

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

AVALIAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO, LABORATORIAL E MOLECULAR DE CÃES
SUSPEITOS DE ERLICHIOSE E TRATADOS COM DOXICICLINA.

Nicilene Cardoso Silva

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS-BRASIL
Setembro/2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

NICILENE CARDOSO SILVA

AVALIAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO, LABORATORIAL E MOLECULAR DE CÃES
SUSPEITOS DE ERLICHIOSE E TRATADOS COM DOXICICLINA.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária – UFU, como parte das
Exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias na Área de
concentração de Saúde Animal.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS-BRASIL
Setembro/2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S5861a

2013

Silva, Nicilene Cardoso, 1984-

AVALIAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO, LABORATORIAL E MOLECULAR DE
CÃES SUSPEITOS DE ERLICHIOSE E TRATADOS COM DOXICICLINA.

na cidade de Uberlândia-MG / Nicilene Cardoso Silva. -- 2013.

51 f. : il.

Orientador: João Paulo Elsen Saut.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pro-grama de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Cão - Doenças - Teses. 3.
Cão – Diagnós-
tico. 4. Cão - Doenças - Tratamento - Teses. I. Saut,
João Paulo Elsen.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nicilene Cardoso Silva – Nascida e, 13 de maio de 1984, natural de Coromandel – MG, filha de Sebastião Cardoso Rodrigues e Maurenice Maria da Silva Cardoso. Ingressou na Universidade Federal de Uberlândia em 2004, onde fez o curso de Medicina Veterinária o qual concluiu em 2009. No ano seguinte iniciou Mestrado na área de Saúde Animal, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, também pela Universidade Federal de Uberlândia. Desde janeiro de 2010 atua como Médica Veterinária na área de Clínica e Cirurgia na mesma cidade.

Dedicatória

*Aos animais, que despertam em mim toda a dedicação e amor que tenho,
Pois meu trabalho é por eles e para eles.*

Agradecimentos

Ao Professor João Paulo Elsen Saut, pelos convite, oportunidade, profissionalismo, ensinamentos, e também pela amizade sincera.

Ao Professor Francisco Cláudio Dantas Mota pelas sugestões, disposição e por me co-orientar no final desta etapa.

A minha mãe, Maurenice e minha irmã, Nicemara por acreditarem em mim e me apoiar sempre que preciso.

Aos graduandos Mariana Pádua, Diogo Figueiredo, Meire Hellen, Cristóvão Costa e Antônia Lima pelo auxílio durante todo o experimento.

Aos graduandos Pablo Noletto e Igor Castro e a Médica Veterinária Suzana Akemi pelo auxílio técnico desde o início.

Aos laboratórios de Patologia Clínica do Hospital da UFU, Biogal e Ouro Fino por todo o apoio técnico para a realização desta pesquisa.

À direção do Hospital Veterinário por disponibilizar o espaço físico.

À Associação de Proteção Animal por colaborarem com o projeto cedendo os animais.

Aos meus queridos amigos por estarem presentes nos momentos alegres e também nas adversidades e por acrescentarem tanto em minha vida.

A todos os animais que fizeram parte desse trabalho, pela docilidade, confiança e colaboração durante todo o tempo. Minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
PALAVRAS-CHAVE.....	iv
ABSTRACT.....	v
KEYWORDS.....	v
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	2
2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	4
2.3. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	5
2.4. POTENCIAL ZONÓTICO.....	9
2.5. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. LOCAL.....	16
3.2. ANIMAIS.....	16
3.3. EXAMES LABORATORIAIS.....	17
3.3.1. HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA.....	17
3.3.2. EXTRAÇÃO DE DNA.....	18
3.3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	18
3.3.4. DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	19
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise Hematológica na evolução do tratamento com doxiciclina¹ em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

Tabela 2. Análise do leucograma na evolução do tratamento com doxiciclina* em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

Tabela 3. Análise do proteinograma sérico na evolução do tratamento com doxiciclina em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

Tabela 4. Valores de uréia e creatinina séricos na evolução do tratamento com doxiciclina em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

Tabela 5. Valores das enzimas séricas Fosfatase alcalina (FA), Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST) e Creatina quinase (CK) na evolução do tratamento com doxiciclina em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

Tabela 6. Resultados do teste rápido ELISA (ImmunoComb®, Biogal, Israel)

Lista de Figuras

Figuras 1 e 2. Resolução em gel de agarose dos produtos de PCR extraídos com Fenol com primers específicos para *E. canis*.

Figuras 3 e 4. Resolução em gel de agarose dos produtos de PCR extraídos com Fenol para *Anaplasma platys*.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo traçar o perfil clínico, laboratorial, molecular e avaliar a evolução do tratamento usual com doxiciclina, 10 mg/kg a cada 12 horas (BID), durante três semanas após infecção natural de cães por *Ehrlichia canis*. Foram selecionados 18 cães, que apresentavam sintomatologia clínica da doença e histórico de infestação por carrapatos, sem raça definida, com idade média de $3,4 \pm 1,5$ anos, de ambos os sexos. Os animais foram tratados com 10mg/kg de doxiciclina, via oral (VO), BID, durante 21 dias consecutivos, e avaliados uma semana antes do início do tratamento (d-7) no primeiro dia (d0), 14º dia (d+14) e 21º dia (d+21) de tratamento. Em cada avaliação procedeu-se a anamnese, análise hematológica e perfil bioquímico e a PCR. Embora tenha ocorrido uma melhora significativa no estado geral dos cães, observou-se que o quadro hematológico ainda não havia estabelecido sua plenitude em todos os animais ao final do tratamento com a doxiciclina. A PCR mostrou-se positiva para *E. canis* em três animais no pré tratamento. No fim do tratamento, nenhum dos animais apresentou as manifestações clínicas observadas anteriormente, e apenas um animal manteve positivo ao teste molecular, sugerindo resistência ao tratamento na dose utilizada. O estudo realizado permitiu concluir que as alterações clínicas e laboratoriais são gerais e inespecíficas. O diagnóstico deve ser baseado nos aspectos clínicos, alterações hematológicas, títulos de anticorpos anti-*E. canis*, e confirmado pela presença de material genético do organismo no sangue circulante.

Palavras chave: Ehrlichiose, PCR, Anemia, Trombocitopenia, Doxiciclina

Abstract

This study aimed to describe the clinical and molecular profile, and evaluating the evolution of an standard treatment with doxycycline 10 mg/kg every 12 hours (BID), for three weeks to natural *Ehrlichia canis* infection. 18 mongrel dogs were selected, both sexes, mean age $3,4 \pm 1,5$ years old, showing clinical symptoms of the disease and a history of tick infestation. The animals were treated with doxycycline 10mg/kg orally (PO), BID, for 21 consecutive days and assessed the week before starting treatment (d-7) and on the first day (d0), day 14 (+14 d) and day 21 (d +21) treatment. At each assessment was made on history, haematological and biochemical analysis and PCR. Although there was a significant improvement in the general state of the dogs, it was noted that the hematological had not yet established fullness in all animals after the treatment with doxycycline. The PCR was positive for *E. canis* in 3 animals at pre-treatment. An animal was positive during and at the end of treatment. After treatment, none of the animals showed clinical manifestations observed previously, only one animal remained positive for molecular testing, suggesting resistance to treatment in the dose used. The study concluded that the clinical, haematological and biochemical changes observed in dogs infected by *E. kennels* are nonspecific; 21 days of treatment for improvement in anemia and thrombocytopenia, and WBC did not follow a pattern among animals. The study concluded that the findings clinical and laboratory are general and non-specific. The diagnosis should be based on clinical, hematological, serum titers of anti-*E. canis* and confirmed by the presence of genetic material of the body in the circulating blood.

Key words: Keywords: Ehrlichiosis, PCR, anemia, thrombocytopenia, Doxycyclin

1. INTRODUÇÃO

A Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença infecciosa que acomete membros da família canidae. É causada pelo agente *Ehrlichia canis* que faz parte de um grupo de microrganismos gram negativos, intracelulares obrigatórios e pleomórficos, pertencentes à Ordem *Rickettsiales*, Famílias *Anaplasmataceae* e *Rickettsiaceae* (ALMOSNY *et al.*, 2002; MACHADO, 2004; GREENE, 2005).

A infecção por *E. canis* pode apresentar um período de incubação de 8 a 20 dias, e manifestar-se em três fases: aguda, subclínica ou assintomática e crônica. A doença é caracterizada por alterações clínicas e hematológicas (MACHADO, 2004; GREENE, 2005), sendo os principais achados laboratoriais a trombocitopenia, leucopenia e anemia e as manifestações clínicas mais comuns a perda de peso, anorexia e linfadenomegalia (ALMOSNY *et al.*, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2005; NAKAGHI *et al.*, 2008).

O diagnóstico da ehrlichiose é baseado na combinação dos sinais clínicos, alterações hematológicas e identificação de mórulas de *Ehrlichia* em esfregaço sanguíneo (WEN *et al.*, 1997; HARRUS *et al.*, 1998a; HARRUS *et al.* 2004). Porém, apesar desta identificação ser simples, de baixo custo e fornecer registro permanente (FRITZ, 2009), ela apresenta baixa sensibilidade, em torno de 4 a 5% dos casos na fase aguda (HARRUS *et al.*, 1997; MENESES *et al.*, 2008).

Métodos sorológicos, cultivo celular e técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) também são utilizados para auxiliar o diagnóstico. A PCR é um método sensível e específico que pode ser aplicado em amostras de sangue e tecidos (HARRUS *et al.*, 1998a; HARRUS *et al.* 2004).

MENDONÇA *et al.*, (2005) avaliaram alterações hematológicas em 109 cães da cidade de Uberlândia-MG, que apresentaram presença de mórulas de *Ehrlichia. spp.* em leucócitos de extensões de sangue periférico, coletado através de capilares marginais da orelha. Em decorrência da grande quantidade de animais clinicamente suspeitos para a ehrlichiose canina neste município, e da pouca utilização de testes diagnósticos definitivos nesta região, este trabalho foi realizado com o objetivo de traçar o perfil clínico e molecular para o diagnóstico da ehrlichiose canina no município, e avaliar a eficácia do tratamento usual com doxiciclina a 10 mg/Kg BID durante 21 dias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AGENTE ETIOLÓGICO

A *Ehrlichia* é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa, pleomórfica, pertencente à ordem *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae* e gênero *Ehrlichia* (DUMLER *et al.*, 2001). Localiza-se nas células do sistema retículo endotelial do fígado, baço e linfonodos, tendo nas células mononucleares seu ponto inicial de multiplicação (BABO, 1998; HARRUS *et al.*, 1998b).

São descritas diferentes espécies de *Ehrlichia*, e são diferenciadas de acordo com o tipo de célula que infectam. A *E. canis* e *E. chaffeensis* infectam monócitos, provocando a ehrlichiose monocítica, enquanto que a *E. ewingii* invade neutrófilos produzindo a ehrlichiose granulocítica. Apesar de serem gram-negativas, não se coram bem por esse método. São imóveis e não cultiváveis em meios acelulares ou em embriões de galinha. Os organismos podem apresentar aproximadamente 0,5 µm de diâmetro e as mórulas podem ter até 4,0 µm de diâmetro (RISTIC e HUXSOLL, 1984).

DUMLER *et al.* (2001) reorganizaram a taxonomia da ordem *Rickettsiales* de acordo com as sequências dos genes 16S rRNA e *gro ESL*. Na Família *Anaplasmataceae* foram incluídas as Tribos *Ehrlichieae* e *Wolbachieae*. Algumas espécies dos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* foram remanejadas devido a afinidades genéticas inter-espécies. A *E. canis* ficou na ordem *Rickettsiales*, da família *Anaplasmataceae* do gênero *Ehrlichia*, assim como a *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. muris* e *E. ruminatum*.

No gênero *Ehrlichia* todas as espécies apresentam uma similaridade de cerca de 97,7% na sequência do gene 16S rRNA. Entre a *E. canis*, *E. chaffeensis* e a *E. ewingii* a similaridade é maior que 98,0% (ANDERSON *et al.*, 1992; DUMLER *et al.*, 2001). A acentuada homologia genética das espécies do gênero *Ehrlichia* é a causa do repertório antigênico semelhante que compartilham contribuindo para a ocorrência de reações cruzadas nos testes sorológicos.

Acreditava-se que as espécies do gênero *Ehrlichia* possuíam uma gama de hospedeiros muito restritos, entretanto, novas evidências indicaram que diversas espécies do gênero podem infectar diferentes espécies de hospedeiro

(BREITSCHWERDT, 1999). Assim, as espécies que infectam cães incluem algumas que frequentemente causam doença clínica e outras que aparentemente causam uma doença mais branda ou assintomática nesses animais que, entretanto, podem servir de reservatórios e serem responsáveis pela transmissão dos microrganismos para humanos (MURPHY *et al.*, 1998).

O primeiro microrganismo do gênero *Ehrlichia* foi descoberto por DONATIEN e LESTOQUARD (1935) na Argélia. Eles observaram que cães de experimento de um Instituto, particularmente aqueles infestados com o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, desenvolviam ocasionalmente, uma acentuada doença febril. Tais manifestações foram atribuídas a um microrganismo aparentemente transmitido pelo carrapato, que recebeu o nome de *Rickettsia canis*. Em 1945, a *Rickettsia* foi renomeada como *Ehrlichia canis*, em homenagem ao famoso bacteriologista alemão Paul Ehrlich (RISTIC; HUXSOLL, 1984).

