

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS
PARASITADAS POR *Ehrlichia* spp., MÉTODOS
DIAGNÓSTICOS E HISTOPATOLOGIA EM
ÓRGÃOS DE CÃES COM ERLIQUIOSE DA
MICRO-REGIÃO DE UBERLÂNDIA-MG**

ELENIR ALVES MACEDO

Médica Veterinária

**Uberlândia - Minas Gerais - Brasil
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS
PARASITADAS POR *Ehrlichia* spp., MÉTODOS
DIAGNÓSTICOS E HISTOPATOLOGIA EM
ÓRGÃOS DE CÃES COM ERLIQUIOSE DA
MICRO-REGIÃO DE UBERLÂNDIA-MG**

Elenir Alves Macedo
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Coorientadora: Prof. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto
Coorientador: Prof. Ms. Antonio Vicente Mundim

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária - UFU, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA - MG
Setembro de 2007

*“É preciso jamais ter observado os animais para não
distinguir neles as diferentes vozes da necessidade,
do amor, da alegria, do temor, da cólera e de todos os seus afetos.
Seria muito estranho que exprimissem tão bem
o que não sentem...”*

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha mãe Esmelinda
e ao meu sobrinho, Fernando.*

AGRADECIMENTOS

Sobretudo, a minha mãe Esmelinda; a melhor pessoa do mundo.

Ao meu pai Severiano e aos meus irmãos.

Ao meu orientador, Prof. Marcelo Beletti, pela dedicação e agradável surpresa em poder ter conhecido a extraordinária pessoa que ele é.

Aos amigos Márcia, Fátima, Ivan, Léa, Raquel, Larissa e Carla, pelos bons dias que passamos juntos.

Aos professores Joãzinho, José Eugênio, aos técnicos dos laboratórios de histologia e de patologia clínica; Richard, Rui, Tiãozinho, Felipe e Renata Lima, pela colaboração e simpatia com que me receberam nesta instituição.

Aos professores Antônio Vicente Mundim e Mathias Szabó pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. José Octávio Jacomini.

Ao Prof. Rogério, diretor da Faculdade de Medicina Veterinária e aos secretários Marcos, Beth, Helena, Adélia e Célia pela atenção.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária de Uberlândia que, de alguma forma, me ajudaram a realizar o projeto.

À Unesp, campus de Araçatuba, minha casa, especialmente a Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Rui Luvizzotto pela colaboração e pela imensa alegria em poder tê-la como “conselheira”.

À FAPEMIG e CNPq pelo aporte financeiro.

Ao Instituto de Biociências da Unesp, campus de Botucatu, pela parceria durante o desenvolvimento do trabalho. Ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior e em especial ao Doutorando Thiago Batista pela grande atenção e gentileza dispensadas.

Aos colegas do curso de pós-graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
SUMARY.....	vii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
MATERIAL E MÉTODO.	41
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO	85
CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS.....	98

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DE CÉLULAS PARASITADAS
POR *Ehrlichia* spp., MÉTODOS DIAGNÓSTICOS E ALTERAÇÕES
HISTOPATOLÓGICAS EM ÓRGÃOS DE CÃES COM ERLIQUIOSE DE
UBERLÂNDIA-MG**

RESUMO - O objetivo do presente estudo foi analisar extensões de sangue periférico, sangue venoso e leuconcentração e “nested-PCR” como métodos diagnósticos para erliquiose canina. Objetivou-se também estudar as alterações histopatológicas de órgãos dos animais que viessem a óbito, as características ultraestruturais de *Ehrlichia* spp. e de *Anaplasma platys* e confirmar o diagnóstico citológico de *Babesia* spp. utilizando-se “seminest-PCR”. Para tal foram selecionados 56 cães com presença de mórulas e/ou granulações atípicas em leucócitos e/ou presença de mórulas em plaquetas de extensões de sangue periférico, sugestivas de infecção por *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma platys*, respectivamente. Dois cães que vieram a óbito foram utilizados para estudos histopatológicos e ultra-estruturais de órgãos e seis que apresentaram merozoítos em microscopia de luz foram utilizados para se confirmar o diagnóstico de *Babesia* spp. Concluímos que o uso da citologia para a detecção de inclusões intracitoplasmáticas de sangue periférico corada por Giemsa é um importante método diagnóstico em infecções causadas por *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp.; já para *Anaplasma platys* apresentou-se com baixa sensibilidade quando comparado a nPCR. Extensão de sangue periférico de margem de orelha externa corada por Giemsa mostrou-se a técnica citológica mais sensível quando comparada a outros tipos de extensões. “Nested PCR” foi o método menos subjetivo para o diagnóstico de EMC.

Palavras-chave: *Anaplasma platys*, diagnóstico, *Ehrlichia canis*, ultraestrutura, PCR, métodos citológicos.

**ULTRASTRUCTURAL CARACTERISTICS OF CELLS PARASITED BY
Ehrlichia spp., DIAGNOSIS METHODS AND HISTOPATHOLOGICAL
ALTERATIONS IN DOG ORGANS WITH EHRLICHIOSIS FROM
UBERLÂNDIA-MG**

SUMMARY - The objective of this study was the comparison of the diagnostic between peripheral blood smears, venous blood and leuconcentration, and “nested-PCR” as diagnosis methods for canine erlichiosis. Also was objective to study the histopathological alterations of organs from animals that died, as well as the ultrastructural characteristics of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma platys* and confirm the cytological diagnosis of *Babesia* spp. utilizing “seminest-PCR”. In order to do this, were selected 56 dogs with morule presence and/or atypical granulation in leucocytes and/or morule presence in platelets of peripheral blood smears, suggestive of infection by *Ehrlichia* spp. or *Anaplasma platys*, respectively. Two dogs that have died were utilized to histopathological and ultrastructural studies of organs. Six dogs that have presented merozoites in light microscopy were utilized to confirm the *Babesia* spp., diagnosis. We concluded that the use of cytology for detection of intracytoplasmatic inclusions of peripheral blood stained with Giemsa is a significant diagnosis method in infections caused by *Ehrlichia* spp. and *Babesia* spp.; but for *Anaplasma platys* it was less sensitive when compared with nPCR. Peripheral blood smears of external ear margin stained with Giemsa was found the more sensitive cytological technique when compared to other kind of extensions. “Nested PCR” was the less subjective method for CME diagnosis.

Key words: *Anaplasma platys*, diagnosis, *Ehrlichia canis*, ultraestructure, PCR, cytological methods.

I. INTRODUÇÃO

Devido à ampla distribuição geográfica do seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, erliquiose canina é uma das doenças infecciosas mais importantes de cães no Brasil (AGUIAR et al., 2007a).

Milken et al. (2004) descreveram que a população canina tem aumentado nos últimos anos e com ela a de carrapatos, trazendo maior ocorrência de doenças como babesiose e erliquiose, entre outras. A partir de então, vem crescendo a preocupação com os métodos de diagnóstico destas enfermidades.

O diagnóstico de doenças transmitidas por carrapatos requer uma combinação de achados clínicos e laboratoriais, visualização direta por microscopia ou imunodeteção dos organismos infecciosos no sangue ou tecidos infectados, cultura microbiana, testes sorológicos, imunoblotting e reação em cadeia da polimerase (PCR) (SHAW et al., 2001).

Para Andereg e Passos (1999), o sucesso do tratamento depende da precocidade do diagnóstico, realizado através de esfregaços sanguíneos, métodos sorológicos ou PCR, podendo variar de acordo com a fase da doença em que o animal se encontra. Ressaltaram ainda que o diagnóstico de erliquiose canina tem sido mais freqüente devido ao maior conhecimento sobre a doença, a expansão geográfica de sua ocorrência e a melhoria das técnicas utilizadas. Assim, testes mais sensíveis oferecem maior eficiência na pesquisa e na identificação de animais portadores.

A relação homem-animal vem se estreitando cada vez mais, portanto, com os movimentos sempre crescentes de preservação ambiental e contato com a natureza, espera-se que um número maior de indivíduos possa adquirir doenças erliquiais. Dessa forma, tornam-se necessárias pesquisas que busquem identificar esses agentes nos animais domésticos e silvestres e os transmissores artrópodes ou não dos mesmos. Os seres humanos se infectam com esses organismos e, portanto, o potencial zoonótico dessas infecções deve ser considerado. Os animais, sendo susceptíveis para muitos agentes das famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, podem servir como sentinela destas infecções ou, ainda, como reservatórios desses agentes (MACHADO, 2006).

