 148-155, 1999.
6. Calic SB, Galvao MAM, Bacellar F, Rocha CMBM, Mafra CL, Leite RC, Walker DA. Human ehrlichiosis in Brazil: First suspect cases. *Braz J Infec Dis* 8: 259-262, 2004.
7. Carvalho FS, Wenceslau AA, Carlos RS, Albuquerque GR. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genet Mol Res* 7: 657-662, 2008.
8. Costa JR, Rembeck K, Ribeiro MFB, Beelitz O, Pfister K, Passos LMF. Sero prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *Vet J* 174: 673-676, 2007.
9. Dagnone AS, Morais HSA, Vidotto O. Ehrlichiose nos animais e no homem. *Semina: Ci Agrárias* 22: 191-201, 2001.
10. Dagnone AS, Morais HAS, Vidotto MC, Jojima FS, Vidotto O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south brazil. *Vet Parasitol* 117: 285-290, 2003.
11. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evolut Microbiol* 51: 2145-2165, 2001.
12. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichiosis in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Clin Infec Dis* 45: 45-51, 2007.
13. Greene CE. *Infectious Diseases of the dog and cat*. Canada: Copyright Elsevier, 2006. p.1387.
14. Harrus S, Waner T, Keysary A, Aroch I, Voet H, Bark H. Investigation of splenic functions in canine monocytic erlichiosis. *Vet Immunol Immunopat* 62: 15-27, 1998.
15. Headley SA, Scorpio DG, Barat NC, Vidotto O, Dumler JS. *Neorickettsia helminthoeca* in dog, Brazil. *Emerg Infec Dis* 12: 1303-1304, 2006.
16. Hoskins JD. *Veterinary clinics of North America*. Philadelphia: Saunders Company, 1991. p. 201.
17. Labruna MB, McBride JW, Camargo LM, Aguiar DM, Yabsley MJ, Davidson WR, Stromdahl EY, Williamson PC, Stich RW, Long SW, Camargo EP, Walker DH. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Vet Parasitol* 143: 189-195, 2007.
18. Machado RZ, Duarte JMB, Dagnone AS, Szabo MJP. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). *Vet Parasitol* 139: 262-266, 2006.
19. Macieira DB, Messick JB, Cerqueira ADE, Freire IM, Linhares GF, Almeida N K, Almosny NR. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Clin Pathol* 34: 44-48, 2005.

20. Martin AR, Brown GK, Dunstan RH, Roberts TK. Anaplasma platys: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp Parasitol* 109: 176-180, 2005.
21. Oliveira L, Oliveira KA, Mourão LC, Pescatore AM, Almeida MR, Conceição LG, Galvão AM, Mafra C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clin Microbiol Infect* 15: 55-56, 2009.
22. Perez M, Rikihisa Y, Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol* 34: 2133-2139, 1996.
23. Pinyoowong D, Jittapalpong S, Suksawat F, Stich RW, Thamchaipenet A. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. *Infect Genet Evol* 8: 433-438, 2008.
24. Ripoli CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, Paddock CD, Zaki SR, Olson JG, Santos-Buch CA. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 61: 350-354, 1999.
25. Santos F, Coppede JS, Pereira AL, Oliveira LP, Roberto PG, Benedetti RB, Zucoloto LB, Lucas F, Sobreira L, Marins M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet J* 179: 145-148, 2009.
26. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599, 2007.
27. Thompson JD. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res* 27: 2682-2690, 1999.
28. Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial disease of dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21: 75-98, 1991.