Somente entre 1968 e 1970, a doença ganhou destaque mundial, quando aproximadamente 300 cães das forças militares americanas e britânicas morreram por causa da enfermidade durante a guerra do Vietnã (HUXSOLL *et al.*, 1972; BREITSCHWERDT, 1998). Desde então a ehrlichiose canina tornou-se reconhecida globalmente como uma importante doença infecciosa que acomete a Família Canidae (HARVEY *et al.*, 1978), diversos casos passaram a serem descritos com frequência em várias partes do mundo (EWING, 1969; RIKIHISA, 1991).

As seguintes espécies do gênero *Ehrlichia* já foram descritas causando infecções naturais em cães: *E. canis* (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935); *E. platys*, (HARVEY *et al.*, 1978), reclassificada como *Anaplasma platys* (DUMLER *et al.*, 2001); *E. risticii* (KAKOMA *et al.*, 1994) reclassificada como *Neorickettsia risticii* (DUMLER *et al.*, 2001); *E. ewingii* (ANDERSON *et al.*, 1992; STOCKHAM *et al.*, 1992); *E. chaffeensis* (DAWSON *et al.*, 1992; BREITSCHWERDT *et al.*, 1998); *E. phagocytophila* essas três espécies foram agrupadas em uma, que foi denominada *Anaplasma phagocytophilum* (JOHANSSON *et al.*, 1995; PUSTERLA *et al.*, 1997; DUMLER *et al.*, 2001); *E. equi* (LEWIS *et al.*, 1975; MADEWELL *et al.*, 1982) e o agente da ehrlichiose granulocítica humana (HGE) (GREIG *et al.*, 1996). Dependendo da espécie, os membros do gênero *Ehrlichia* infectam mononucleares, granulócitos ou plaquetas (RIKIHISA, 1991).

2.2. EPIDEMIOLOGIA

A distribuição geográfica dos organismos que causam a ehrlichiose canina tem relação direta com o vetor, os quais são dependentes das populações de hospedeiros susceptíveis à infestação e das condições climáticas de temperatura e umidade (IRWIN, 1991; SHAW *et al.*, 2001)

A ehrlichiose canina tem distribuição mundial, embora apresente maior concentração nas regiões tropicais e subtropicais com alta morbidade (DAGNONE *et al.*, 2003; RODRIGUES-VIVAS *et al.*, 2004; WATANABE *et al.*, 2004). É a única espécie do gênero com distribuição cosmopolita. Casos de infecção, em animais e humanos, por este agente já foram descritos em Israel, Venezuela, Brasil, Sudão, México, Itália, Peru, Estados Unidos e África (INOKUMA *et al.*, 2004; RODRIGUES-VIVAS *et al.*, 2004; MACIEIRA, *et al.*, 2005; PEREZ *et al.*, 2006).

No Brasil, a única espécie descrita infectando os cães é a *E. canis*. Casos desta doença vêm sendo diagnosticados em vários estados brasileiros, como Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, São Paulo e Bahia (DAGNONE *et al.*, 2003; TAKAHIRA *et al.*, 2003; GALVÃO *et al.*, 2004; BULLA *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2005; MACIEIRA, *et al.*, 2005; AGUIAR *et al.*, 2007; CARLOS *et al.*, 2007; DINIZ *et al.*, 2007).

Os gêneros de carrapatos que atuam como vetores das espécies de *Ehrlichia* que infectam o cão são: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Amblyomma* e *Rhipicephalus*. Destes, apenas o *Rhipicephalus* e o *Amblyomma* ocorrem no Brasil (LABRUNA *et al.*, 2005; ONOFRIO *et al.*, 2006; SERRA-FREIRE e MELLO, 2006).

O principal vetor da *E. canis* é o *Rhipicephalus sanguineus*, também conhecido como carrapato marrom do cão. Adaptado ao ambiente urbano, apresenta uma distribuição mundial. Possui hábito nidícola, vivendo entocado nas frestas dos abrigos dos cães hospedeiros (GROVES *et al.*, 1975; LEWIS *et al.*, 1977; MURPHY *et al.*, 1998; LABRUNA, PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES, 2008).

A transmissão da *Ehrlichia* ocorre por via transestadial, enquanto que a via transovariana não está comprovada. Os estágios de larva, ninfa e adulto, são capazes de transmitir a *E. canis* ao hospedeiro, o que permite que os vetores transmitam as bactérias aos cães durante um longo período (HARRUS *et al.*, 1997).

Ehrlichia canis também pode ser transmitida através de transfusões sanguíneas (WOODY; HOSKINS, 1991; HARRUS *et al.*, 1998a; BREITSCHWERDT, 1999). De

acordo com BREITSCHWERDT (1999) que concluiu isso após acompanhar animais em áreas endêmicas cronicamente infectadas por cinco anos.

O curso da ehrlichiose canina parece diferir entre raças. A raça Pastor Alemão parece ser mais susceptível, a resposta clínica à infecção por *E. canis* resulta em um estado severo ou moderado, ao passo que a raça Beagle, geralmente, apresenta um curso moderado e persistente da doença. Diferença na susceptibilidade destas raças pode ser atribuída à variação na habilidade de produzir resposta imune celular. O Pastor Alemão apresenta uma resposta imune celular de menor intensidade do que os Beagles, sendo que a resposta imune humoral não apresenta diferença (NYINDO *et al.*, 1980; HARRUS *et al.*, 1997a). COSTA *et al.* (2006) em estudo avaliando alguns possíveis fatores de risco e a soropositividade para ehrlichiose observaram que, em áreas rurais no Brasil, cães sem raça definida apresentavam associação significativa em comparação com animais de raça.

2.3. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A patogenia da ehrlichiose envolve um período de incubação que dura de oito a 20 dias (HARRUS *et al.*, 1997a) e pode ser seguido de três fases: aguda, subclínica e em alguns casos, crônica. Elas podem ser identificadas de acordo com as alterações clínico patológicas que apresentam (RIKIHISA, 1991a; WOODY; HOSKINS, 1991; HARRUS *et al.*, 1997a; NEER, 1998; BREITSCHWERDT, 1998).

Segundo HARRUS (1997a), os sinais clínicos na fase aguda são geralmente moderados e inespecíficos. Na maioria dos casos, quando o animal for imunocompetente, eles desaparecem sem tratamento e o cão passa para a fase assintomática ou subclínica. Os cães que não obtiverem sucesso na eliminação do parasito durante a fase subclínica podem se manter nessa fase por anos ou ingressar na fase crônica da doença.

Os sinais clínicos associados à fase aguda incluem febre, depressão, anorexia, linfadenopatia, perda de peso (WOODY; HOSKINS, 1991; ALMOSNY, 1998), e podem se apresentar moderados ou até mesmo inaparentes (IQBAL *et al.*, 1994; BREITSCHWERDT, 1999). Diversos outros sinais, como, manifestações do sistema nervoso central, oculares, respiratórias, também têm sido associados à ehrlichiose

(WOODY e HOSKINS, 1991). ALMOSNY e MASSARD (2002) afirmam que quadros clínicos agudos mais acentuados parecem ocorrer em regiões onde o aparecimento desta Rickettsiose é recente.

A fase aguda dura de duas a quatro semanas (BREITSCHWERDT, 1999). ALMOSNY (1998) relata que em um ensaio envolvendo infecção experimental na cidade do Rio de Janeiro, os animais iniciaram a reação febril entre o terceiro e o 15º dia após a inoculação, com a temperatura estando mais elevada entre o quinto e o 30º dia após a inoculação. Apesar de amplamente descritos, não foram observados, em citado experimento, sinais de hemorragia difusa na fase aguda da infecção.

Ainda nessa fase os microrganismos se multiplicam dentro de mononucleares circulantes e tecidos do sistema macrofítico fagocitário do fígado, baço e linfonodos, levando a uma linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular do fígado e do baço. As células infectadas são transportadas da corrente sanguínea para outros tecidos, especialmente pulmões, rins e meninges. Essas células infectadas aderem ao endotélio vascular, induzindo uma vasculite e infecção de tecido sub-entotelial (BREITSCHWERDT, 1999).

A primeira alteração hematológica observada em estudo experimental foi a ocorrência de plaquetas gigantes ou ativadas, a partir do terceiro dia pós-inoculação (ALMOSNY, 1998). A presença de macroplaquetas em esfregaços sanguíneos tem sido associada com o aumento na produção das mesmas na medula óssea (GRINDEM *et al.*, 1991; JAIN, 1993). De acordo com JAIN (1993) o achado de plaquetas atípicas na avaliação do esfregaço sanguíneo pode ser o primeiro indicativo de distúrbios na trombopoiese ou na função plaquetária.

Durante a fase aguda o consumo e sequestro excessivo de plaquetas levam à trombocitopenia. A contagem de leucócitos é variável e a anemia ocorre devido a uma supressão da produção e a destruição acelerada de eritrócitos (BREITSCHWERDT, 1999). Há uma celularidade megacariocítica na medula óssea de normal a aumentada, assim como da linhagem mielóide. Também há uma diminuição nos precursores eritróides, o que justificaria a anemia normocítica normocrômica (HOSKINS, 1991). Na maioria dos casos, os sinais da fase aguda se resolvem sem tratamento e os cães ingressam na fase subclínica da infecção (WOODY; HOSKINS, 1991; HARRUS *et al.*, 1997a).

ALMOSNY (1998), não observou, durante a fase aguda, casos acentuados de trombocitopenia, embora existisse uma variação cíclica na contagem das plaquetas,

sugerindo maior adaptação na relação parasito-hospedeiro. Segundo NEER (1998), a trombocitopenia tem sido um achado consistente em todas as fases da Ehrlichiose Monocítica Canina.

Desordens de sangramento costumam ser detectadas ocasionalmente em cães com ehrlichiose, mesmo sem trombocitopenia. Entretanto é normal não haver alterações em testes de coagulação, como Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) (KUEHN e GAUNT, 1985; HOSKINS, 1991; XAVIER *et al.*, 2001). HOSKINS (1991) afirmam que um eventual tempo de sangramento aumentado se justifica por uma trombocitopenia acentuada ou por alterações qualitativas nas plaquetas.

Durante a fase subclínica há uma normalização do peso, temperatura e demais sinais clínicos, entretanto algumas alterações laboratoriais podem persistir. Ocorre entre seis e oito semanas após a inoculação e é caracterizada por uma persistência variável de trombocitopenia, leucopenia e anemia sem a presença de sinais clínicos (WOODY; HOSKINS, 1991). Experimentalmente, cães imunocompetentes parecem eliminar o parasita e não desenvolvem a fase crônica da doença. Durante a fase subclínica a contagem total de células sanguíneas está levemente diminuída, especialmente as plaquetas (McDADE, 1990). Esta fase é caracterizada pela persistência de altos títulos de anticorpos e de sinais clínico-patológicos condizentes com a ehrlichiose (CODNER e FARRIS-SMITH, 1986).

Os cães na fase subclínica são carreadores da infecção, podendo hospedar o parasito por anos sem desenvolverem os sinais clínicos da doença crônica, ou quando imunocompetentes, esses cães podem eliminar o parasita e se recuperarem sem a necessidade de intervenção clínica (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; HARRUS *et al.*, 1998a). No caso desses animais serem incapazes de montar uma resposta imunológica efetiva, poderão ingressar na fase crônica da infecção (CODNER e FARRIS-SMITH, 1986; WOODY; HOSKINS, 1991; BREITSCHWERDT, 1999).

Na fase crônica, os sinais clínicos e alterações hematológicas podem variar de ausentes até extremamente graves, dependendo do caso em questão (NEER, 1998; BREITSCHWERDT, 1999). Sangramentos, mucosas hipocoradas, perda de peso acentuada, debilidade, sensibilidade abdominal, uveíte anterior, hemorragias de retina e sinais neurológicos consistentes com meningoencefalite tipificam os cães que desenvolvem manifestações da doença durante a infecção crônica. Além disso,

a infecção por *E. canis* pode induzir uma acentuada nefropatia por perda de proteínas. BREITSCHWERDT (1999) propôs que uma estimulação antigênica crônica por *E. canis* pode induzir uma glomerulonefrite causada por acúmulo de imunocomplexos.

Devido à imunossupressão presente em animais na fase crônica da ehrlichiose, infecções secundárias, por microrganismos oportunistas, podem ser reportadas (BREITSCHWERDT, 1999). Os animais também podem apresentar febre, emaciação, e edemas periféricos (HARRUS *et al.*, 1997a). Os achados hematológicos da fase crônica se assemelham aos da fase aguda (KUEHN; GAUNT, 1985). Uma monocitose persistente, assim como linfocitose, trombocitopenia e anemia não regenerativa são características proeminentes (HOSKINS, 1991).

Existem alguns fatores que afetam o grau de virulência da infecção, bem como o seu progresso, entre eles incluem: variações de cepas, raça, idade, estado imunológico e a presença ou não de outras doenças concomitantes (WOODY; HOSKINS, 1991; NEER, 1998).

A pancitopenia geralmente se dá por hipoplasia da medula óssea e ocorre na fase crônica acentuada (WOODY; HOSKINS, 1991; NEER, 1998). HARRUS *et al.* (1998b) propuseram que a *E. canis* induz a produção e/ou elaboração de um fator esplênico, que irá suprimir a hematopoiese. A ausência deste fator em cães esplenectomizados pode explicar a redução nos parâmetros eritrocitários vistos nos cães intactos. É possível que esse fator possa desempenhar um papel importante na supressão da medula óssea que ocorre durante a fase crônica da infecção por *E. canis*.