Em função do exposto e sabendo-se que a erliquiose canina é a patologia mais freqüente no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (Hovet-UFU), objetivou-se analisar extensões de sangue periférico, sangue venoso e leuconcentração e “nested-PCR” como métodos diagnósticos para erliquiose canina. Objetivou-se também estudar as alterações histopatológicas de órgãos dos animais que viessem a óbito por esta doença, as características ultraestruturais de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* e confirmar o diagnóstico citológico de *Babesia* spp. utilizando-se “seminested-PCR”.

II. REVISÃO DA LITERATURA

II.1. POSIÇÃO TAXONÔMICA

As riquetsioses constituem um grupo de doenças causadas por bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias dos gêneros *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella* e *Ehrlichia*, família Rickettsiaceae e ordem Rickettsiales (CALIC, 2004), entretanto a taxonomia das riquetsias tem sofrido significativa reorganização na última década (PAROLA et al., 2005).

Morais et al. (2004) citaram que a classificação taxonômica inicial estava baseada no tipo de célula parasitada, na distribuição geográfica e na gravidade da doença e que o recente avanço nas tecnologias moleculares aumentou significativamente as possibilidades de condução de análises genéticas. Isso evidenciou claramente o adequado posicionamento filogenético de muitas espécies de bactérias fastidiosas das famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae na ordem Rickettsiales.

Inicialmente, para Rikihisa (1991) a tribo *Ehrlichieae* continha bactérias intracelulares obrigatórias com tropismo por leucócitos e compreendia três gêneros; *Ehrlichia*, *Cowdria* e *Neorickettsia*. Posteriormente, três grupos diferentes do gênero *Ehrlichia* (“genogrupos”) foram identificados com relação ao gene 16S rRNA, levando-se em consideração as primeiras espécies identificadas dentro de cada grupo, assim, formaram-se o genogrupo *Ehrlichia canis* (incluindo *E. canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ewingii* e *Cowdria ruminantium*), genogrupo *Ehrlichia phagocytophila* (incluindo *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, o agente da erliquiose humana

granulocítica (HGE), *Ehrlichia platys*, *Anaplasma marginale* e *Anaplasma ovis*) e o genogrupo *Ehrlichia sennetsu* (incluindo *Ehrlichia sennetsu*, *Ehrlichia risticii* e *Neorickettsia helminthoeca*) (DUMLER et al., 1995; POPOV et al., 1998).

Em 2001, Dumler et al. relataram que bactérias dos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* foram previamente classificadas na posição taxonômica baseadas em características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas e clínicas, todavia, recentes análises genéticas dos genes 16S rRNA, genes da proteína de choque térmico *groESL* e genes de proteínas de superfície têm indicado que as designações taxonômicas existentes apresentavam falhas. Todas as seqüências dos genes 16S rRNA e *groESL* depositadas no “GenBank”¹ antes de 2000 e seqüências selecionadas depois disso foram alinhadas e árvores filogenéticas foram construídas. Os autores propuseram então, que todos os membros da tribo *Ehrlichieae* e *Wolbachieae* fossem transferidos para a família Anaplasmataceae e que a estrutura da tribo da família Rickettsiaceae fosse eliminada. O gênero *Anaplasma* deveria abranger também *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente HGE, *Anaplasma (Ehrlichia) bovis* e *Anaplasma (Ehrlichia) platys*; o gênero *Ehrlichia* deveria incluir *Ehrlichia (Cowdria) ruminantium* e o gênero *Neorickettsia*, incluiria também *Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu* e *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*.

Estas alterações propostas por Dumler et al. (2001) foram homologadas e corrigidas em 2002². A espécie *Anaplasma phagocytophila* teve seu nome corrigido para *Anaplasma phagocytophilum* (combinação de *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e HGE). Na mesma lista de notificação, o corpo editorial observou que tanto a espécie *Anaplasma bovis*, quanto *Anaplasma platys*, que foram propostas como novas combinações, seriam novas espécies, pois seus respectivos basônimos *Ehrlichia bovis* e *Ehrlichia platys* não possuíam suporte na nomenclatura, sendo acrescentado o complemento sp. nov. (MACIEIRA, 2003). Dagnone (2006) relatou que em 2004, Uilenberg e colaboradores descreveram que frequentemente seqüências gênicas de pequenas porções do genoma são utilizadas para mudanças taxonômicas

¹ www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide

² LIST EDITOR: Notification list: Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 6, of the IJSEM. IJSEM, v. 52. p. 5-6, 2002

prematuras, negligenciando a taxonomia polifásica, a qual deveria também analisar características fenotípicas. Mencionaram também que deste modo, recentes modificações de membros da família Anaplasmataceae propostas por Dumler et al. (2001), deveriam ser analisadas com precaução, uma vez que algumas diversidades em outras seqüências poderiam não justificar tais reclassificações, devendo-se realizar uma abordagem cautelosa e balanceada para a taxonomia, levando-se em consideração informações genotípicas moleculares, a mais extensa possível, para diferentes genes, como também, para características fenotípicas.

II.2. ERLIQUIOSE: UMA ZOONOSE

Bactérias da família Anaplasmataceae foram por muito tempo consideradas importantes somente em Medicina Veterinária, entretanto, três espécies têm sido implicadas em doenças humanas nos anos recentes. O primeiro caso de Erliquiose Monocítica Humana (HME) foi descrita em 1987 nos Estados Unidos da América (EUA) e o agente equivocadamente diagnosticado como *E. canis*, causador da Erliquiose Monocítica Canina (EMC), ocorrendo somente mais tarde o isolamento do verdadeiro agente causador de HME, *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*) (PAROLA et al., 2005). Os mesmos autores mencionaram que em 1994, Erliquiose Granulocítica Humana também foi primeiramente descrita nos Estados Unidos, e o agente inicialmente designado como “agente HGE”. Atualmente a doença têm sido renomeada como Anaplasmoze Granulocítica Humana (*Anaplasma phagocitophilum*) e em 1999, *Ehrlichia ewingii*, o agente da Erliquiose granulocítica humana foi identificado.

O potencial zoonótico de *E. canis* tem sido analisado por vários pesquisadores (MACHADO, 2004). Perez et al. (1996) relataram o primeiro isolamento, caracterização antigênica e molecular de uma espécie de erliquia humana na América do Sul; a Erliquia Humana Venezuelana (VHE) isolada de ser humano neste país. Esses autores descreveram que com base na seqüência do gene 16S rRNA de VHE, este agente era proximamente relacionado a *E. canis* Oklahoma. Fundamentados nesta observação, sugeriram que VHE fosse uma nova cepa ou subespécie de *E. canis*, geradora

de infecção assintomática persistente em humanos. Posteriormente, Unver et al. (2001) comprovaram que *E. canis*, também isolada de ser humano na Venezuela eram idênticas às *E. canis* isoladas de cães e carrapatos da mesma região geográfica. Embasados no gene 16S rRNA, verificaram que essas erliquias apresentavam uma similaridade de 99% com *E. canis* Oklahoma e apresentaram também perfis antigênicos similares. Esta observação sugeriu que o cão poderia servir como reservatório de *E. canis* e que *R. sanguineus*, que ocasionalmente pica pessoas naquela região, poderia atuar como vetor dessas bactérias para seres humanos (KORDICK et al., 1999). E ainda, Aguiar et al. (2007b) citaram que na Venezuela, há um relato recente de pelo menos seis casos clínicos de erliquiose humana causada por *E. canis*, indicando que este agente pode causar infecções zoonóticas.

Entretanto, Labruna e Pereira (2001) esclareceram que os cães são os únicos hospedeiros de importância primária para a manutenção das populações de *R. sanguineus* no ambiente. Assim, a presença deste carrapato em um ambiente deve sempre estar associada à presença de cães e, embora alguns poucos trabalhos de outros países tenham relatado infestações humanas por este carrapato, tais relatos não apresentam importância epidemiológica.

Labruna et al. (2007) realizando uma investigação preliminar de espécies de erliquias em carrapatos, humanos, cães e capivaras em dois estados do Brasil (Rondônia e São Paulo), utilizando reação em cadeia da polimerase em tempo real ("PCR Real Time"), encontraram DNA exclusivamente de *E. canis* em quatro de cinco cães analisados, representando o primeiro relato dessa espécie de bactéria infectando esses animais na região Amazônica. Segundo Labruna et al. (2007) e Aguiar et al. (2007b) nenhuma espécie de *Ehrlichia*, a não ser *E. canis*, tem sido relatada no Brasil, mostrando a necessidade de estudos adicionais compreendendo outras áreas geográficas para elucidar melhor a presença de agentes erliquiais no país. Entretanto, Angerami et al. (2006) recentemente confirmaram a ocorrência dos primeiros quatro casos de Erliquiose humana (gênero *Ehrlichia*) por "nested-PCR" (nPCR) em São Paulo. Além disso, *E. chaffeensis* foi detectada em amostras de sangue de cervídeos (*Blastocerus dichotomus*) capturados na região

limítrofe dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul utilizando a PCR e nPCR (MACHADO et al., 2006).

II.3. MECANISMOS DE EVASÃO IMUNE DAS ERLIQUIAS

De acordo com Rikihisa (2003) tem sido descobertas estratégias únicas empregadas por membros da família Anaplasmataceae para parasitar com sucesso os leucócitos de mamíferos. Eles oferecem um fascinante exemplo de como patógenos usam mecanismos para usurpar, apoderar, e subverter as funções da célula hospedeira.

Quando bactérias da família Anaplasmataceae interagem com as células hospedeiras, sinais são ativados, tanto dentro da célula hospedeira, como dentro delas. Estes sinais desarmam o sistema de alarme, como também os mecanismos microbicidas dos leucócitos dando condição da célula hospedeira aceitar estes “invasores” para compartilhar seu interior e sua fonte de nutrientes. Sinais ativados intra-bactérias permitem que elas regulem finamente seu metabolismo e fisiologia no novo ambiente celular. Somente então sua permanência temporária não causará transtorno à fisiologia da célula invadida, até que elas tenham se multiplicado suficientemente (RIKIHISA, 2003).

A entrada de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., e *Neorickettsia* spp. em fagócitos hospedeiros independe de microfilamentos, mas depende da atividade de transglutaminase, a qual é requerida pela endocitose mediada por receptor. O aumento no cálcio livre citosólico da célula hospedeira é essencial para *E. chaffeensis* e *Neorickettsia risticii* introduzirem-se em monócitos, e a inibição da elevação deste cálcio, previne a entrada das bactérias. Os vacúolos contendo estas bactérias não se fundem com lisossomos, mecanismo que é inibido pelo tratamento com oxitetraciclina. Quando estes agentes se estabelecem com sucesso em vacúolos únicos para sua sobrevivência, eles proliferam dentro deste compartimento em competição com a célula hospedeira, sendo que ferro é um dos nutrientes críticos para estes grupos de microorganismos. Estes patógenos não conseguem estabelecer infecção quando monócitos são tratados com um quelador de cálcio (deferroxamine), administrado antes de um estágio precoce de infecção. Embora muitas bactérias sobrevivam dentro de macrófagos, a maioria delas é morta por

atividades desses leucócitos e *E. chaffeensis* também é destruída em monócitos humanos pelo tratamento com interferon gama (IFN- γ), desde que ele seja administrado em um estágio precoce da infecção, uma vez que essa terapia reduz o ferro intracelular disponível. *E. chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) possuem a capacidade gênica de expressão de membranas externas principais diferentes, mecanismo que permite esses organismos se adaptarem em ambientes distintos, como carrapatos e mamíferos, o que ainda está sob investigação (RIKIHISA, 2003).

Mavromatis et al. (2006) analisando o genoma de *E. canis*, descreveram três glicoproteínas de membrana imunorreativas principais (gp 36, gp 140 e gp 200) que estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro, adesão das erliquias com a célula hospedeira e apresentam importante papel na sua patogênese. Relataram também a identificação de dois genes presentes em *E. canis* (VirB e VirD), onde proteínas Vir desempenham importante função na interação parasito-célula hospedeira, e que elas estariam associadas com a secreção protéica e inibição da inclusão bacteriana em direção aos lisossomos.

Foi demonstrado que *in vitro* ocorre uma diminuição da expressão de receptores do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II (MHC classe II), o que sugere um mecanismo para sobrevivência, persistência e evasão de *E. canis* do sistema imune. A consequência da diminuição dos receptores MHC classe II poderia levar a um prejuízo da sinalização envolvendo a ativação de proteína cinase tirosina, fosfatidilinositídeos, proteína cinase C, fosfolipase A₂ e síntese de óxido nítrico. Estas vias de sinalização afetam a apresentação de antígenos, adesão celular, produção de citocinas, reação humoral e atividade anti-riquetsial (HARRUS et al., 2003 apud FENG, WALKER, 1993; HAUSCHILDT et al., 1993; SHU-YI et al., 2001; LEVEILLE et al., 2002).

A. phagocytophilum parasita neutrófilos como célula hospedeira, o mais poderoso gerador de anion superóxido (O⁻²). A extraordinária habilidade de *A. phagocytophilum* para prevenir a geração de O⁻² pelos neutrófilos é a chave para sua sobrevivência (inibição de NADPH oxidase preexistente). Interessantemente, *E. chaffeensis* bloqueia a geração de O⁻² por monócitos humanos, mas não por neutrófilos. De modo semelhante, sinais são induzidos por *A. phagocytophilum* que prorrogam o tempo reduzido de vida do neutrófilo

humano por atrasar uns poucos dias a apoptose espontânea. Ainda, o tratamento com proteinase K abole esse efeito inibidor, indicando que um componente protéico de *A. phagocytophilum* é requerido para esta atividade (RIKIHISA, 2003).

Monócitos/macrófagos e neutrófilos expressam receptores padrões, como receptores Toll-like (TLRs) e domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NOD) contendo proteínas. Tais receptores podem reconhecer e se ligar em padrões moleculares conservados associados à patógenos (PAMPs), incluindo lipopolissacarídeos (LPS) ou peptideoglicanas. Essas ligações evocam profunda resposta imune inata do hospedeiro a partir destas células, as quais eliminam os microorganismos invasores. Hemócitos de carrapatos também têm um poderoso mecanismo de defesa inato responsivo aos PAMPs. Exclusivamente *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis* tem perdido todos os genes requeridos para a biossíntese de LPS, e a maior parte dos genes requeridos para a biossíntese de peptideoglicanas. Esta perda deve ter facilitado à adaptação de erliquias em leucócitos e células do carrapato vetor. *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis* têm adquirido outra característica única que é a habilidade para absorver colesterol a partir da célula hospedeira. A presença de colesterol na membrana provavelmente compensa a redução na estabilidade de membrana causada pela perda de LPS e peptideoglicanas. A perda de suprimento de peptideoglicanas tem benefícios adicionais, tais como a flexibilidade para acomodar erliquias em um espaço intravacuolar limitado, o qual pode promover compatibilidade aumentada entre leucócitos e hospedeiros invertebrados (RIKIHISA, 2006).

II.4. ULTRAESTRUTURA DE *Ehrlichia* spp.

Em microscopia eletrônica de transmissão (TEM), a mórula de *E. canis* aparece limitada por uma membrana vacuolar simples. Ela contém de 2 a 40 corpos elementares redondos ou ovóides (células erliquiais) com uma membrana dupla. Os corpos em forma de halteres são os corpos elementares em divisão (DAVOUST, 1993).

Popov et al. (1998) evidenciaram em TEM que o grupo *E. canis-E. chaffeensis* formava grandes mórulas com muitas erliquias, frequentemente suspensas na matriz fibrilar. A mitocôndria da célula hospedeira e o retículo endoplasmático usualmente estavam em contato com a membrana da mórula e agregados próximos a ela. Keysary et al. (1996) e Popov et al. (1998) descreveram duas formas de mórulas de *E. canis* em cultura de células DH82: aquelas que continham erliquias reticuladas e aquelas que apresentavam-se preenchidas pelas erliquias densamente compactadas. Ambas as formas constituíam-se por dupla membrana, sendo a membrana interna lisa e a externa ondulada. Células reticuladas foram observadas no processo de divisão binária. Tanto erliquias reticuladas como densamente compactadas apresentavam matriz fibrilar entre as células erliquiais. O protoplasto de células reticuladas estava preenchido com ribossomas e redes de fibrilas de DNA, formando um nucleóide reticulado.