Diversos hemoparasitas podem ser encontrados simultaneamente no mesmo hospedeiro. Um fator determinante para tal é que muitos desses parasitas compartilham o mesmo carrapato vetor, no caso da *E. canis* o *R. sanguineus*, que também transmite *Babesia* spp., *Hepatozoon canis* e outras espécies do gênero *Ehrlichia* (SHAW *et al.*, 2001). Desta forma, cães de canis com alta exposição a carrapatos podem estar infectados simultaneamente com diversos patógenos transmitidos pelos mesmos. Esse fato possui extrema importância clínica, tanto na medicina veterinária como na humana (KORDICK *et al.*, 1999).

KORDICK *et al.* (1999) mostraram que a detecção de DNA de *Ehrlichia canis* foi constantemente associada a detecção do DNA de *Babesia* e *Anaplasma platys*, que se acredita ser transmitida ao cão pelo mesmo vetor que as espécies

previamente citadas (INOKUMA *et al.*, 2000). LOBETTI (1998) afirmou que a doença se apresenta mais grave quando associada com outras hemoparasitoses.

A porcentagem mais alta de plaquetas parasitadas por *A. platys* ocorre na fase inicial de parasitemia. Dentro de poucos dias após o aparecimento de plaquetas parasitadas há uma diminuição acentuada no número de plaquetas circulantes, e os microrganismos não são mais vistos. Após o desaparecimento do microrganismo a contagem de plaquetas se eleva rapidamente, atingindo valores normais dentro de três a quatro dias. Parasitemias e trombocitopenias subsequentes voltam a acontecer em intervalos de uma a duas semanas. Apesar da porcentagem de plaquetas infectadas diminuírem para em média de 1% ou menos com novas infecções, os episódios de trombocitopenia podem ser tão acentuados quanto na primeira parasitemia (HARVEY, 1998).

Infecções associadas envolvendo *E. canis* e *A. platys* são comumente encontradas, sendo sugerido que uma infecção por *A. platys* poderia intensificar o curso clínico da doença causada por *E. canis* (BREITSCHWERDT, 1999).

2.4. POTENCIAL ZOONÓTICO

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) a ehrlichiose é uma zoonose, sendo a *E. chaffeensis* e a *E. ewingii* as espécies mais envolvidas na casuística humana. Em 1996, a *E. canis* foi incriminada por causar infecções em pacientes que apresentavam estado febril, na Venezuela (PEREZ *et al.*, 1996). A ehrlichiose monocítica humana tem a *E. chaffeensis* como agente etiológico e causa grande morbidade e mortalidade no sudeste e centro sul dos Estados Unidos (PADDOCK *et al.*, 2001; CDC, 2006; SCHUTZE *et al.*, 2007; THOMAS *et al.*, 2007). A *E. ewingii* é a espécie responsável pela ehrlichiose granulocítica humana, doença similar a anaplasmoose granulocítica humana causada pelo *Anaplasma phagocytophilum* (BULLER *et al.*, 1999; PADDOCK *et al.*, 2001; GOODMAN *et al.*, 2003; LIDDELL *et al.*, 2003).

De 1986 a 1997 os serviços de saúde e outros laboratórios de diagnóstico dos Estados Unidos relataram ao Centro de Controle de Doenças (CDC) mais de 1200 casos de ehrlichiose humana, entre ehrlichiose monocítica e granulocítica, com predominância da primeira (CDC, 2006).

A ehrlichiose monocítica humana pode apresentar a forma sintomática ou assintomática. A forma sintomática tende a ser inespecífica, confundindo-se com diversas outras doenças infecciosas. Geralmente o curso da ehrlichiose varia, porém em situações em que o tratamento não é realizado imediatamente, casos fatais ou que necessitem de hospitalização podem ocorrer. As infecções por *E. ewingii* estão associadas a pacientes imunocomprometidos, a exemplo de transplantados e HIV positivos (PADDOCK *et al.*, 1997; THOMAS *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado uma infecção mais branda em pacientes infectados com a *E. ewingii* comparativamente a pacientes infectados com *E. chaffeensis* (PADDOCK *et al.*, 2001).

No Brasil, não há registro de infecção por *E. canis* em humanos, apesar da alta prevalência da doença em cães e de relatos sobre infestação de humanos por *R. sanguineus* (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006; LOULY *et al.*, 2006). Estudos sorológicos têm sugerido a ocorrência da infecção por *E. chaffeensis* em indivíduos saudáveis, bem como em casos de HIV positivo (CALIC *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2006). Em uma comunidade rural de Minas Gerais foi registrada uma prevalência de ehrlichiose humana por *E. chaffeensis* de 10,5%. Enquanto, que numa localidade na Região Amazônica não foi detectada a presença de *Ehrlichia* pela técnica de PCR em pacientes febris com histórico de exposição a carrapatos (LABRUNA *et al.*, 2007).

2.5. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

O diagnóstico de ehrlichiose canina é baseado nos sinais clínicos, alterações hematológicas, identificação do parasita em esfregaço de sangue periférico, sorológico e pelo emprego da biologia molecular por meio do teste da reação da polimerase em cadeia (PCR). Usualmente são efetuados apenas os diagnósticos clínico e hematológico, apesar de serem apenas presuntivos, em vista dos sintomas serem inespecíficos e as alterações hematológicas serem compatíveis com outras etiologias. No entanto estas são as técnicas rotineiras mais acessíveis (O'DWYER e MASSARD, 2001).

Cães infectados com a *Ehrlichia* apresentam alterações hematológicas como leucopenia, anemia, trombocitopenia, além da inversão da relação albumina e

gamaglobulina. Apesar das diversas descrições demonstrando a forte associação da trombocitopenia com cães infectados por *E. canis*, este fator não pode ser considerado como único critério diagnóstico, uma vez que infecções com outros hemoparasitos também provocam essa alteração. Além disso, a trombocitopenia pode ser imunomediada, decorrente de processos neoplásicos, de doenças inflamatórias ou resultante de infecção com outra etiologia. Contudo, a trombocitopenia no quadro clínico de cães de áreas endêmicas para ehrlichiose deve ser considerada como diagnóstico presuntivo dessa enfermidade (GRINDEM *et al.*, 2002; BULLA *et al.*, 2004; MACIEIRA *et al.*, 2005).

As doenças causadas por espécies do gênero *Ehrlichia* apresentam frequentes dificuldades para o diagnóstico, pois os diversos sinais clínicos associados com a doença são extremamente inespecíficos (WOODY; HOSKINS, 1991). Assim sendo, somente o diagnóstico clínico é difícil de ser realizado, devido à inespecificidade dos sinais e sintomas que podem estar acometendo os cães de forma isolada, ou em conjunto com a infecção por *E. canis* (MACIEIRA *et al.*, 2005).

O diagnóstico laboratorial da infecção causada por *E. canis* é extremamente importante e pode ser feito através de esfregaço de sangue periférico, corado pela técnica de Wright ou de Giemsa, buscando identificar mórula de *E. canis* em células mononucleares, que se localiza principalmente no citoplasma dos monócitos, ou em neutrófilos e linfócitos, dependendo da cepa envolvida. A identificação de mórulas nos esfregaços sanguíneos é difícil devido à baixa bacteremia que raramente ultrapassa 1% de células infectadas (IQBAL *et al.*, 1994; HARRUS *et al.*, 1998a).

A visualização de mórulas em mononucleares através da avaliação do esfregaço sanguíneo de sangue periférico ou de aspirados de tecidos constituem um diagnóstico definitivo para infecções causadas por espécies do gênero *Ehrlichia*. Entretanto, o achado de mórulas é difícil, costuma ocorrer somente na fase aguda da infecção e requer muito tempo de análise em cada esfregaço sanguíneo, tendo assim uma baixa sensibilidade e grande ocorrência de falsos negativos (RIKIHISA, 1991a; NEER, 1998).

O isolamento do agente a partir de cultura de células mononucleares também pode ser usado. Este método apresenta grande sensibilidade, o parasita pode ser isolado do sangue de cães experimentalmente infectados a partir de colheitas de sangue efetuadas dois dias após a infecção. Geralmente, o isolamento e cultivo da *E. canis* e *E. chaffeensis* são realizados em cultura de célula DH82, linhagem celular

de histiócito maligno de cão (RIKIHISA, 1991; TORRES *et al.*, 2002; AGUIAR *et al.*, 2007). Entretanto, o procedimento de reisolamento é pouco prático para uso em laboratórios clínicos quando o objetivo final é apenas o diagnóstico da doença, em função do resultado demorar de 14 a 34 dias para ser obtido (IQBAL *et al.*, 1994). Também deve ser considerado que a *E. canis* multiplica-se lentamente, infectando poucas células sanguíneas após a fase de maior bacteremia, influenciando a eficiência do isolamento em cultura e produzindo alguns resultados falso negativos (IQBAL *et al.*, 1994). Desta forma, a cultura e o reisolamento do agente é considerada apenas uma ferramenta de pesquisa (NEER *et al.*, 2002).

Segundo WOODY e HOSKINS (1991), exames de aspirados teciduais e impressões de amostras de biópsias, especialmente pulmões, linfonodos ou baço, para a procura de inclusões citoplasmáticas têm sido usados exames e impressões como técnicas confirmatórias de *E. canis*, entretanto são pouco úteis como procedimentos de rotina para o diagnóstico. De acordo com MYLONAKIS *et al.* (2003), o uso do diagnóstico citológico através da análise da capa leucocitária e linfonodos pode levar a um diagnóstico definitivo na fase aguda da doença. Em cães com linfadenopatia periférica, a sensibilidade é relativamente alta, e as mórulas de *E. canis*, que devem ser diferenciadas das outras estruturas intra-citoplasmáticas, são mais encontradas dentro de linfócitos do que monócitos.

A técnica sorológica mais empregada para o diagnóstico da infecção por *E. canis* é a imunofluorescência indireta (IFI), onde são procurados anticorpos do tipo Imunoglobulina-G (IgG) e que revela uma exposição ao agente etiológico (RISTIC *et al.*, 1972). Para um diagnóstico preciso de *E. canis* através de técnicas sorológicas, é preciso integrar a presença de anticorpos séricos específicos com resultados de outros métodos de diagnóstico e manifestações clínicas presentes, com o objetivo de confirmar um diagnóstico de infecção por *E. canis*. Somando-se a isso, ambos os estudos colocam que um título positivo para anticorpos contra *E. canis* quer dizer apenas que o animal foi exposto ao agente, podendo não apresentar infecção (RIKIHISA, 1991a; WOODY e HOSKINS, 1991; HARRUS *et al.*, 1998a; WANER *et al.*, 2001).

Na IFI, a soropositividade começa entre sete a 21 dias após a infecção e chega a níveis máximos após 80 dias e persiste quando o animal não é tratado (HARRUS *et al.*, 1998b). Os antígenos utilizados geralmente são procedentes de cultivo de células infectadas com *E. canis* (IQBAL *et al.*, 1994; TORRES *et al.*,

2002). De acordo com a padronização da técnica, a presença de títulos de anticorpos anti-*E. canis* em diluição superior a 1:40 é considerada como indicador de exposição do hospedeiro ao agente (RIKIHISA, 1991b; HARRUS *et al.*, 2002; AGUIAR *et al.*, 2007). Um aspecto negativo da IFI para diagnóstico de ehrlichiose é a possibilidade de ocorrer reações cruzadas, especialmente entre *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (ANDERSON *et al.*, 1991; RIKIHISA, 1991b; DUMLER *et al.*, 1995; WANER *et al.*, 1997; BREITSCHWERDT *et al.*, 1998a; DUMLER *et al.*, 2001; SUKSAWAT *et al.*, 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003; FISHMAN *et al.*, 2004), sendo que o título de IgG mostra-se, comparativamente, mais elevado quando a espécie de *Ehrlichia* que infectou o paciente é a mesma utilizada como antígeno no IFI. Por isso, a IFI apresenta especificidade baixa, embora possua boa sensibilidade (RISTIC *et al.*, 1972; RIKIHISA, 1991b; WANER *et al.*, 2001). Essa baixa especificidade torna-se ainda mais crítica com soros de títulos baixos (< 1:160), como foi observado por O'Connor *et al.* (2006).

O Dot-ELISA (Dot Blot) é uma técnica sorológica sensível e específica para detecção de anticorpos no soro e não requer estrutura laboratorial sofisticada. Assemelha-se ao ELISA indireto, diferindo somente pela adsorção do antígeno a uma membrana de nitrocelulose. A leitura do resultado é visual e a interpretação é simples, o resultado da reação permanece registrado na membrana de nitrocelulose, permitindo uma conferência posterior dos dados (WANER *et al.*, 2001; HARRUS *et al.*, 2002).

O kit comercial Immunocomb® (Biogal, Israel) que utiliza como fonte de antígeno *Ehrlichia* proveniente de cultivo *in vitro* e o Snap® 3DX (IDEXX Laboratories Inc., USA) que utiliza duas proteínas específicas de *E. canis* (p30 e p30-1) (OHASHI *et al.*, 1998; WANER *et al.*, 2001) são testes Dot-ELISA, amplamente utilizados no diagnóstico de ehrlichiose canina. Um teste ELISA com proteína recombinante da *E. canis* (rMAP2) como antígeno mostrou elevada sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-*E. canis* (ALLEMAN *et al.*, 2001).

Os testes sorológicos disponíveis atualmente para o diagnóstico da ehrlichiose canina apresentam vantagens por dispor de resultados qualitativos e quantitativos, o que, facilita o diagnóstico. Testes como IFI e o ELISA apresentam a desvantagem de necessitarem de equipamentos para leitura dos resultados (microscópio de fluorescência e leitor de ELISA) ao contrário dos testes Dot-ELISAs

nos quais os resultados são lidos visualmente, característica que facilita o diagnóstico sorológico para os médicos veterinários que trabalham em clínicas e em hospitais veterinários (PARANÁ, 2008).