Uma diferenciação ultraestrutural dos genogrupos do gênero *Ehrlichia* foi realizada também por Popov et al. (1998) avaliando as linhagens Oklahoma e o Isolado Venezuelano Humano (VHE) de *E. canis*, constatando-se que no genogrupo de *E. canis* foi observada a ocorrência de grandes mórulas com muitas erliquias densamente compactadas. No entanto, na infecção natural por *E. muris* e *E. equi* não encontraram células densamente compactadas e sugeriram quatro possíveis explicações para este achado: (A) erliquias densamente compactadas não existiriam em infecção aguda animal ou humana; (B) elas seriam formadas raramente e a pequena quantidade de mórulas examinadas, comparada ao modelo em cultura de células, não permitiu sua detecção; (C) elas se formariam quando a carga parasitária de erliquia fosse alta, como por exemplo, em infecção experimental em cultura celular e esta situação ocorreria somente tardiamente em infecções naturais;

(D) alguns fatores específicos ou sinais da célula hospedeira causariam sua formação.

Para Walker (2006a) erliquias são pequenas bactérias gram negativas obrigatoriamente intracelulares, com estrutura de parede celular única desprovida de lipopolissacarídeos e peptidoglicanas e aparência dimórfica refletindo o ciclo de desenvolvimento. Desse modo, erliquias densamente compactadas são formas infecciosas, mas não se replicam já as formas reticuladas se replicam, mas não são infecciosas.

Harvey et al. (1978) utilizando TEM confirmaram que inclusões plaquetárias visualizadas dentro de vacúolos revestidos por membranas (mórulas) eram riquetsias e o nome *Ehrlichia platys* (*E. platys*) foi sugerido. TEM pode ser usada para o estudo das características dessas bactérias e para determinar se os microorganismos observados no esfregaço de sangue periférico são verdadeiramente *E. platys* (MATHEW et al., 1997). Arraga-Alvarado et al. (2003) desenvolveram uma análise ultraestrutural de infecção experimental e natural de *E. platys* em cães de Maracaibo, Venezuela, enfatizando o processo de divisão binária e as diferenças morfológicas entre organismos erliquiais em diferentes fases de desenvolvimento, identificadas dentro da mesma plaqueta.

Rikihisa (1991) estudando a cultura da cepa Oklahoma de *E. canis* em células DH82 observou que algumas mórulas continham mais de 100 organismos por vacúolo. Keysary et al. (1996) afirmaram que seus achados em TEM de células DH82 infectadas com a cepa Israeli de *E. canis* foram similares aos descritos por Rikihisa (1991), entretanto na ultraestrutura do isolado Israeli, ambas as formas de mórulas também foram encontradas (densamente e levemente compactadas), mas a sua mórula era ainda mais compactada que a cepa Oklahoma. No trabalho de Arraga-Alvarado et al. (2003) que estudaram animais imunossuprimidos inoculados com *A. platys*, o número de organismos variou de um a quinze por vacúolo da célula hospedeira, e eles não se apresentavam compactados como em cultura.

Analisando-se a variação de *E. chaffeensis* em cultura, Popov et al. (1995) relataram que, além da observação de mórulas com corpos elementares normais, foi identificada uma mórula que continha erliquias em degeneração, indicando que além de crescimento e reprodução normais, esses organismos

também exibem eventos patológicos. Para esses autores, as erliquias podem notavelmente sofrer danos dentro do vacúolo parasitóforo, presumidamente fagolisossomos.

Perez et al. (1996) relataram que a Erliquia Humana Venezuelana (VHE) isolada de um homem na Venezuela, apresentava ultraestrutura morfollogicamente compatível com o genogrupo *E. canis*, com múltiplos organismos arredondados, em inclusões citoplasmáticas limitadas por membrana. A matriz da inclusão era preenchida com substância filamentosa.

II.5. ERLQUIOSE CANINA

II.5.1. HISTÓRICO

A erliquiose canina é também denominada Pancitopenia Tropical Canina, Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina, Doença do Cão Rastreador, Febre Hemorrágica Canina e Tifo Canino (COUTO, 1998). A primeira espécie, *Rickettsia canis* (*R. canis*) foi descrita na Argélia, em monócitos de cães infestados pelo carrapato *R. sanguineus*. Os animais apresentavam febre, anemia e vinham rapidamente a óbito (DONATIEN, LESTOQUARD, 1935). Todavia, foi reclassificada como *E. canis*, em 1945, por Mashkovsky (MACHADO, 2004).

Neitz e Thomas (1938) descreveram uma epidemia de *R. canis* no Parque Nacional Kruger, África, onde os esfregaços dos órgãos dos cães selvagens (*Lycaon pictus*) acometidos mostraram a presença de uma riquetsia correspondendo à descrição de *R. canis*, feita por Donatien e Lestoquard em 1935. Posteriormente, erliquiose foi reconhecida como responsável pela mortalidade da severa epizootia ocorrida em cães das Forças Armadas Norte Americana participantes da guerra do Vietnã. Na ocasião, aproximadamente 300 cães desenvolveram uma enfermidade hemorrágica fatal, chamada Pancitopenia Tropical Canina, caracterizada por debilidade, epistaxes, anemia e leucopenia (COUTO, 1998; MACHADO, 2004).

Examinando-se esfregaços sanguíneos de cães com sinais clínicos de erliquiose em Belo Horizonte, Minas Gerais, corados com May-Grünwald-Giemsa, Costa et al. (1973) encontraram inclusões citoplasmáticas em linfócitos, indistinguíveis de *E. canis*. Segundo esses autores, este foi o primeiro achado de Rickettsiales na América Latina, embora a ocorrência de *E.*

canis tinha sido descrita nas Antilhas Holandesas em 1957 e nos Estados Unidos em várias ocasiões depois de 1963. Atualmente, a infecção por *E. canis* apresenta distribuição mundial, particularmente em regiões tropicais e subtropicais (IQBAL, RIKIHISA, 1994b).

II.5.2. ERLIQUIOSE CANINA EM UBERLÂNDIA

A erliquiose é uma doença relativamente comum nos cães do município de Uberlândia, Minas Gerais (WALDEMARIN et al., 2003). Avaliando-se esfregaços sanguíneos, Santos et al. (2004a) verificaram a frequência de hemoparasitoses em cães desta cidade. Dentre as amostras positivas (372 de 2.373 hemogramas), *Ehrlichia* spp. foi observada em 336 esfregaços (90, 32%), *Babesia* spp. em 8 animais (2,15%) e *Hepatozoon* spp. em 3 (0,8%) e a associação entre *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp. em 24 animais (6,45%) e *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* spp. em 1 animal (0,28%).

Em uma outra investigação sobre a prevalência da erliquiose canina nessa mesma cidade, realizada em 60 cães capturados foi pesquisada mórulas ou inclusões intracitoplasmáticas em esfregaços de sangue periférico, corados por Giemsa. Os resultados demonstraram positividade de 50% (*Ehrlichia* spp. isoladamente ou associada a outros hemoparasitas, como *Hepatozoon* spp. e *Babesia* spp.), constatando que 100% dos animais possuíam ectoparasitas; 45 (75%) possuíam *R. sanguineus* e 15 (25%) *Amblyomma cajennense*. A prevalência da doença quanto ao sexo e à raça não foi significativa, mas com relação à idade, a positividade dependeu significativamente da faixa etária, e predominou nos animais acima de cinco anos (RIBEIRO et al., 2003).

Casos de erliquiose canina vêm aumentando nos últimos anos como foi relatado por Legatzki e Jorge (2002) e Moreira et al. (2003). Moraes et al. (2004) citaram que aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias dos estados do Paraná, Bahia, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Ceará, Alagoas, Pernambuco, Mato Grosso do sul e Distrito Federal apresentaram anticorpos anti-*E. canis*.

Devido à escassez de dados específicos na literatura brasileira sobre variações hematológicas na erliquiose canina, Waldemarin et al. (2003) analisaram o hemograma de 281 cães naturalmente infectados por *Ehrlichia*

spp. atendidos Hovet-UFU com diagnóstico confirmado pela identificação de inclusões citoplasmáticas (mórulas em leucócitos). As alterações observadas com maior frequência foram anemia em 70,46% dos cães, sendo predominantemente do tipo normocítica normocrômica; leucopenia em 32,74%; desvio nuclear de neutrófilos para a esquerda em 75,44%; eosinopenia em 59,44%; monocitopenia em 47,69%; linfopenia em 32,03% e panleucopenia em 17,44% dos animais. Os autores concluíram que anemia, desvio nuclear de neutrófilos para a esquerda, eosinopenia, monocitopenia e linfopenia, foram os achados hematológicos mais frequentes.

Igualmente Mendonça et al. (2005) realizaram uma avaliação em 109 hemogramas de cães portadores de mórulas em leucócitos em extensões de sangue coletados de capilares marginais de pavilhão auricular, verificando anemia (77,98%), leucopenia (24,77%) e linfopenia (22,02%). Esses autores relataram que anemia normocítica normocrômica e arregenerativa foi a de maior frequência. Ressaltaram ainda que 3,67% dos animais apresentaram infecção concomitante com *Babesia* spp.