Qualitativamente o Immunocomb, Snap® 3DX e o ELISA com rMAP2 são úteis no diagnóstico da ehrlichiose canina. Contudo, quantitativamente estes testes apresentam resultados variáveis, quando o título do soro testado é menor que 1:320. Nesse caso é indicada a repetição do teste no período de uma a duas semanas. Na avaliação da sensibilidade do Immunocomb, Snap® 3DX e o ELISA com rMAP2 em soros de cães positivos para *Ehrlichia* sp pela IFI os resultados variaram entre 71% a 86%. A sensibilidade desses testes passou a ser de 91% a 100% quando os soros avaliados tinham títulos superiores a 1:320 na IFI.

As particularidades de cada teste influenciam sua sensibilidade e especificidade. Os antígenos purificados ou recombinantes utilizados no diagnóstico podem aumentar a especificidade e diminuir a sensibilidade em virtude do menor número de epítomos B imunodominantes, ao contrário dos antígenos brutos solúveis ou organismo inteiro, a exemplo da técnica de IFI, que aumentam a sensibilidade pela presença de antígenos inespecíficos que possibilitam reações cruzadas com vários epítomos (BÉLANGER *et al.*, 2002; HARRUS *et al.*, 2002; O'CONNOR *et al.*, 2006).

O *Western blot* (WB) é outra técnica utilizada no diagnóstico de ehrlichiose canina cuja sensibilidade é semelhante à IFI. O princípio de detecção de antígenos é idêntico ao da técnica de Dot-ELISA. No WB, o antígeno solúvel é submetido à separação eletroforética em gel de poliacrilamida e transferido para uma membrana. A identificação das proteínas reconhecidas pelo soro imune é semelhante ao Dot-ELISA. Porém é uma técnica cara e demanda mais tempo, o que dificulta seu emprego na rotina (RIKIHISA *et al.*, 1992; IQBAL *et al.*, 1994).

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é um método de amplificação de DNA *in vitro*. Essa técnica tem sensibilidade e especificidade consideravelmente superior às técnicas parasitológicas, e pode ser empregada no diagnóstico da ehrlichiose a partir de amostras de necropsia e material de biópsia. Esta técnica permite a identificação da espécie de *Ehrlichia* envolvida na infecção, o que nem sempre é possível em outras técnicas diagnósticas, contudo, apresenta custo mais elevado e requer técnicos especializados (IQBAL *et al.*, 1994; WEN *et al.*, 1997; BREITSCHWERDT *et al.*, 1998a; HARRUS *et al.*, 1998a; MURPHY *et al.*, 1998;

DAVOUST *et al.*, 1999; HARRUS *et al.*, 2004; BULLA *et al.*, 2004; FENOLLAR, RAOULT, 2004).

A *nested*-PCR é uma técnica mais sensível que a PCR tradicional, por incluir na sua execução uma etapa de re-amplificação do produto com outro par de primers (WEN *et al.*, 1997). Em estudo comparativo entre a *nested*-PCR, WB, IFI e isolamento em cultura de célula, a despeito da boa sensibilidade do WB e do isolamento em cultivo celular, ficou demonstrado que estas técnicas têm a desvantagem de um custo elevado e de demandarem muito tempo de execução, ao passo que a PCR e a RIFI, além de apresentarem alta sensibilidade são técnicas mais rápidas (IQBAL *et al.*, 1994; WEN *et al.*, 1997).

STICH *et al.*, (2002) desenvolveram uma técnica de PCR com base num gene com sequencias repetitivas que codifica uma proteína de membrana multigênica, espécie-específica. O *nested*-PCR e o PCR convencional que utilizam este gene apresentaram maior sensibilidade do que a *nested*-PCR utilizando a sequencia de 16S rDNA. A PCR convencional tem a vantagem do menor custo e tempo de execução, entretanto a *nested*-PCR apresenta maior sensibilidade. Da mesma forma a PCR com primers da sequencia do gene que codifica a proteína p28 apresentou sensibilidade e especificidade superior a PCR com primers do gene 16S rRNA, para três isolados de *E. chaffeensis* (WAGNER *et al.*, 2004). Entretanto, várias PCRs utilizando a sequencia do gene 16S rRNA evidenciaram elevada sensibilidade, essa sequencia permite desenhar primers que detectam o gênero e a espécie de *Ehrlichia* o que torna possível, após a PCR convencional, efetuar a *nested*-PCR definindo a espécie com maior sensibilidade (WEN *et al.*, 1997; MURPHY *et al.*, 1998; BREITSCHWERDT *et al.*, 1998a; MACIEIRA *et al.*, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL

O experimento foi realizado no canil experimental do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, entre os meses de novembro-dezembro de 2010.

3.2 ANIMAIS

Foram selecionados 18 cães sem raça definida, com idade média de $3,4 \pm 1,5$ anos, de ambos os sexos, dentre a população de 80 animais examinados e que apresentavam sintomatologia da doença, pertencentes à Associação de Proteção Animal do município de Uberlândia, Minas Gerais.

O critério de inclusão no experimento foi de que o animal apresentasse pelo menos três dos seguintes sinais clínicos, de acordo com FEITOSA (2008): mucosas hipocoradas, linfadenomegalia, perda de peso, anorexia, letargia, esplenomegalia, hepatomegalia, febre, dispnéia e/ou ixodidiose. Além de trombocitopenia e reação positiva na sorologia para detecção de IgG anti-*E. canis*, identificada através do teste sorológico comercial DOT-ELISA (ImmunoComb®, Biogal, Israel).

Os animais selecionados foram vacinados, 15 dias antes do início do tratamento, contra cinomose, parvovirose, coronavirose, parainfluenza, adenovirose, hepatite infecciosa e leptospirose (Recombitec®, Merial, Campinas-SP), vermifugados com associação de praziquantel (50mg), pamoato de pirantel (144mg), febantel (150mg) e ivermectina (0,06mg) (Top Dog®). Para controle de ectoparasitas utilizou-se fipronil pour-on (Frontline Top Spot®), coleira de Diazinon (Xandog®) e prévia pulverização dos canis com amitraz (Triatox®, MSD Saúde Animal, Cotia-SP).

Os animais foram mantidos em canis coletivos, (seis por canil) durante todo o período do experimento. O ambiente era limpo duas vezes ao dia com sabão neutro, hipoclorito de sódio e desinfetado e desodorizado com cloreto de benzalcônio 15% (Herbalvet®). A alimentação, realizada com ração seca comercial do tipo econômica, fornecida duas vezes ao dia e água potável à vontade.

Após um período de adaptação de 7 dias, os animais foram reavaliados (d-7) e tratados com 10 mg/kg de doxiciclina, via oral (VO), BID, durante 21 dias consecutivos, e avaliados no primeiro dia (d0), 14º dia (d+14) e 21º dia (d+21) de tratamento. Em cada avaliação procedeu-se o exame físico geral, considerando: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (T°C), tempo de preenchimento capilar (TPC), coloração das mucosas, grau de desidratação, avaliação de linfonodos, escore de condição corporal (ECC), de acordo com o preconizado por Feitosa (2008).

3.3 EXAMES LABORATORIAIS

3.3.1. HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA

Para as análises hematológicas e bioquímicas foram utilizados 15 dos 18 cães selecionados. E destes 73,4% (11/15) eram fêmeas e 26,6% (4/15) machos. No decorrer do experimento três animais vieram a óbito por motivo de lutas para estabelecer dominância territorial.

Em cada momento realizou-se a coleta de sangue por venopunção da veia cefálica, e acondicionada em tubo próprio com anticoagulante (EDTA- Na^2) para determinações hematológicas e para realização da PCR. E outra fração armazenada em tubo próprio sem anticoagulante para a realização das dosagens bioquímicas. No Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, as amostras foram centrifugadas com velocidade de 5000 rpm, durante 5 minutos, em centrífuga Excelsa Baby (FANEM®, modelo 206), e o soro separado em alíquotas, em microtubos tipo eppendorf, e armazenados a menos 20°C até o momento das análises, no máximo cinco dias após a coleta.

As concentrações séricas de albumina, alanina amino transferase - ALT, fosfatase alcalina - FA, creatina quinase - CK, aspartato transaminase – AST, uréia e creatinina foram determinadas com *kits* comerciais (Labtest®), enquanto que a concentração sérica de globulina e relação albumina/globulina foi determinada por meio de cálculos aritméticos. Os níveis plasmáticos de proteína total foram determinados por refratometria (KANEKO, 2008). As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automático multicanal (ChemWell®), previamente calibrado (Calibra H) e aferido com soro controle (Qualitrol 1) à temperatura de 37°C.

O volume globular, hemoglobina, hematócrito, hemácias, plaquetas, leucócitos totais e os índices hematimétricos absolutos (volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular média - HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM) foram obtidos através do Analisador Hematológico Automático Veterinário Eletrônico (ABC VET – Horiba – ABX Diagnostics).

Foram coletadas amostras de sangue periférico de ponta de orelha para confecção de esfregaço sanguíneo, coradas com May – Grünwald – Giemsa (MGG), com o objetivo de identificar a presença de hemoparasitas e realização da contagem diferencial dos leucócitos.

Para a comparação do hemograma utilizou-se um grupo controle, composto por 15 cães (nove machos e seis fêmeas) da raça Shih tzu, hípidos, entre cinco e seis anos de idade, sem sinais clínicos e histórico de ehrlichiose, oriundos de um canil com assistência veterinária. Os animais apresentaram os valores dos constituintes do hemograma dentro dos valores de referência (KANEKO, 2008) e reação negativa na sorologia para detecção de IgG anti-*E. canis*, identificada através do teste sorológico comercial DOT-ELISA (ImmunoComb®, Biogal, Israel).

3.3.2. EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de sangue foram previamente congeladas a -20°C até a realização da extração de DNA, que foi realizada com utilização do kit comercial QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen™), de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi alíquotado em tubos estéreis de polipropileno de 2 mL, identificados e armazenados a -20°C, para utilização na PCR.

3.3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para amplificação de um segmento de 959 pares de base do gene VirB9 de *E. canis* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) EcavB9Fw (senso ou “forward”, 5'-CAT TAT CAT TTC AAT ACG TAA CTC-3') e EcavB9Rev (anti-senso ou “reverse”, 5'-TTT TGA TTT TCT TCT GAC ATA GTG-3') conforme descrito anteriormente (FELEK; HUANG; RIKIHISA, 2003). Para *A. platys*, foram utilizados os primers denominados Platys 16S F (5' AAG TCG AAC GGA TTT TTG TC-3') e Platys 16S R (5' CTC TCC CGG ACT CTA GTC-3'), que amplificam um segmento de 504 pares de base do gene 16S rDNA (INOKUMA *et al.*, 2000).

Nas PCRs, foram empregados 2,5 µL de amostra de DNA. Todos os primers (Invitrogen®) foram diluídos para ter uma concentração final de 20 pmol/µL, sendo utilizado 0,5 µL em reação de volume final de 12,5 µL. O Cloreto de Magnésio (MgCl₂ 50 mM, Invitrogen®) foi utilizado na concentração de 1,5 mM para as reações de *A. platys* e de 2,0 mM para *E. canis*. O tampão da PCR (10 mM Tris-Cl (ph=8,3),

50 mM KCl) (Invitrogen[®]) foi usado sempre na concentração 1X, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100 mM) (Invitrogen[®]) e 1,25 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]). Em toda PCR foi utilizado controle positivo da espécie alvo desejada e controles negativos da reação. As sequências térmicas usadas no termociclador (Biorad personal termol cycler[®]) foram as seguintes: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min; desnaturação final 94 °C por 1min, temperatura de anelamento de 58°C para *E. canis* e 60°C para *A. platys* por 1 min., extensão inicial 72 °C por 1 min. e extensão final de 72 °C por 7 min. totalizando 35 ciclos.

3.3.4. DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Todos os produtos amplificados gerados nas PCRs foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (Invitrogen[®]) a 1,5%, corado com SYBR Safe DNA stain (Invitrogen[®]) em cuba horizontal, com solução de TEB 1X pH 8,4 (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 6 mM EDTA) como fluido condutor de corrida. Na primeira canaleta de cada gel foi adicionado um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases (Invitrogen[®]). O gel foi visualizado com transluminador sob a luz UV utilizando o software da Locus biotecnologia para a obtenção das imagens.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, utilizou-se o programa Minitab - versão 15. (Minitab Inc, Pennsylvania, USA) e a análise descritiva apresentada com média aritmética e desvio-padrão. As variáveis, inicialmente, foram submetidas ao Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição paramétrica.

As variáveis com distribuição paramétrica (temperatura, FC, FR, leucócitos totais, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, albumina, proteína total, ALT, AST, FA, uréia, creatinina, globulina e relação albumina/globulina) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as medidas entre tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. As variáveis com distribuição não-paramétrica, basófilos e CK, foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Comparação Múltipla de

Dunn e a variável plaquetas foi analisada pelo teste de Friedman e pós-teste de Comparação Múltipla de Dunn's. Todos os testes apresentaram níveis de significância igual a 5% ($p \leq 0,05$).

Para a PCR foi realizada análise descritiva apresentada em porcentagem. Para demonstrar a associação entre ocorrência de sinais clínicos e intensidade de resposta no Dot ELISA, utilizou-se o teste de qui-quadrado ($p < 0,05$) (VIEIRA, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma população inicial de 80 animais examinados, 18 cães se adequaram aos critérios de inclusão, e destes 77,8% (14/18) eram fêmeas e 22,2% (4/18) machos. Foram utilizados cães sem raça definida, não sendo possível observar predisposição racial, porém de acordo com Harrus *et al.* (1997) e NYINDO *et al.* (1980) os cães SRD são considerados mais resistentes.