Em um estudo retrospectivo de cães com erliquiose/babesiose e babesiose isoladamente, atendidos no Hovet-UFU no período de 2001 a 2003, Barbosa et al. (2006) concluíram que a maioria dos cães tinha idade inferior a ano, viviam em residências, seguidos daqueles que viviam em ruas e fazendas. Concluíram não haver diferenças de incidência com relação a sexo e nem ao período do ano. A presença e/ou histórico de *R. sanguineus* correspondeu a 60% dos animais analisados e os principais sinais clínicos da associação das doenças foram hipertermia, apatia, desidratação, palidez de mucosas, vômitos, anorexia, diarreia e aumento de sensibilidade renal à palpação.

II.5. 3. ERLIQUIOSE CANINA: AGENTES ETIOLÓGICOS

Durante muito tempo *Ehrlichia* spp. foi considerada espécie específica, entretanto recentemente esse conceito foi mudado, uma vez que o agente têm sido identificado em hospedeiros não específicos (ANDEREG, PASSOS, 1999).

Para Macieira (2003) as seguintes espécies do gênero *Ehrlichia* já foram descritas causando infecções naturais em cães: *E. canis* (DONATIEN e LESTOSQUARD, 1935); *E. platys* (HARVEY et al., 1978); *E. risticii* (KAOMA et

al., 1994); *E. ewingii* (ANDERSON et al., 1992 a., STOCKHAM et al., 1992); *E. chaffeensis* (DAWSON et al., 1992; BREITSCHWERDT et al., 1998); *E. phagocytophila* (JOHANSSON et al., 1995; PUSTERLA et al., 1997); *E. equi* (LEWIS et al., 1975; MADEWELL et al., 1982) e HGE (GREIG et al., 1996), porém *E. canis* é o agente que normalmente afeta cães e o que causa o quadro clínico mais severo (ANDEREG, PASSOS, 1999; BEECHING et al., 2000).

II.6. *Ehrlichia canis*: CICLO BIOLÓGICO

II.6.1. EM CÃES

O ciclo de desenvolvimento de *E. canis* em monócitos caninos tem três estágios que podem ser observados microscopicamente. No primeiro os corpos elementares adentram nos monócitos por fagocitose (NYNDO et al., 1971; DAVOUST, 1993; RISTIC, HOLAND, 1993). Segundo Nyndo et al. (1971) a fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, permitindo aos corpos elementares crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo, onde a multiplicação ocorre por divisão binária. Conforme Davoust (1993) a primeira fase do ciclo é caracterizada pela penetração no monócito do corpo elementar, que se multiplica até atingir um tamanho de 0,2 a 0,6 μm , fase que dura dois dias, já para Ristic e Holand (1993) o primeiro estágio é representado por corpos elementares um pouco menores, com 0,2 a 0,4 μm de diâmetro.

Em um segundo estágio, do terceiro ao quinto dia pós infecção um pequeno número de corpos elementares em agrupamentos de 1 a 2 μm de diâmetro, denominados corpúsculos iniciais são observados como inclusões pleomórficas (RISTIC, HOLAND, 1993). Para Davoust (1993) o corpo inicial é um amontoado de corpos elementares acoplados com tamanho que varia de 0,4 a 2 μm , todavia Ristic e Holand (1993) descreveram que os corpos iniciais são pouco maiores (0,5 a 4 μm de diâmetro).

E finalmente, no terceiro estágio, entre o sétimo e o décimo segundo dia subsequente, ocorrem crescimento adicional e multiplicações e os corpos iniciais dão vida à mórula; uma aglomeração de corpos elementares, que na microscopia óptica têm aspecto de “amora” que tipifica o gênero (NYNDO et al., 1971). Segundo Ristic e Holand (1993) as mórulas são corpos de inclusão

maiores inalteráveis (4 a 6 μm de diâmetro). Muitas mórulas podem coexistir em um monócito e cada mórula contém vários corpos elementares. Depois de 3 ou 4 dias, as mórulas são separadas do citoplasma pelos vacúolos e os corpos elementares são liberados pela ruptura do monócito (Figura 1), ou então são liberadas por exocitose e o ciclo infeccioso é repetido (NYNDO et al., 1971; DAVOUST, 1993).

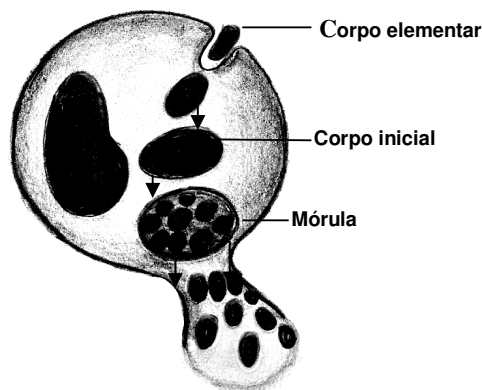


Figura 1: Ciclo de desenvolvimento de *Ehrlichia canis* dentro de monócito. Compilado de Davoust (1993).

II.6.2. EM CARRAPATOS

Os carrapatos se contaminam ao ingerir leucócitos infectados. Isto geralmente ocorre na segunda ou terceira semana de infecção do cão, pois nesta fase existe maior porcentagem de leucócitos infectados. No *R. sanguíneos* a *E. canis* multiplica-se nos hemócitos e na glândula salivar, ocorrendo transmissão transtestadial no carrapato trioxeno. Quando o carrapato pica outro cão, um fluxo de células mononucleares na direção da zona inflamatória favorece a disseminação da bactéria. Ao longo das mudas de carapaça sucessivas, *E. canis* subsiste uma vez que o intestino médio é conservado, por outro lado, a transmissão transovariana não existe e passagem da infecção de um cão para outro é diretamente atribuída ao vetor (DAVOUST, 1993; ANDEREG, PASSOS, 1999; LEGATZKI, JORGE, 2002; DAVOUST et al., 2003). Segundo Swango et al. (1992), os microorganismos podem persistir nos carrapatos por mais de cinco meses. Semelhantemente,

Rikihisa (1991) relatou que o carrapato adulto pode transmitir *E. canis* no máximo por 155 dias após ter sido infectado.

II.6.3. TRANSMISSÃO DE *Ehrlichia canis*

O *R. sanguineus* é o vetor da erliquiose canina (NEITZ, THOMAS, 1938; DAVOUST, 1993; LABRUNA, PEREIRA, 2001). É um carrapato que tem hábitos nidículas; termo de origem latina que significa: nidi (nidus = ninho); cola (cola = que habita), portanto, vive no ninho, toca ou abrigo de seu hospedeiro e quando não estão em parasitismo, encontram-se sob as formas de vida livre, neste caso, no ambiente onde vive o cão (LABRUNA, PEREIRA, 2001; LABRUNA, 2004a). Nenhuma outra espécie de erliquia é conhecida como infectante do cosmopolita carrapato *R. sanguineus* (AGUIAR et al., 2007a), entretanto Machado (2006) relata que uma única espécie de carrapato pode servir como transmissor de mais de um tipo de agente infeccioso, por exemplo, *R. sanguineus* é capaz de transmitir não somente *E. canis* e *E. ewingii*, mas também *Babesia canis* ssp. e *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*), e talvez *A. platys* no Brasil. No entanto, embora assumido que o vetor de *A. platys* seja *R. sanguineus*, o seu modo de transmissão natural é incerto (SHAW et al., 2001). No entanto, as seqüências quase inteiras do gene 16S rRNA (1.364 pb) e do operon *groESL* (1.646 pb) de *E. platys* isolado de um cão foram determinadas, revelando que ambas as seqüências estão estreitamente relacionadas às seqüências de *A. platys* detectadas em carrapatos *R. sanguineus* na República Democrática do Congo (HUANG et al., 2005).

Szabó et al. (2005) compararam a biologia, a morfologia e o DNA mitocondrial de duas populações distintas de *R. sanguineus*, originárias da América do Sul (Brasil e Argentina) e foram encontradas diferenças biológicas, morfológicas e genéticas acentuadas entre elas. No entanto, quando correlacionou-se o *R. sanguineus* Brasileiro, com o *R. turanicus* Africano (Zimbábue), a proximidade genética e morfológica foi extremamente relacionada. Sugeriram então, que o status biosistemático de *R. sanguineus* da América do Sul deveria ser reavaliado, pois isto levanta a hipótese de existir mais de uma espécie com o nome de *R. sanguineus* nas Américas, o que de acordo com Labruna (2004a) explicaria em parte, diferentes graus de antropofilia deste carrapato nestes continentes.