Para tratamento utilizou-se a doxiciclina a 10 mg/kg BID por ser o protocolo de eleição dos clínicos de pequenos animais, e por possuir rápida absorção e ampla distribuição sistêmica, podendo este tratamento durar de três a quatro semanas nos casos agudos e até oito semanas nos casos crônicos (WOODY e HOSKINS *et al.*, 1991). De acordo com HARRUS *et al.* (2004) cães tratados com doxiciclina tiveram uma diminuição de duas a quatro vezes no título de anticorpos entre 21 e 35 dias após o tratamento.

Na avaliação do eritrograma (Tab.1) todos os animais apresentaram um quadro inicial de trombocitopenia ($95,3 \pm 25,5 \times 10^3/\mu\text{L}$), o qual é relatado como a alteração hematológica mais evidente da doença (KEYSARY *et al.*, 1996; COHN, 2003; NEER e HARRUS, 2006) ocorrendo tanto na fase aguda quanto na fase crônica, embora nesta última seja mais frequente. É um achado consistente em todos os estágios da ehrlichiose, evidenciando a necessidade da investigação do agente em cães trombocitopenicos e anêmicos, porém a contagem normal de plaquetas nunca deve descartar a doença (YABSLEY *et al.*, 2008).

Tabela 1. Análise hematológica média de todos os cães na evolução do tratamento com doxiciclina¹ em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2010.

Parâmetros	Dias de avaliação durante o tratamento			Controle D0
	Início	+ 14 dias	+ 21 dias	
Hemácia (x10 ⁶ /μL)	5 ± 1,3 ^{aA}	6,7 ± 1,2 ^{bB}	6,8 ± 1,8 ^{bB}	6,8 ± 0,97 ^B
Hemoglobina (g/dL)	10,9 ± 2,6 ^{aA}	13,4 ± 2,4 ^{aB}	15,2 ± 4,2 ^{bB}	14,8 ± 2,2 ^B
Hematócrito (%)	31,8 ± 8,1 ^{aA}	39,5 ± 7,3 ^{abB}	45 ± 12,4 ^{bB}	42,0 ± 5,7 ^B
Plaqueta (x10 ³ /μL)	95,3 ± 25,5 ^{aA}	262,5 ± 106,6 ^{bB}	235,3 ± 135,7 ^{bB}	282,7 ± 83,3 ^B
VCM (fm ³)	58,3 ± 3,7 ^{aA}	59,8 ± 3,0 ^{aA}	65,9 ± 2,9 ^{bA}	63,5 ± 11,7 ^A
CHM (pg)	20,3 ± 1,3 ^{aA}	20,5 ± 1,1 ^{aA}	22,3 ± 1,2 ^{bA}	22,3 ± 3,6 ^A
CHCM (g/dL)	34,4 ± 2,1 ^{aA}	34 ± 1,4 ^{aA}	33,9 ± 1,0 ^{aA}	35,4 ± 3,3 ^A
Leucócitos (/μL)	15.911 ± 6.797 ^{aA}	16.718 ± 3.055 ^{aB}	14.215 ± 1.969 ^{aA}	11.433 ± 3.721 ^A

¹ 10mg de doxiciclina, via oral, BID, durante 21 dias consecutivos;

a,b Letras minúsculas diferentes na linha diferem estatisticamente entre os dias de tratamento (p ≤ 0,05).

A,B Letras maiúsculas diferentes na linha diferem estatisticamente do grupo controle (p ≤ 0,05).

Alguns autores ressaltam que cães clinicamente saudáveis com moderada trombocitopenia, aumento persistente do título de anticorpos anti-*E. canis* e linfocitose são identificados como cursando a fase assintomática da doença (CODNER e FARRIS-SMITH, 1986; WANER *et al.*, 1997; HARRUS *et al.*, 1998a).

A média da contagem de plaquetas deixou de indicar trombocitopenia no 14º dia de tratamento, porém, ao se avaliar individualmente os animais, 13,3% (2/15) e 26,6% (4/15) dos cães permaneceram com trombocitopenia aos 14 e 21 dias, respectivamente.

A trombocitopenia envolve vários processos, entre eles, crescente consumo de plaquetas pelo endotélio vascular inflamado, aumento do sequestro esplênico e destruição imunomediada que ocorre principalmente na fase aguda. Pode ainda ser secundária ao aumento na concentração do fator de inibição da migração plaquetária, que sugere intensificar o sequestro e estase de plaquetas, levando à sua redução no sangue periférico (HARRUS *et al.*, 1998a; BULLA *et al.*, 2004).

No início do tratamento, os animais apresentaram anemia microcítica e normocrômica, que são alterações frequentemente encontradas no eritrograma de animais com a doença (MOREIRA *et al.*, 2003; WALDEMARIN *et al.*, 2003; ORIÁ *et al.*, 2004). O tipo de anemia predominante é a normocítica normocrômica e, geralmente, está presente na fase crônica da doença, devido à depressão seletiva da eritropoiese causada por *Ehrlichia* (JAIN, 1993; HARRUS *et al.*, 1997).

Na avaliação inicial, observou-se que 80% (12/15) dos animais apresentaram anemia, sendo 50% (6/12) anemia microcítica normocrômica, 33,3% (4/12) do tipo normocítica normocrômica e 16,6% (2/12) microcítica hipocrômica. De acordo com WOODY e HOSKINS (1991), ORIÁ (2001) e MOREIRA *et al.* (2003) as anemias do tipo microcítica normocrômica e microcítica hipocrômica aparecem em porcentagem menor, o que não ocorreu no presente trabalho, tendo percentual maior a anemia microcítica normocrômica. A presença deste tipo de anemia se deve a supressão das séries eritróides, mielóides e megacariocíticas na medula óssea, principalmente na fase crônica da doença o que acarreta baixa ou nenhuma produção desses tipos celulares (BREITSCHWERDT, 2004).

O quadro de anemia apresentado nos animais doentes normalizou ao final do tratamento, porém na avaliação individual dois cães permaneceram com anemia normocítica normocrômica. Ettinger e Feldman (1997) acreditam que a anemia ocorra devido à supressão das séries eritróides, mielóides e megacariocíticas na medula óssea, principalmente, na fase crônica da doença, o que acarreta em baixa ou nenhuma produção desses tipos celulares.

Tabela 2. Análise do leucograma na evolução do tratamento com doxiciclina* em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

Parâmetros	Dias de avaliação no tratamento			Valores de Referência**
	Início	+ 14 dias	+ 21 dias	
Segmentados / μ L	8.637 $\pm$ 4.606 ^a	9.943 $\pm$ 4.100 ^a	8.391 $\pm$ 2.766 ^a	3.000 a 11.500
Eosinófilos / μ L	2.027 $\pm$ 1.820 ^a	861 $\pm$ 677 ^a	978 $\pm$ 517 ^a	120 a 1700
Basófilos / μ L	11,6 $\pm$ 43,6 ^a	32,5 $\pm$ 74,3 ^a	74,4 $\pm$ 231,2 ^a	Raros
Linfócitos / μ L	4.794 $\pm$ 4.113 ^a	4.191 $\pm$ 2.171 ^a	4.128 $\pm$ 2.060 ^a	1.000 a 4.800
Monócito / μ L	441,7 $\pm$ 362,4 ^a	1.691 $\pm$ 912 ^b	644,2 $\pm$ 304,6 ^a	150 a 1.350

* 10mg de doxiciclina, via oral, BID, durante 21 dias consecutivos;

** Kaneko, (2008)

a Letras semelhantes na linha não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

A interpretação da contagem de leucócitos (Tab 1-2), no início do tratamento (15.911 $\pm$ 6.797 / μ L) revelou um quadro normal, porém com a média de leucócitos próxima aos valores superiores do grupo controle (11.433 $\pm$ 3.721 / μ L) e, ao se avaliar individualmente os animais percebeu-se que 33,3% (5/15) apresentavam neutrofilia (KANEKO, 2008), sendo 60% (3/5) regenerativa com desvio à esquerda, o que é indicativo de resposta positiva do animal, e ocorre quando a medula óssea tem tempo suficiente para responder à maior demanda de neutrófilos nos tecidos

(JAIN, 1993). Os outros 40% (2/5) dos cães apresentaram leucocitose fisiológica determinando um leucograma de estresse (ROCCO, 2009).

A linfopenia foi encontrada em um dos animais no início do tratamento, achado marcante nas infecções agudas, na ativação de processos crônicos ou na fase inicial de regeneração das anemias (GARCIA-NAVARO; PACHALY, 1998). Em 46,6% (7/15) notou-se eosinofilia e em 46,6% (7/15) linfocitose, que indicam uma infecção prolongada e estimulação antigênica crônica (Tab.2).

O valor médio dos leucócitos totais e do diferencial mantiveram-se normais durante todo o período analisado (Tab.2), apesar de na avaliação individual 33,3% (5/15) dos cães permanecerem com linfopenia, sugerindo inabilidade em eliminar a infecção após a fase aguda da doença (WANER *et al.*, 1997; HARRUS *et al.*, 1998a). Apenas um animal apresentou leucocitose com desvio à esquerda regenerativa.

A ausência de um padrão no leucograma dos animais infectados pode ter ocorrido aos diferentes estágios de infecção natural nos animais selecionados, e por isto houve necessidade de avaliação individual. De acordo com Ettinger e Feldman (1997), na fase aguda a contagem é variável, na subclínica ocorre leucopenia e na fase crônica ocorre tanto leucopenia como leucocitose.

Na leitura das lâminas de esfregaço de sangue periférico não foram identificadas inclusões de *Ehrlichia spp.* em leucócitos, apenas a presença de *Hepatozoon canis* e *Babesia canis*. Porém, é importante ressaltar que a ausência de parasitas em esfregaços de sangue periférico não exclui a possibilidade de infecção (WOODY; HOSKINS, 1991).

Considerando que a visualização microscópica de mórula de *Ehrlichia spp.* ocorre durante a fase aguda da doença e em apenas 4% dos casos (WANER *et al.*, 2002), provavelmente os animais da presente pesquisa encontravam-se na fase subclínica ou crônica da doença. Outro fator que sugere a doença na fase subclínica é o fato da leitura do teste sorológico resultar na reação entre média positiva (1:20) a forte-positiva (1:320) no Dot ELISA. Segundo Lopez *et al.* (1999), altos títulos de anticorpos têm sido observados na fase subclínica, em razão da contínua estimulação antigênica, enquanto a ausência de reação na fase aguda pode indicar o início da soroconversão.

Na análise do proteinograma (Tab.3), observou-se a presença de hiperproteinemia em função de hiperglobulinemia, até o 14º dia de tratamento,

alteração comum encontrada na fase subclínica da doença. A hiperglobulinemia foi verificada em 57,1%, 69,2%, 81,2% e 28,6% dos animais, nos momentos -7, 0, +14 e +21 dias de tratamento, respectivamente. Segundo GOULD *et al.* (2000), isso ocorre devido um aumento da fração gama, induzindo hiperviscosidade sérica e exacerbação hemorrágica, por interferência física com plaquetas e fatores da coagulação, além de causar danos ao endotélio vascular e estase venosa.

Tabela 3. Análise do proteinograma sérico na evolução do tratamento com doxiciclina em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

		Proteínas totais (g/dL)	Globulina (g/dL)	Albumina (g/dL)	Relação A/G
Tratame	- 7 dias	7,4 ± 1,3 ^{ab}	4,8 ± 1,4 ^{ab}	2,6 ± 0,5 ^a	0,6 ± 0,3 ^a
	Início	7,7 ± 1,2 ^{ab}	5,2 ± 1,2 ^a	2,5 ± 0,5 ^a	0,5 ± 0,2 ^a
	+ 14 dias	7,7 ± 0,9 ^a	5,1 ± 1,1 ^a	2,6 ± 0,5 ^a	0,5 ± 0,2 ^a
	+ 21 dias	6,6 ± 0,8 ^b	3,9 ± 0,8 ^b	2,7 ± 0,5 ^a	0,7 ± 0,2 ^a
	Referência*	5,4 – 7,1	2,7 – 4,4	2,6 – 3,3	0,5 – 1,3

- Letras indicam diferença significativa para o teste de Tukey(p<0,05) para dados na mesma coluna

O quadro de hipoalbuminemia foi detectado em 42,9%, 53,8%, 37,5%, 28,6% nos momentos -7, 0, +14 e +21 dias de tratamento, respectivamente se diferença significativa. Tal fato poderia ser justificado por consequência de anorexia e diminuição da ingestão de proteínas, pela presença de distúrbios entéricos ou hepáticos graves, levando tanto à perda de albumina, como de globulina intestinal (WOODY; HOSKINS, 1991). Também pode estar associada ao sequestro ou edema originado da vasculite na fase aguda; e na fase crônica, da perda glomerular decorrente da deposição de imunocomplexos ou imunoestimulação crônica (CODNER; MASLIN, 1992; GOULD *et al.* 2000).

A hiperglobulinemia pode ser consequência do estímulo antigênico promovido pela bactéria, que desencadeia uma resposta humoral com a produção excessiva de globulinas (TIZARD, 2000). Essa produção pode levar a um quadro de hiperviscosidade sanguínea (CODNER; MASLIN, 1992), e, como mecanismo compensatório, o organismo elimina albumina pela urina, resultando em hipoalbuminemia, para manutenção da pressão oncótica (WOODY; HOSKINS, 1991). Isso poderia explicar à causa da associação da ehrlichiose com

hipoproteinemia por hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e redução da relação A/G, observada no presente estudo.