Aguiar et al. (2007a) estudando a prevalência de carrapatos infectados em quatro populações distintas concluíram pela baixa taxa de infecção mínima (MIR) (<7%) que não é em todo repasto sanguíneo que *R. sanguineus* se infecta em cães contaminados com *E. canis*. Foi também demonstrado que quando cães foram infectados experimentalmente com *E. canis* e depois infectados com *R. sanguineus* durante a fase aguda da doença a proporção de cães que adquiriram com êxito a infecção variou de 50 até 70% (BREMER et al., 2005). Aguiar et al. (2007a) consideraram que esse inesperado valor de prevalência de infecção de *Ehrlichia* spp. na população de vetores está possivelmente ligada ao fato dos hospedeiros vertebrados poderem ser uma fonte conveniente de infecção para os carrapatos principalmente durante a fase aguda da infecção ou durante um recrudescimento de uma fase crônica, quando a carga erliquial tende a ser maior, evento já demonstrado em infecções experimentais.

Em qualquer estágio de vida, o carrapato pode contaminar-se e também transmitir o agente, entretanto Aguiar et al. (2007a) citaram que tentativas de transmitir *E. canis* com carrapatos adultos que se alimentaram quando ninfas em cães nas fases subclínica e crônica da erliquiose foram fracassadas.

Johnson et al. (1998) descreveram transmissão experimental de *E. canis* por *Dermacentor variabilis*, relatando que esta foi a primeira demonstração onde outra espécie de carrapato foi apta na transmissão transestadial deste importante patógeno. Foi também demonstrado que *Amblyomma americanum* e *Otobius megnini* são vetores em potencial (ANDEREG, PASSOS, 1999).

Um estudo realizado por Costa Jr. et al. (2007) de soroprevalência de erliquiose canina em três áreas rurais distintas onde carrapatos *Amblyomma* são encontrados mais frequentemente que *R. sanguineus*. Os animais apresentaram 65,6%, 37,8% e 24,7% de positividade para anticorpos anti- *E. canis* pela IFI. Cães machos, com mais de cinco anos de idade, infestados com carrapatos e SRD (Sem Raça Definida) apresentaram taxas altas de positividade. Esses resultados apontam à importância da erliquiose canina em áreas rurais brasileiras e indicam a necessidade de estudos futuros na transmissão natural e manutenção da doença.

Um modelo hipotético de imunopatogênese de doenças transmitidas por carrapatos em cães não imunes, por uma suposta coinfeção entre erliquiose e

babesiose foi proposto por Shaw et al. (2001). Proteínas salivares dos carrapatos são capazes de destruir, desorganizar o sistema imune associado com a pele do cão, de uma imunidade protetora normal T helper 1 (Th1) para uma resposta T helper (Th2), a qual permite o estabelecimento de infecção sistêmica. Esta resposta imunoprotetora não efetiva é dominada pela produção de anticorpos que podem ser significantes mediadores dos sintomas da doença crônica, via efeitos vasculares de hipergamaglobulinemia, formação de auto-anticorpos ou anticorpos que reagem cruzadamente com os próprios tecidos, e ainda pela formação de imunocomplexos que se depositam em delgados capilares e iniciam uma destruição tecidual.

Estes efeitos supressores diretos da saliva de *Ixodes ricinus* e *Dermacentor andersoni* do sistema imune do hospedeiro tem sido relatados, incluindo a inibição da resposta de células T para concanavalina A. Proteínas ligantes de imunoglobulinas e com alta afinidade pela histamina têm sido isoladas da saliva de várias espécies de carrapatos; ambas reduzem a rejeição aos carrapatos e facilitam a transmissão de doença (SHAW et al., 2001). Existe forte evidência de que haja um desvio pela infestação por *R. sanguineus* para um perfil de citocinas protetoras normais Th1 associada com resistência a doenças causadas por carrapatos para um aberrante perfil de citocinas Th2 (SHAW et al., 2001 apud FERREIRA, SILVA, 1999).

Outra forma de transmissão da doença é a transfusão sanguínea de um animal infectado para um susceptível, podendo ocorrer a partir de cães cronicamente infectados há mais de cinco anos (SWANGO et al., 1992).

II.6. 4. INFECÇÕES DE *Ehrlichia canis* COM OUTROS HEMOPARASITOS

Diversos hemoparasitos podem ser encontrados simultaneamente no mesmo hospedeiro. Um fator determinante para tal é que muitos desses parasitos compartilham o mesmo carrapato vetor, no caso da *E. canis*, o *R. sanguineus*, também transmite *Babesia* spp., *Hepatozoon canis* (*H. canis*) e outras espécies do gênero *Ehrlichia* (SHAW et al., 2001).

Anaplasma platys foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1978, por Harvey e colaboradores. Essa espécie causa uma doença de baixa patogenia multiplicando-se em plaquetas e causando uma trombocitopenia cíclica infecciosa (MACHADO, 2006). A infecção aguda por *A. platys* caracteriza-se pela parasitemia cíclica das plaquetas seguida de trombocitopenia e linfadenopatia generalizada. Após esse período as plaquetas tendem a retornar a valores normais em três a quatro dias. Estas fases acontecem em intervalos de uma a duas semanas (ALMOSNY, 2002).

A prevalência de anticorpos IgG para *Hepatozoon canis* (*H. canis*) e a presença de gamontes no sangue e tecidos hemolinfáticos foram estudados pela primeira vez por Mylonakis et al. (2005), na Grécia, em cães com EMC. Ambos os patógenos são transmitidos pelo carrapato *R. sanguineus*. Este estudo indicou que a prevalência de anticorpos para *H. canis* era alta entre cães com EMC na área onde ambas as infecções eram endêmicas. Entretanto, exposições anteriores a *H. canis* não foram encontradas como um importante contribuidor para as anormalidades clínicas ou clínico patológicas encontradas em cães com EMC (MYLONAKIS et al., 2005).

Em cães, coinfeção com combinações de espécies de *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp. e riquetsias ocorrem em áreas endêmicas. O papel de tais coinfeções está sendo esclarecido pela PCR. Coinfeção poderia parcialmente explicar variações na apresentação clínica, patogenicidade e resposta à terapia (SHAW et al., 2001). Geralmente, parasitismos por *Babesia canis*, *Hepatozoon* spp. e *Bartonella vinsonii*, podem ocorrer concomitantemente com a erliquiose canina. Infecções mistas determinarão sintomas mais severos nos animais acometidos (ANDEREG, PASSOS, 1999). Em uma pesquisa desenvolvida por Moreira et al. (2003), verificou-se que 10% dos animais estudados e positivos para *E. canis* apresentavam concomitantemente infecção por outros hemoparasitas,

como *Haemobartonella canis* e *B. canis*. Santos et al. (2004b) divulgaram o parasitismo simultâneo por *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Haemabartonella canis*, no mesmo cão em Uberlândia, Minas Gerais.

A literatura brasileira descreve que foram encontrados exemplares das espécies *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma brasiliensis*, naturalmente infectados pela *R. rickettsii*, retirados de cães do meio rural. Embora estudos futuros devam esclarecer tais fatos, deve-se considerar a possibilidade de que os cães do meio rural, constantemente expostos aos carrapatos do gênero *Amblyomma*, e muitas vezes atendidos em clínicas veterinárias com um provável quadro de erliquiose, possam estar apresentando na verdade, o quadro clínico de febre maculosa (PEREIRA, LABRUNA, 1998). Existe apenas um registro de *R. rickettsii*, geneticamente identificada, no sangue de um cão da localidade de Valência/Rio de Janeiro, região com ocorrência de óbito por febre maculosa brasileira (SOUZA et al., 2005).

II.6.5. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS DE ERLQUIOSE MONOCÍTICA CANINA

A patogenia da erliquiose monocítica canina ainda permanece desconhecida, mas disfunções imunológicas têm sido sugeridas como o mecanismo para as alterações patológicas e sinais clínicos. O envolvimento de células do sistema imune na erliquiose canina está presente especialmente em linfonodos e baço e, uma vasculite imunomediada pode desempenhar um papel central na patogênese da EMC, podendo explicar a maioria das importantes lesões observadas nos órgãos e tecidos de cães infectados. A severidade das lesões em animais infectados com uma intensa atividade imune sugere mecanismos imunomediados na gênese das lesões (CASTRO et al., 2004).

A erliquiose é caracterizada por três fases, que são a aguda, a subaguda e a crônica (ANDEREG, PASSOS, 1999). A fase aguda é variável quanto à duração (2 a 4 semanas) e à severidade (suave a severa) (SWANGO et al., 1992). CASTRO et al. (2004) estudando as alterações imunopatológicas e clinicopatológicas em infecção experimental aguda descreveram que os sinais clínicos iniciaram-se entre 10 e 14 dias após a inoculação experimental.

O microorganismo multiplica-se nas células mononucleares, principalmente do sistema fagocítico mononuclear nos linfonodos, baço e medula óssea. Isto resulta em hiperplasia dessa linhagem celular e organomegalia (linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia). A trombocitopenia decorrente da destruição periférica de plaquetas, acompanhada ou não por anemia e leucopenia (ou leucocitose) é comum durante esta fase (SWANGO et al., 1992; CASTRO et al., 2004). Para Breitschwerdt (1998a) as contagens leucocitárias são variáveis, ocorrendo leucocitose e anemia, possivelmente relacionada à supressão da produção de eritrócitos e a destruição acelerada destas células, que ocorre progressivamente durante esta fase. As células infectadas são transportadas via corrente sanguínea para outros tecidos do organismo, especialmente pulmões, rins e meninges. Essas células infectadas aderem ao endotélio vascular, induzindo vasculite e infecção de tecido sub-endotelial (MACIEIRA, 2003 apud BREITSCHERDT, 1998; BREITSCHERDT, 2000).

Andereg e Passos (1999) relataram que os sinais clínicos mais freqüentes na fase aguda são apatia, anorexia, depressão, febre, perda de peso, cianose, estertores pulmonares, equimoses e vômitos. Para esses autores, todas essas alterações levam a um aumento dos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, proteína c-reativa (CRP) e de alfa-1-ácido glicoproteínas (AAG). Febre e alguns sinais e sintomas clínicos observados em EMC experimental podem ser causados por aumento na produção de interleucina 1 (IL-1) por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B, ou produtos pirógenos exógenos do parasita (CASTRO et al., 2004). CRP e AAG são proteínas sintetizadas pelo fígado devido a danos teciduais causados por infecção, inflamação ou trauma. Medidas quantitativas dessas duas proteínas têm sido usadas para detectar condições inflamatórias nesta fase e para monitorar o progresso da resposta a um tratamento antibacteriano (RIKIHISA et al., 1994).

Segundo Castro et al. (2004) a necropsia de animais experimentalmente infectados, na fase aguda revelou membranas mucosas pálidas, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, edema e ascite. Microscopicamente, as principais lesões foram: hiperplasia linforeticular nas áreas corticais de linfonodos, e polpa branca esplênica, acúmulo periportal de células mononucleares e degeneração gordurosa centro lobular do fígado. Os

rins apresentaram-se com glomerulonefrite caracterizada por infiltração de mononucleares intersticiais. Títulos de anticorpos para antígenos de *E. canis* foram demonstrados em todos os cães inoculados aos 30 dias de pós infecção. Imunofenotipagem de linfócitos de linfonodos e seções esplênicas apresentaram alterações em populações celulares de IgG, IgM, CD3+ e CD8+ dos cães infectados.

A fase subclínica instala-se quando o cão sobrevive à fase aguda. Esta fase está associada com a persistência da *E. canis* no hospedeiro e alto nível de anticorpos no soro, sugerindo uma constante estimulação do sistema imune por antígenos. Esta fase dura aproximadamente seis a nove semanas, progredindo para a fase crônica (ANDEREG, PASSOS, 1999). Couto (1998) relatou que na fase subclínica os pacientes ficam assintomáticos. Observam-se em alguns casos complicações como depressão, agravamento da perda de peso, mucosas pálidas, hemorragias, infecções secundárias e edema nos membros. Alterações neurológicas como ataxia, disfunção motora, hiperestesia localizada e tremores são provavelmente causados por infiltração celular ou devido a hemorragias nas meninges ou no parênquima cerebral e na medula espinhal. Waner et al. (1997) citaram como alterações hematológicas na fase subclínica de cães experimentalmente infectados, trombocitopenia, leucopenia e neutropenia.

Os sinais da fase crônica podem ser perda de peso, pirexia, sangramento espontâneo, palidez de mucosas, linfadenopatia generalizada, hepatomegalia e esplenomegalia, edema intermitente dos membros e sinais neurológicos causados por meningoencefalomielite (COUTO, 1998). A erliquiose crônica ocorre em cães que não conseguem construir uma efetiva resposta imune ao microorganismo. Os sintomas clínicos nesta fase são reflexos das alterações fisiopatológicas resultantes da grave anemia, e da infiltração perivascular de muitos sistemas orgânicos com células linforreticulares e plasmócitos (SWANGO, 1992). Para Waner et al. (1997) a principal característica da fase crônica é a hipoplasia de medula óssea resultando em anemia aplásica, e também em monocitose, linfocitose e leucopenia.

Harrus et al. (1998b) sugeriram que o baço desempenha um importante papel na patogênese da EMC e propuseram então, que a esplenite

linfoplasmocítica induzida por *E. canis* poderia levar a uma produção e/ou elaboração de um fator esplênico, que suprimiria a hematopoiese. A ausência deste fator em cães esplenectomizados talvez explicasse a redução nos parâmetros eritrocitários vistos em cães intactos, postulando os autores que tal fator poderia desempenhar um importante papel na supressão da medula óssea que ocorre durante a fase crônica da infecção por EMC.

A hiperglobulinemia em cães naturalmente infectados com *E. canis*, deve-se principalmente ao aumento dos níveis de gamaglobulinas, porém nos quadros de pancitopenia a concentração de gamaglobulinas é menor, provavelmente em consequência da leucopenia pronunciada. A hipoalbuminemia pode ser resultante da anorexia, que leva a diminuição da ingestão de proteínas, e também pode ser um mecanismo compensatório devido ao aumento das globulinas, prevenindo assim o aumento da viscosidade do sangue (HARRUS et al., 1996).

Várias alterações oculares são descritas como consequência de EMC, podendo-se citar: uveíte, glaucoma secundário, descarga ocular, congestão episcleral, injeção ciliar, edema corneano, precipitados ceráticos, flare, hifema, edema de íris, *Rubeosis iridis*, pigmentação de íris, destacamento de retina, vasos retiniais tortuosos, hemorragia, heperreflexia retinal (ORIÁ et al., 2004; LEIVA et al., 2005). Harrus et al. (1998a) documentaram um caso clínico de cegueira aguda bilateral associada com gamopatia monoclonal em um cão acometido com EMC.

Pancier et al. (2001) realizaram exames histológicos dos globos oculares e cérebros de 27 cães experimentalmente infectados tanto com *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* ou HGE. O infiltrado inflamatório foi predominantemente linfocítico, monocítico e plasmocítico; granulócitos foram notavelmente poucos. Inflamação ocular foi mais comum e mais intensa no corpo ciliar, tornando-se menos intensa na coróide, íris, e retina respectivamente. A meningite incluiu um infiltrado predominantemente monocítico. Lesões oculares e das meninges estavam presentes em todos os cães infectados com *E. canis*, entretanto nenhuma lesão ocular ou cerebral foi observada associada a qualquer outra infecção erliquial.

Harrus et al. (2001a) pesquisaram a presença de imunocomplexos e anticorpo antinuclear (ANA) no soro de cães natural e experimentalmente

infectados por *E. canis*. Concluíram que, em contraste a outros anticorpos (antiplaquetários e antieritrocitários) induzidos durante a infecção por *E. canis* e relacionados com a patogênese da EMC, o aparecimento de ANA é mais indicativo de autoimunidade idiopática primária e menos associado com autoimunidade secundária a doenças infecciosas como EMC.

Mcbride et al. (2003) estudando a cinética de resposta de anticorpos a proteínas imunoreativas de *E. canis* (p28, gp140 e gp200), verificaram uma resposta tipo Th1 nas fases aguda e convalescente da doença, resultando anticorpos IgG2, semelhante à Harrus et al. (2001b) que evidenciaram resposta superior da subclasse IgG2 em infecções naturais e experimentais com *E. canis*. Mencionaram ainda a hipótese de que as subclasses IgG representassem marcadores para a dicotomia Th1/Th2 da resposta imune em cães, como mostrado em humanos e camundongos, a presença de maiores níveis de IgG2-*E. canis* pudesse ser uma indicação de níveis significantes de citocinas derivadas de Th1. No entanto, a associação entre as subclasses de IgG e respostas Th1/Th2 em cães não tem sido relatada, e tem ainda que ser completamente determinada.