Tabela 4. Valores de uréia e creatinina séricos na evolução do tratamento com doxiciclina em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

		Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Tratame	- 7 dias	33,3 ± 7,6 ^a	0,67 ± 0,20 ^a
	Início	36,4 ± 5,3 ^a	0,71 ± 0,15 ^a
	+ 14 dias	46,1 ± 11,8 ^b	0,92 ± 0,10 ^b
	+ 21 dias	35,8 ± 10,4 ^a	0,79 ± 0,18 ^{ab}
	Referência*	21 – 60	0,5 – 1,5

- Letras indicam diferença significativa para o teste de Tukey ($p < 0,05$) para dados na mesma coluna

Ao se avaliar os parâmetros bioquímicos renais e hepáticos dos cães infectados com *E. canis* não foram observadas alterações significativas, sugerindo pouco envolvimento do agente nos órgãos aos quais está relacionado, ou mesmo à fase da doença em que se encontravam estes animais. Contudo, em cães experimentalmente infectados, na fase aguda pode ocorrer uma redução de albumina pela perda renal e não pela disfunção hepática (CODNER; MASLIN, 1992).

Avaliando o perfil renal e hepático dos cães diagnosticados com *E. canis*, não se observou aumento de uréia e creatinina em nenhum momento em relação ao valor de referência. De acordo com ALMOSNY (1998), a elevação sérica de uréia e creatinina pode estar relacionada à azotemia pré-renal, principalmente, nos animais com desidratação severa ou ainda quando há glomerulonefrite nos casos crônicos de ehrlichiose, o que não foi observado no presente trabalho.

Não se observou alterações significativas nos níveis séricos da fosfatase alcalina, da alanina aminotransferase e do aspartato aminotransferase, que de acordo com ALMOSNY (1998), esses níveis encontram-se elevados quando há dano hepático ou estresse sistêmico provocado por diversas doenças, sendo a ehrlichiose a mais comum. Segundo MENESES, (1995), essas alterações ocorrem mediante o estágio da doença.

Tabela 5. Valores das enzimas séricas Fosfatase alcalina (FA), Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST) e Creatina quinase (CK) na evolução do tratamento com doxiciclina em cães com ehrlichiose, na cidade de Uberlândia – MG, 2011.

		FA	ALT	AST	CK
		(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)
Tratam	- 7 dias	19,5 ± 5,8 ^a	14,5 ± 3,5 ^a	19,4 ± 4,1 ^a	78,0 ± 43,3 ^a
	Início	24,3 ± 11,4 ^a	14,4 ± 3,0 ^a	15,4 ± 3,6 ^a	30,4 ± 13,4 ^b
	+ 14 dias	29,3 ± 14,0 ^a	26,0 ± 17,2 ^b	18,5 ± 5,1 ^a	63,5 ± 21,7 ^a
	+ 21 dias	21,5 ± 8,2 ^a	17,6 ± 4,6 ^b	18,4 ± 5,6 ^a	48,5 ± 27,1 ^{ab}
	Referência*	20 – 156	21 – 102	25	<125

- Letras indicam diferença significativa para o teste de Tukey(p<0,05) para dados na mesma coluna

Todos os 18 animais incluídos no trabalho apresentaram trombocitopenia, linfadenomegalia e deram reação positiva no teste ELISA, capaz de determinar anticorpos da classe IgG específicos para *E. canis*. Um resultado positivo na sorologia não indica necessariamente infecção e sim exposição prévia do animal ao agente etiológico (PREZIOSI e COHN, 2002; NEER *et al.*, 2006).

Tabela 6. Resultados do teste rápido ELISA (ImmunoComb®, Biogal, Israel), na cidade de Uberlândia – MG, 2010.

Resultado do ensaio rápido de Elisa			
	Fraca-positiva	Média-positiva	Forte-positiva
Exame físico			
Apatia	0% (0/4) ^a	25% (1/4) ^a	70% (7/10) ^a
Hipertermia	0% (0/4) ^a	0% (0/4) ^a	60% (6/10) ^a
Linfadenomegalia	100% (4/4)	100 (4/4) ^a	100 (10/10) ^a
Mucosas hipocoradas	0% (0/4) ^a	100 (4/4) ^b	60% (6/10) ^{ab}
Hepatomegalia	25% (1/4) ^a	50% (2/4) ^a	30% (3/10) ^a
Esplenomegalia	25% (1/4) ^a	50% (2/4) ^a	50% (5/10) ^a
Eritrograma			
Trombocitopenia <160.000	100 (4/4) ^a	100 (4/4) ^a	100 (10/10) ^a
He < 5,5	75% (3/4) ^a	33,3% (1/3) ^a	37,5 (3/8) ^a
Hb < 12	75% (3/4) ^a	66,7% (2/3) ^a	62,5% (5/8) ^a
Ht <37	75% (3/4) ^a	100% (3/3) ^a	75% (6/8) ^a

Nota: letras minúsculas diferentes na linha significam diferença significativa no teste de qui-quadrado ($p < 0,05$)

Neste experimento, 22% (4/18) apresentaram reação fraca positiva (1:20 – 1:40), podendo justificar que esses animais estariam na fase crônica da doença, ou que, já haviam se recuperado da infecção, uma vez que, os títulos de anticorpos específicos permanecem circulantes. Considerando a possibilidade de que em alguns animais infectados recentemente, pode não ter havido tempo hábil para soroconversão, fazendo com que esses cães apresentem resultado negativo ou fraco positivo no teste ELISA (WANER *et al.*, 1996; WANER *et al.*, 2001; NEER *et al.*, 2002).

A reação médio positiva foi observada em 22% (4/18) (1:80 – 1:160), e desses, 100% (4/4) exibiram mucosas hipocoradas e anemia, 50% (2/4) hepatomegalia e esplenomegalia. 55% (10/18) apresentaram reação forte positiva (1:320 – 1:640), destes, 70% (7/10) tinham apatia, 60% hipertermia e mucosas hipocoradas e 75% anemia.

A soroconversão ou a ascensão dos títulos de anticorpos anti *E. canis* é considerada indicativa de infecção presente (PERRILE; MATUS, 1991), assim como a diminuição do título de anticorpos em animais tratados é indicativa de resposta positiva ao tratamento causando eliminação da infecção (PERRILE; MATUS, 1991; IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 1998a; WANER et al., 2000).

Manifestações clínicas citadas na literatura da fase aguda da doença, não foram observadas em 66,6% dos cães desta pesquisa (FRANK; BREITSCHWERT, 1999; MACHADO, 2004; NEER, 2006), sugerindo tratar-se de casos de infecção crônica. Na EMC, a infecção pode persistir por um longo período, e os animais infectados não apresentarem alterações clínicas durante muito tempo, consideradas como fase assintomática da doença. E podem apresentar sintomas de comprometimento sistêmico, como perda de peso, hiporexia e discretas alterações hematológicas. Quando isso ocorre, é impossível prever o momento em que ocorreu a infecção do animal, e o diagnóstico clínico é estabelecido mais tardiamente, na fase crônica (MACHADO, 2004).

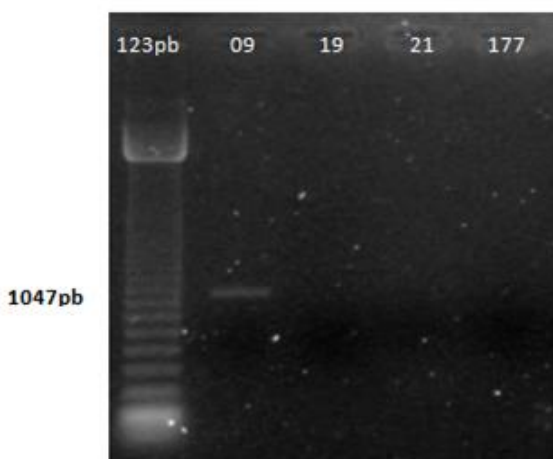
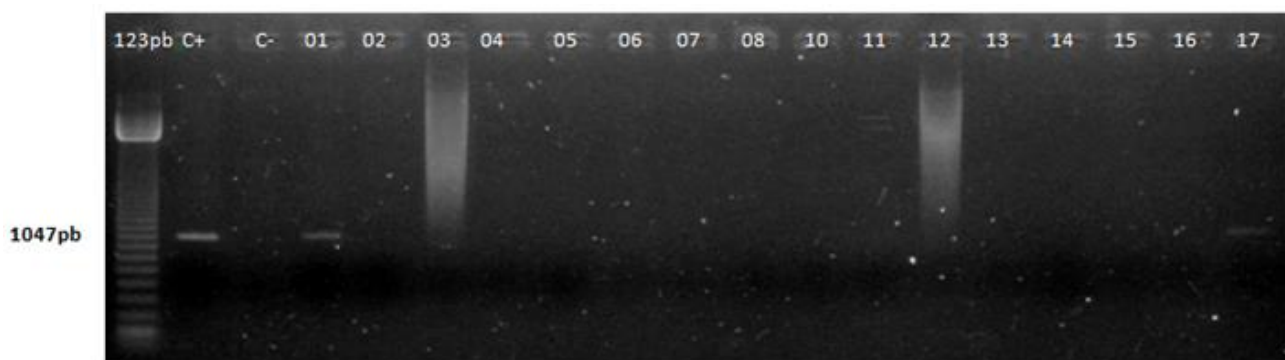
Manifestações clínicas inespecíficas como palidez de mucosas, hiporexia, apatia, letargia, linfadenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia são frequentemente relacionadas à EMC, quando não há presença de febre sugere-se que a doença esteja na fase crônica da infecção (NEER et al., 2002; FRANK; BREITSCHWERT, 1999).

A palidez das mucosas verificada em 10 animais pode ser explicada pela anemia secundária devido à trombocitopenia (HARRUS et al., 1997; FRANK; BREITSCHWERT, 1999). Ocorre hipoplasia megacariocítica e inflamação do endotélio vascular, que desencadeia o consumo de plaquetas devido à destruição imunomediada por deposição de imunocomplexos, além de sequestro do baço pela diminuição de sua meia-vida. (ALMOSNY et al., 2002; COHN et al., 2003).

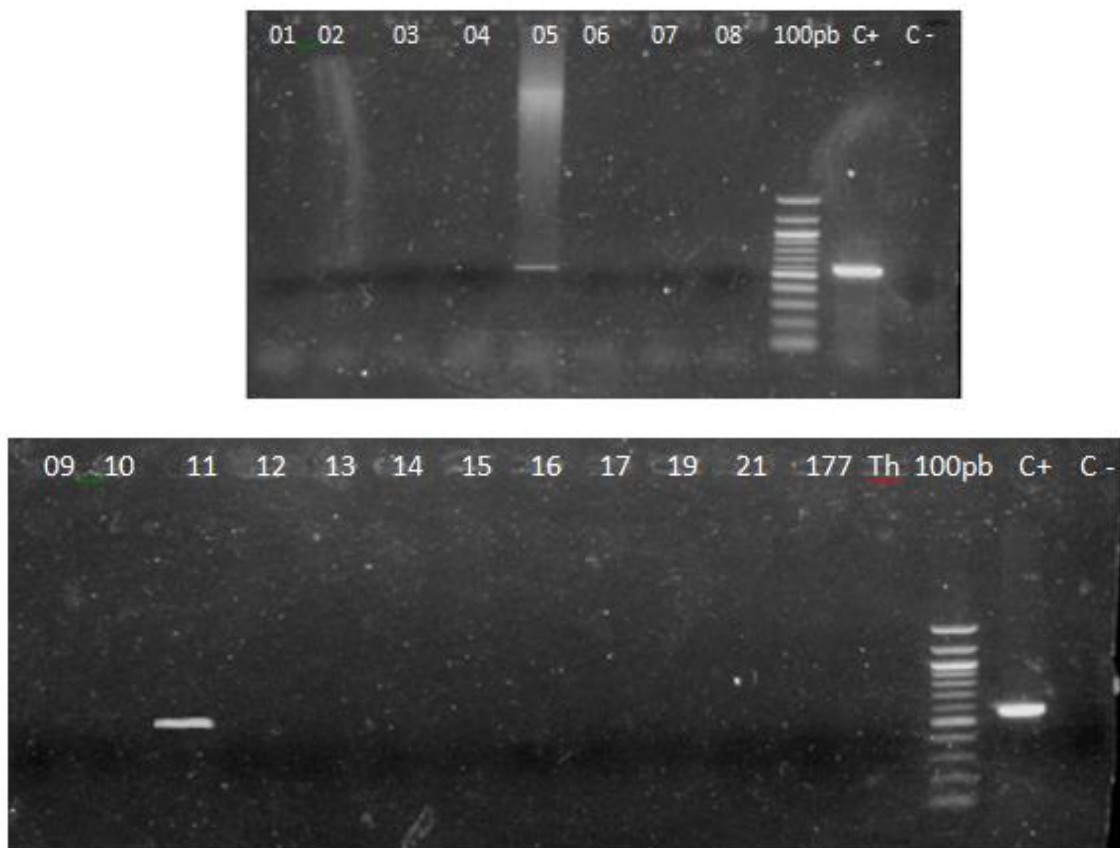
O consumo de plaquetas pode ser justificado devido à liberação do fator III plaquetário que possui atividade pró-coagulante e promove a diminuição da adesão destas células. Ocasionalmente redução numérica que ocorre durante a fase aguda da infecção associado à presença de anticorpos antiplaquetários, além da ação direta da *E. canis* sobre essas células circulantes (ALMOSNY et al., 2002; COHN et al., 2003).

Outra hipótese que pode estar associada é que distúrbios plaquetários ocorram pela superposição da membrana de plaqueta com macroglobulinas, que

também são responsáveis por sua destruição auto-imune (ALMOSNY *et al.*, 2002 ; COHN *et al.*, 2003). A ativação da imunidade humoral gera o aparecimento de anticorpos antinucleares, antiplaquetários e antiéritrocitários na circulação, existindo evidências da produção de linfocinas e de fator inibidor da migração de leucócitos. Outra possível alteração hematológica pode ser o decréscimo da produção de células vermelhas, ocasionadas pelo processo inflamatório (ALMOSNY *et al.*, 2002; HARRUS *et al.*, 2004).



Figuras 1 e 2. Resolução em gel de agarose dos produtos de PCR extraídos com Fenol *E. canis*. Marcador molecular 123-pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; amostras positivas: 01, 09, 17.



Figuras 3 e 4. Resolução em gel de agarose dos produtos de PCR extraídos com Fenol para *Anaplasma platys*. Marcador molecular 100-pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; amostras positivas: 02 e 11.

A PCR mostrou-se positiva para *E. canis* em apenas três animais no pré tratamento. Essa técnica tem sido utilizada com objetivo de confirmar o diagnóstico clínico da ehrlichiose canina, (MCBRIDE *et al.*, 1996; WANER, 1997; HASEGAWA, 2005). Na fase aguda da infecção o DNA ehrlichial obtido de amostra de sangue periférico pode ser detectado a partir do quarto dia após a infecção.

Um animal apresentou-se positivo durante e no fim do tratamento. Reação positiva na PCR após duas semanas de tratamento pode indicar resistência do parasita à droga na dose utilizada. Para considerar a esterilização da infecção, é necessário dois testes consecutivos com resultados negativos (HARRUS *et al.*, 2004).

Embora seja uma boa alternativa para o diagnóstico da infecção, no presente trabalho foram detectados apenas três animais positivos. A PCR torna-se menos sensível como indicador da eliminação da infecção após o tratamento. BANETH (2009) relatou que ela torna-se negativa em aproximadamente nove dias após

tratamento e quando é positiva indica a persistência da infecção. De acordo com HARRUS *et al.* (2004), os resultados negativos podem indicar a esterilização da infecção, como também sua persistência residual no baço ou na medula óssea.

De acordo com HARRUS *et al.*, (2004), a detecção de material genético da *E. canis*, realizada a partir de amostras de sangue periférico, é inferior em relação à pesquisa da bactéria no baço e medula óssea. Isso pode levar a resultados enganosos em casos de infecções crônicas nas quais a PCR de amostra de sangue periférico revela-se negativa (COHN, 2003). Na PCR de punção de baço realizada nesse estudo logo após o fim do tratamento, todas as amostras se apresentaram negativas, o que não indica eliminação do parasita. Esse fato contrapõe o estudo de FARIA (2006), que realizou um estudo comparativo de detecção de DNA de *E. canis* em sangue total e em aspirado de baço pela nested PCR em cães naturalmente infectados, verificando maior sensibilidade do segundo. Como o teste “padrão ouro” para determinar a eliminação da infecção por *E. canis* nos cães ainda não foi estabelecida, o DNA ehrlichial detectado a partir de aspirados esplênicos pode persistir de microrganismos mortos, não apresentando infecção ativa (BARSTCH; GREENE, 1996; NEER *et al.*, 2006).

Dois animais se apresentaram positivos na PCR para *Anaplasma platys*, simultaneamente um deles apresentava um quadro de linfadenomegalia, mucosas hipocoradas e reação média positiva no ImmunoComb, e o outro, hipertermia, apatia, linfadenomegalia e reação forte positiva. De acordo com BREITSCHWERDT *et al.*, 1998; KORDICK *et al.*, 1999; O'DWYER e MASSARD, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003; DOYLE *et al.*, 2005; YABSLEY *et al.*, 2008, doenças concomitantes podem intensificar os sinais clínicos da EMC. Considerando-se que o *R. sanguineus* é transmissor de outros hemoparasitas, é relativamente comum encontrar infecções mistas causadas por *Anaplasma platys*, *Babesia canis*, *Bartonella vinsonii* e *Hepatozoon canis*. Infecções por duas ou mais espécies diferentes de *Ehrlichia* também já foram identificadas em cães. Entretanto, dificilmente diferenciam-se clinicamente e o tratamento das infecções simples daquelas mistas.

Embora tenha ocorrido uma melhora significativa no estado geral dos cães, observou-se que o quadro hematológico ainda não havia estabelecido sua plenitude em todos os animais ao final do tratamento com a doxiciclina. Acredita-se que essa recuperação hematológica venha a ocorrer tardiamente, sendo necessário pesquisas que acompanhem estes animais por um período maior a fim de avaliar

mais precisamente o momento de recuperação ou persistência em infecções naturais na ehrlichiose canina.

No fim do tratamento, nenhum dos animais apresentou as manifestações clínicas observadas anteriormente, apenas um animal manteve positivo ao teste molecular, sugerindo resistência ao tratamento na dose utilizada. Os demais que tiveram o resultado negativo podem ter tido a eliminação do agente infeccioso, porém não se pode afirmar certamente, uma vez que, as espécies de *Ehrlichia* apresentam tropismo tecidual por células de pulmões, rins, baço, olhos e meninges (DAGNONE *et al.*, 2003).

5. CONCLUSÃO

O estudo realizado permitiu concluir que as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas observadas nos cães com infecção por *E. canis* são gerais e inespecíficas. O leucograma não obedeceu um padrão entre os animais. Anemia, leucopenia e trombocitopenia podem ser observadas isoladamente ou associadas em cães doentes, infectados por *E. canis*, como também podem estar ausentes nos cães com infecção inaparente.

O tratamento com doxiciclina é eficiente, pois aos 21 dias de tratamento há melhora no quadro de anemia e trombocitopenia, porém não se pode afirmar que há eliminação do parasita.

Um animal apresentou PCR positiva ao final do tratamento, sugerindo que haja resistência ao tratamento usual com doxiciclina. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta importante para o diagnóstico etiológico da infecção por *E. canis*, podendo apresentar resultados positivos ou falsos negativos.

O diagnóstico da infecção por *E. canis* deve ser baseado nos aspectos clínicos, alterações hematológicas como anemia e trombocitopenia, títulos de anticorpos anti-*E. canis*, e confirmado pela presença de material genético do organismo no sangue circulante.

A alta prevalência de *E. canis* em cães trombocitopênicos e anêmicos não exclui a necessidade da pesquisa do microrganismo na ocorrência destas alterações hematológicas. Além disso, a investigação de outros agentes infecciosos, neoplasias ou doenças imuno-mediadas é necessária para o diagnóstico definitivo da doença,

devido à ocorrência de coinfeções ou outros processos que cursam com as mesmas alterações hematológicas.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.S.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.

ALLEMAN, A. R.; MCSHERRY, L.J.; BARBET, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; SORENSON, H. L.; BOWIE, M. V.; BÉLANGER, M. Recombinant Major Antigenic Protein 2 of *Ehrlichia canis*: a Potential Diagnostic Tool. **Journal Clinical Microbiology**. Washington, v. 39, n.7, p. 2494- 2499. 2001.

ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquard, 1935): **Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. Seropédica, 1998. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração: Parasitologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: LF Livros de Veterinária Editora. 135p, 2002.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N.R.P. (Ed.) **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002.

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

ANDERSON, B. E.; GREENE, C. E.; JONES, D. C.; DAWSON, J. E. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading: International Union of Microbiological Societies, v. 42, n. 2, p. 299-302, 1992.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.321-325, 2009.

BARTSCH, R. C., GREENE, R. T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 4, p. 271-274, 1996.

BÉLANGER, M.; SORENSON, H. L.; FRANCE, M. K.; BOWIE, M. V.; BARBET, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; ALLEMAN, A. R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 40, n. 9, p. 3506-3508, 2002.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* stains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 42, n. 2, p. 362-368, 1998.

_____ Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998a.

_____ Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strain. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 42, n.2, p.362-368,1998b.

BREITSCHWERDT, E. B., *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 2, p. 125-128, 1999.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO Jr, J. P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and

infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146, 2004.

BULLER, R. S.; ARENS, M.; HMIEL, S. P.; PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; RIKHISA, Y.; UNVER, A.; GAUDREAULT-KEENER, M.; MANIAN, F. A.; LIDDELL, A. M.; SCHMULEWITZ, N.; STORCH, G. A. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. **New England Journal Medicine**. v. 341, n. 3, p. 148-55. 1999.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C.M.B.M.; MAFRA, C.L.; LEITE, R. C.; Walker, D.H. Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 8, n. 3, p. 259-262. 2004.

CARLOS, R. S.; MUNIZ NETA, E. S.; SPAGNOL, F. H.; OLIVEIRA, L. L.; DE BRITO, R. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus-Itabuna, State of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States; a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. CDC, Atlanta, GA. v.55, n.RR-4, 36p, 2006.

CODNER, E. C.; FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 189, n. 1, p. 47-50, July 1986.

CODNER, E. C.; MASLIN, W. R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 3, p. 294-299, 1992.

COHN, L. A; Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n.4, p.863-884, 2003.

COSTA, P. S. G.; VALLE, L.M.C.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. More About Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: Serological Evidence of Nine New Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.10, n.1, p. 7-10. 2006.

DAGNONE, A. S.; De MORAIS, H. S.VIDOTTO, M. C. JOJIMA, F. S.;VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital popularion in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n.4, p. 285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO FILHO, S. P. Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the dog brown tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**. v. 152, p. 173–185, 2008.

DAVOUST, B., Boni, M., Parzy, D., 1999. Apport du laboratoire au diagnostic de l'ehrlichiose monocyttaire canine. **Revue Française dès Laboratoire**. V. 310, p. 25–32, 1999.

DAWSON, J. E.; EWING, S. A. Susceptibility of Dogs to Infection with Ehrlichia chaffeensis, causative agent of human ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 53, n. 8, p. 1322-1327, Aug. 1992.

DINIZ, P. P. V. P.; Schwartz, D. S.; Morais, H. S. A.; Breitschwerdt, E. B. Surveillance for Zoonotic Vector-Borne Infections Using Sick Dogs from Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 7, n. 4, p. 689- 697, 2007.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F.; Existence en Algérie d'une Rickettsia du Chien Bull [S.I.]: [Société de Pathologie Exotique](#), v. 28, p. 418-419, 1935.

DOYLE, C. L.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCK, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostic**, v.7, n.4, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J.S.; ASANOVICH, K.M.; BAKKEN, J.S.; RICHTER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J.E. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *Ehrlichia*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, n.5, p.1098-1103. 1995.

DUMLER, J. S.; BERKET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKISHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonymus or *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2164, 2001.

ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstias do Cão e do Gato**. 4. ed. São Paulo, Editora Manole, p. 543-552, 1997.

EWING, S. A. Canine ehrlichiosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, London: Academic Press Inc., v. 13, p. 331-353, 1969.

FARIA, J. L. M. Estudo comparativo de detecção de DNA de *Ehrlichia canis* em sangue total e em aspirado de baço pelo nested PCR em cães naturalmente infectados. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária**, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

FEITOSA, F. L. F.; **Semiologia Veterinária, A Arte do Diagnóstico**. 1ed., São Paulo, Editora Roca, p.77-102, 2008.

FENNOLAR, F.; RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. ***Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica***. v. 112, p. 785-807, 2004.

FISHMAN, Z.; GONEN, L.; HARRUS, S.; STRAUSS-AYALI, D.; KING, R.; BANETH, G. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. ***Veterinary Parasitology*** v.119, p. 21-26, 2004.

FRANK, J. R.; BREITSHWERDT, E.B.; Retrospective study of Ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. ***Journal of Veterinary Internal Medicine***, v.13, p.194-201, 1999.

FRITZ, C. L. Emerging tick-borne diseases. ***Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice***, v. 39, n. 2, p. 265-278, 2009.

GALVÃO, M. A. M.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M. M.; CALIC, S. B.; SOUSA, R.; GALVAO, M..AM. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted fever endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. ***Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica***.v.71, p. 93-7, 2004.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K., PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. 1 Ed. Livraria Varela, 1998.

GOODMAN, R. A.; HAWKINS, E. C.; OLBY, N. J.; GRINDEM, C. B.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E. B. Molecular identification of *Ehrlichia ewingii* infection in dogs: 15 cases (1997–2001). ***Journal of the American Veterinary Medical Association***. v. 222, n.8, p. 1102-1107. 2003.

GOULD, D.J. *et al.* Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. **Journal Small Animal Practice**, v.41, n.6, p. 263-265, 2000.

GREENE, C. E. IN: GREENE, C. E., **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. W. B. Saunders, 3^aEd. Philadelphia, p. 1440, 2005.

GREIG, B.; ASANOVICH, K. M; ARMSTRONG, P. J.; DUMLER, J. S. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 34, n. 1, p. 44-48, Jan. 1996.

GRINDEM, C. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; CORBETT, W. T.; JANS, H. E. Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases. **Veterinary Clinical Pathology**, Davis: American Society for Veterinary Clinical Pathology, v. 20, n. 2, 1991.

GRINDEM, C.B., BREITSCWERDT,E. B., CORBETT, W.T., JANS, H.E. Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases. **Veterinary Clinical Pathology**. v.20, p. 38-43. 2002.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 36, n. 7, p. 937-940, July. 1975.

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v. 141, p. 360-363, 1997a.
HARRUS, S., BARK, H., WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: An update. **The Compendium on Continuing education for the practicing veterinarian**, v.19, n.4, p.431-444, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; BARK, H. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n.7, p.2140-2142, 1998a.

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

HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H.; MAHAN, M.S.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v.86, p. 361-368, 2002.

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n. 11, p.4488-4490, 2004.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago: The University of Chicago Press, Journals Division, v. 137, n. 2, p. 182-188, Feb. 1978.

HARVEY, J. W. Haemobartonellosis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 166-171, 1998.

HASEGAWA, H.Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular**. 2005. 134f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HUXSOLL, D. L.; AMYX, H. L.; HELMET, I. E.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; GOCHENOUR, W. S. Laboratory studies of tropical canine pancytopenia. **Experimental Parasitology**, London: Academic Press Inc., v. 31, p. 53-59, 1972.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 38, n. 11, p. 4219-4221, Nov. 2000.

INOKUMA, H.; YOSHIKAWA, Y.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M. Molecular survey of Babesia infection in dogs in Okinawa, Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam: Elsevier Science B.V., v. 121, n. 3-4, p. 341-346, May 2004.

IQBAL, Z.; Chaichanasiriwithaya, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, July 1994.

IRWIN, P. J.; HUTCHINSON, G. W. Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 6, p. 204-209, June 1991.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**, Malvern, Pennsylvania: Lea e Febiger, p. 105-13, 2 1993.

JOHANSSON, K. E.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; GUNNARSSON, A.; MALMQVIST, M.; OLSSON, E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. **Research in Veterinary Science, London: British Veterinary Association**, v. 58, n. 2, p.109-112, Mar. 1995.

KAKOMA, I.; HANSEN, R. D.; ANDERSON, B. E.; HANLEY, T. A.; SIMS, K. G.; LIU, L.; BELLAMY, C.; LONG, M. T.; BAEK, B. K. Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 32, n. 1, p. 170-175, Jan. 1994.

KANEKO, J.J. *et al.* **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic, 932p, 2008.

KEYSARY, A.; WANER, T.; ROSNER, M.; WARNER, C.K.; DAWSON, J.E.; ZASS, R.; BIGGIE, K.L.; HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of Ehrlichia canis in Israel. **Veterinary Parasitology**. v.62, p.331-340, 1996.

KORDICK S. K.; BREITSCHWERDT E. B.; HEGARTY, B. C.; SOUTHWICK K. L.; COLITZ C. M.; HANCOCK, S. I.; BRADLEY J. M.; RUMBOUGH R.; MCPHERSON J. T.; MACCORMACK, J. N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 37, n. 8, p. 2631-2638, Aug. 1999.

KUEHN, N. F.; GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 186, n. 4, p. 355-358, Feb. 1985.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clinica Veterinária**. v.4, n.30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group Rickettsia in the tick Haemaphysalis juxtakochi in Rondonia, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.127, p.169–174, 2005.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 143, p.189–195. 2007.

LEWIS, G. E. Jr.; HUXSOLL. D. L.; RISTIC, M.; JOHNSON, A. J. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with Ehrlichia equi, etiologic

agent of equine ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 36, n.1, p. 85-88, Jan. 1975.

LEWIS, G. E. Jr.; RISTIC, M.; SMITH, R. D.; LINCOLN, T.; STEPHENSON, E. H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago : American Veterinary Medical Association, v. 38, n. 12, p. 1953-1955, Dec. 1977.

LIDDELL, A. M.; STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A.; SUMNER, J. W.; PADDOCK, C. D.; GAUDREAU-KEENER, M.; ARENS, M. Q.; STORCH, G. A. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 10, p. 4617-4622. 2003.

LOBETTI, R.G. **Canine babesioses**. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet., v.20, p.418-430, 1998.

LOPES, J., CASTILLO, A., MUNOZ, M. *et al.*, Hallazgo de *Ehrlichia canis* em Chile, informe preliminar. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.31, n.2, p. 1-5, 1999.

LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; BORGES, L. M. F.; OLIVEIRA, V. F.; MENEZES, L.B.; LINHARES, G. F. C. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em humanos. **Ciência Animal**. v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MACHADO, R.Z. Erliquise canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 3-57, 2004.

MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. M.; FREIRE, I. M.; LINHARES, G. F.; ALMEIDA, N. K.; ALMOSNY, N. R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MADEWELL, B. R.; GRIBBLE, D. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg: **American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 5, p. 512-514, Mar. 1982.

McBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.; GAUNT, D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G.Y.; OSBURN, B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.441-447, 1996.

McDADE, J. E. Ehrlichiosis – A disease of animals and humans. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago: The University of Chicago Press, Journals Division, v. 161, n. 4, p. 609-617, 1990.

MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. M.; FREIRE, I. M.; LINHARES, G. F.; ALMEIDA, N. K.; ALMOSNY, N. R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Erliquiose Canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**. v.21, n.1, p.167-174, 2005.

MENESES, I. D. S. et al. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. Revista **Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

MOREIRA, S.M.; AL, E. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 141-147, 2003.

MOREIRA, S.M. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**. v.35, n.4, p.958-960, 2005.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., v. 79, n. 4, p. 325-339, Nov. 1998.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., v. 91, n. 2-3, p. 197-204, Feb. 2003.

NAKAGHI, A.C.H. ; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**. v.38, n.3, p.766-700, 2008.

NEER, T.M.; Ehrlichiosis: Canine monocytic and granulocytic ehrlichioses. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 139-147. 2006.

_____ **Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis**. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia : Saunders, 1998. Cap.28, p.139-147.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN M. R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia: J.B. Lippincott, v. 16, n. 3, p. 309-315, May-June 2002.

NEER, T. M., HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection – Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminatum*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* Infections). In: Greene, C. E. **infectious diseases in the dog and cat**. St. Louis: W.B. Saunders Company, p. 203-216, 2006.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J.L.; CARSON, C.A.; STEPHENSON, E.H. Cell-mediated and humoral responses of German Shepherd dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.250-254, 1980

O'CONNOR, T. P.; HANSCOM, J. L.; HEGARTY, B. C.; GROAT, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. **American Journal of Veterinary Research**. v. 67, n. 2, p. 206-210. 2006.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C. L. Aspectos Gerais da Hepatozoonose Canina. **Revista Clínica Veterinária**, ano VI, n.31, p.34-39, 2001.

ONOFRIO, V. C.; LABRUNA M.B.; BARROS-BATTESTI, D.M.. Comentários e chaves para as espécies do gênero Ixodes. In: Darci Moraes Barros-Battesti; Márcia Arzua; Gervásio Henrique Bechara. (Org.). **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical**: Um guia ilustrado para identificação de espécies. 1 ed. São Paulo:VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, v. 5, p. 41-51. 2006.

ORIÁ, A. P., PEREIRA, P.M., LAUS, J.L. Uveíte em cães infectados com *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1289-1295, 2004.

OHASHI, N.; UNVER, A.; ZHI, N.; RIKIHISA, Y. Cloning and Characterization of Multigenes Encoding the Immunodominant 30-Kilodalton Major Outer Membrane Proteins of *Ehrlichia canis* and Application of the Recombinant Protein for Serodiagnosis. **Journal Clinical Microbiology**. v. 36, n.9, p. 2671–2680. 1998.

PADDOCK, C.D; CHILDS, J.E. *Ehrlichia chaffeensis*: prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**. v.16, p.37-64, 2003.

PADDOCK, C. D.; FOLK, S. M.; SHORE, G. M.; MACHADO, L. J.; HUYCKE, M. M.; SLATER, L. N.; LIDDELL, A. M.; BULLER, R. S.; STORCH, G. A.; MONSON, T. P.; RIMLAND, D.; SUMNER, J. W.; SINGLETON, J.; BLOCH, K. C.; TANG, Y; STANDAERT, S. M.; CHILDS, J. E. Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in Persons Coinfected with Human Immunodeficiency Vírus. **Clinical Infectious Diseases**. v. 33, p.1586–1594. 2001.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J.W.; SHORE, G.M.; BARTLEY, D.C.; ELIE, R.C.; MCQUADE, J.G.; MARTIN, C. R.; GOLDSMITH, C.S.; CHILDS, J.E. Isolation and Characterization of *Ehrlichia chaffeensis* Strains from Patients with Fatal Ehrlichiosis. **Journal Clinical Microbiology** v. 35, n. 10 p. 2496–2502, 1997.

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

PEREZ, M. *et al.* Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals New York. Academy Science**, v. 1078, p. 110-117, 2006.

PERILLE, A.L.; MATUS, R.E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, p. 195-198, 1991.

PUSTERLA, N.; HUDER, J.; WOLFENSBERGER, C.; LITSCHI, B.; PARVIS, A.; LUTZ, H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology, Washington DC: American Society for Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2307-2309, Sept. 1997.

PREZIOSI, D. E.; COHN, L. A. The increasingly complicates story of *Ehrlichia*. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, [S.l.]: **Veterinary Learning System**, v. 24, n. 4, p. 277-288, Apr. 2002.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 4, n. 3, p. 286-308, July 1991a.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 3, p. 286-308, 1991b.

RIKIHISA, Y; EWING, S.A.; FOX, J.C.; SIREGAR, A.G.; PASARIBU, F.H.; MALOLE, M. B. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic Ehrlichia infection. **Journal Clinical Microbiology**. v.30, n.1, p 143-148. 1992.

RISTIC, M; HUXSSOL,L.D.; WEISIGER, R.M.; HILDEBRANT, P.K.; NINDO, M.B.A. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infection and Immunity**.v.6, n.1, p. 226-231. 1972.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L. Tribe II, Ehrlichieae (Philip, 1957). In: Holt, John G. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**: Gram-negative Bacteria of general, medical, or industrial importance. Baltimore: Williams e Wilkins, 4v., v. 1, cap. Sec. 9, p. 704-7091984.

ROCCO, L. C. M., **Guia prático para coleta e interpretação de exames em cães em gatos**. 1. ed. São Paulo, Interbook, p. 216, 2009.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., ALBORNOZ, R.E.F., BOLIO, G.M.E. *Ehrlichia canis* in dogs inYucantan, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors.**Veterinary Microbiology**. 2004.

SCHUTZE, G. E.; BUCKINGHAM, S. C.; MARSHALL, G. S.; WOODS, C. R.; JACKSON, M. A.; PATTERSON, L. E.; JACOBS, R. F. Human monocytic ehrlichiosis in children. **Pediatric Infectiuos Disease Journal**. v. 26, n. 6, p. 475-9. 2007

SERRA-FREIRE, N. M. & MELLO, R. P. **Entomologia & Acarologia na Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: L. F. livros, 2006.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 74-80, February 2001.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.;

HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n.1, p. 90-93, 2001.

STICH, R. W.; RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; NEEDHAM, G.R.; GROVER, D.L. Detection of *Ehrlichia canis* in Canine Carrier Blood and in Individual Experimentally Infected Ticks with a p30-Based PCR Assay. **Journal Clinical Microbiology**. v. 40, n.2, p. 540- 546. 2002.

STOCKHAM, S. L.; SCHMIDT, D. A.; CURTIS, K. S.; SCHAUF, B. G.; TYLER, J. W.; SIMPSON, S. T. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi*. **American Journal of Veterinary Research, Chicago: American Veterinary Medical Association**, v. 53, n.1, p. 63-68, Jan. 1992.

TAKAHIRA, R.H.; LOPES, R.S.; COSTA, C.L.; KOHAYAGAWA, A.; GONDIM, L.F.P.; SARTR, I. F.; LOURENÇO, M.L.G. Detecção de anticorpos contra *Ehrlichia platys* e *Ehrlichia canis* em cães. **Nosso Clínico**, v.32, p.34-38, 2003.

TIZARD, I. **Veterinary immunology: an introduction**. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 482, 2000.

TORRES, H. M. **Isolamento e propagação de *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de Imunofluorescência indireta**. Seropédica, 2002. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

THOMAS, L. D.; HONGO, I.; BLOCH, K. C.; TANG, Y. W.; DUMMER, S. Human ehrlichiosis in transplant recipients. **American Journal Transplant**. v. 7, n. 6, p. 1641-7. 2007.

WAGNER, E.R.; BREMERA W.G.; RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; NEEDHAM, G.R.; UNVER, A.; WANG, X.; STICH, R. W. **Development of a p28-based PCR assay for *Ehrlichia chaffeensis*. Molecular and Cellular Probes.** v.18, p. 111–116. 2004.

WALDEMARIN, K.C.A., MUNDIM, A. V., BASTOS, J. E. D. *et al.* Alterações Hematológicas em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados por *Ehrlichia spp.* **Veterinária Notícias**, v.9, p.23-29, 2003.

WATANABE, M., OKUDA, M., TSUJI, M., INOKUMA, H. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. **Veterinary Parasitology.** v.124, p.101-107, 2004.

WANER, T.; ROSNER, M.HARRUS, S.; NAVEH,A.; ZASS,R.; KEYSARY,A. Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 63,p.331-335,1996.

WANER, T., STRENGER, C., KEYSARY, A. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 3, p. 240-46, 2000.

WANER T, HARRUS S, BARK H, BOGIN E, AVIDAR Y, KEYSARY A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology.** v.69, p. 307-317, 1997.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam: **Elsevier Science B.V.**, v. 95, n. 1, p. 1-15, Feb. 2001.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 307-317, 1997.

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

WEN,B.;RIKIHISA,Y.;MOTT.J.M.;RUSSELL,G.;KIM,H.Y.;ZHI,N.;COUTO,G.C.;UNVER,A.;BARTSCH,R.Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with Doxyxycline. **Journal of Clinical Microbiology**. v.35, n.7, p. 1852-1855, 1997.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [S.l.]: WB Saunders Co., v. 21, n. 1, p. 75-98, Jan. 1991.

YABSLEY, M. J. *et al.* Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffi*, and *Rickettsia spp.* in dogs from Grenada. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2/4, p. 279-285, 2008.