Hess et al. (2006) descreveram que *E. canis* não causa imunossupressão em cães experimentalmente infectados. Eles relataram que o estado de portador em alguns cães com estas bactérias é devido às defesas não efetivas do hospedeiro. O subsequente desenvolvimento de doenças imunomediadas ou infecções oportunistas em erliquiose crônica sugere desregulação da imunidade, entretanto, a imunobiologia desta infecção não tem sido bem caracterizada. Baseados em seus dados experimentais, esses autores sugerem que a resposta imune não é inteiramente enfraquecida em cães jovens durante os primeiros meses subsequentes à infecção experimental por *E. canis*.

Com exceção de poucos trabalhos, relataram Hess et al. (2006), não tem sido possível confiantemente induzir severa EMC com isolados clínicos ou isolados cultivados por desafio intravenoso. Por isso eles questionaram se a transmissão por carrapatos constituiu uma parte necessária da susceptibilidade, por exemplo, fatores imunossupressores locais, derivados dos carrapatos, dose do inóculo, penetração epidermal, ou inoculações repetidas (devido aos múltiplos carrapatos), são capazes de afetar criticamente a

resposta do hospedeiro. Contudo, Hess et al. (2006) apud Lewiss et al. (1977); Mathew et al. (1996); Kordick et al. (1999) em estudos experimentais com *E. canis*, usando carrapatos como vetores têm revelado sinais clínicos e curso da doença similar àqueles produzidos por inoculação intravenosa. Hess et al. (2006) suspeitaram que outros fatores além da virulência dos organismos provavelmente contribuam para o desenvolvimento de EMC crônica devido à pequena porcentagem de cães que são presentes com doença clínica em áreas com prevalência para *E. canis*. Esses fatores podem ser idiossincrasias hereditárias ou raças susceptíveis. Fatores adquiridos do hospedeiro podem também predispor para erliquiose monocítica crônica, como endoparasitismo concorrente, que pode ser necessário para inclinar a resposta imune em direção ao fenótipo Th2, resultando em supressão de imunidade celular mediada e resposta humoral exagerada. Harrus (1999) descreveu que a diversidade antigênica pode ser uma das razões para a variedade nas manifestações clínicas da EMC em diferentes regiões geográficas.

Castro et al. (2004) descreveram como achados hematológicos em erliquiose canina experimental por *E. canis* significantes diminuição em células vermelhas, hemoglobina e hematócrito. A concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) apresentou significante aumento na terceira e quarta semanas após inoculação. Leucopenia, eosinopenia, neutrofilia, linfopenia, trombocitopenia, e diminuição de proteína plasmática total (TPP) ocorreram no mesmo período. Elias (1991) encontrou como características hematológicas trombocitopenia (<50.000 células/ μ l), hematócrito baixo (8-22%), leucopenia (800 a 4000 células/ μ l). Pancitopenia foi encontrada como sinal característico de erliquiose crônica, além disso, anemia arregenerativa foi usualmente evidente (ELIAS, 1991). Em Uberlândia, Minas Gerais, Kanayama et al. (2002) verificaram que as alterações no hemograma com maior frequência foram anemia arregenerativa, desvio para a esquerda e eosinopenia. Na bioquímica clínica observou-se hipoalbuminemia, hipoproteinemia e aumento dos níveis de fosfatase alcalina sérica. Na mesma cidade, as principais alterações da associação de babesiose e erliquiose em cães descritas por Barbosa et al. (2006) foram anemia do tipo normocítica normocrômica, leucopenia, neutropenia com desvio para a esquerda e eosinopenia.

II.7. DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE CANINA

II.7.1. DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO DE ERLIQUIOSE CANINA

O diagnóstico de erliquiose canina pode ser feito pela identificação da presença de corpúsculos de inclusão ou mórulas de *E. canis*. Este método é apropriado para clínicas veterinárias, as quais não têm laboratórios sofisticados a sua disposição (ELIAS, 1991).

Já em 1938, Neitz e Thomaz relataram que "*Rickettsia canis*", hoje *E. canis*, parasitam monócitos e neutrófilos e que quando corados com Giemsa aparecem como uma coleção ou colônia de grânulos cocóides corados em púrpura e a célula parasitada pode conter de 1-12 colônias variando de 2-10 µm em tamanho, sendo que os grânulos individuais variam de 0,5-1,5 µm e é relativamente difícil demonstrá-los em esfregaços sanguíneos, mas moderadamente fácil encontrá-los em células de esfregaços de órgãos. Depois da coloração com May-Grünwald-Giemsa, as inclusões aparecem vermelhas, lilás ou azul escuro, conforme o estado de desenvolvimento da bactéria (DAVOUST, 1993).

Para Neitz e Thomaz (1938), o aparecimento dos parasitos em esfregaços sanguíneos tem sido observado 3 a 5 dias depois do primeiro aumento de temperatura corporal e para a confecção dos esfregaços sanguíneos é importante que eles sejam realizados utilizando-se a primeira gota de sangue que exsuda de um ponto de punção ou incisão em orelha externa, pois nesta primeira gota muitos leucócitos estarão presentes em comparação com as posteriores. Castro et al. (2004) observaram na fase aguda da doença, a presença de mórulas intracitoplasmáticas de *E. canis* em monócitos de esfregaços sanguíneos no 12º dia após inoculação. De acordo com Bounous et al. (1992), na fase aguda da doença as mórulas dificilmente são detectadas dentro do citoplasma de monócitos ou linfócitos em esfregaços de sangue periférico, corados pelo Wright ou Giemsa, em esfregaços de papa de leucócitos ou aspirados de medula óssea. A identificação do microorganismo na citologia por aspiração com agulha fina de baço, linfonodos ou dos pulmões é possível, mas rara (COUTO, 1998). Elias (1991) realizando o diagnóstico de erliquiose por microscopia óptica demonstrou que quando a contagem de leucócitos é muito baixa impedindo a realização do exame, como

em alguns casos de panleucopenia, esfregaços de capa leucocitária podem ser utilizados como alternativa.

Ao analisar os esfregaços de 250 animais em Israel com diagnóstico presuntivo de erliquiose, corpos de inclusão intracitoplasmáticos ou mórulas foram observados em 220 animais (88%) por Elias (1991). Estas estruturas eram arredondadas e vistas em somente 4 a 6% dos leucócitos, ocorrendo mais frequentemente em linfócitos (maior que 90% dos casos) e em apenas poucos monócitos. Os corpos de inclusão visíveis no citoplasma de leucócitos eram grânulos pequenos e esféricos, medindo aproximadamente 0,2 a 0,4 μm em diâmetro ou corpos ovais ou esféricos, de aproximadamente 1,2 a 1,5 μm de diâmetro ou em manchas irregulares em padrão circular. Mórulas ovais, esféricas ou grandes de 2,5 a 3 μm de diâmetro foram observadas em somente 9 (4%) de 220 casos com corpos de inclusão. Nenhuma tendência quanto à idade, peso ou sexo foi observado. Raça, entretanto, parece ter um importante papel na predisposição da doença, pois de 250 animais estudados, 167 animais eram German Shepherd Dogs.

Moreira et al. (2006) realizando um estudo com o objetivo de avaliar as alterações específicas na medula óssea e observar a presença de erliquias neste órgão, puncionaram a medula de animais infectados, detectando-se um relativo aumento na série mielóide e diminuição na eritróide, além da presença de mórulas de *E. canis* no citoplasma de monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos de 75% dos animais examinados, durante a fase aguda da doença. De forma semelhante detecção de células infectadas em aspirados de medula óssea de cães experimentalmente infectados com uma amostra brasileira de *E. canis* foi descrita por Moreira et al. (2005) encontrando-se poucas células infectadas com *E. canis* em esfregaços sanguíneos, entretanto várias formas de desenvolvimento de *E. canis* foram visualizadas em aspirados de medula óssea 15 dias após a infecção.

Mylonakis et al. (2003) compararam a sensibilidade do diagnóstico entre as técnicas de citologia (coloração por Giemsa) de papa de leucócitos, sangue periférico, linfonodos, medula óssea e cultivo celular de curta duração para a detecção de mórulas de *E. canis* em infecção aguda. A maior sensibilidade foi alcançada depois da avaliação de 1000 campos em óleo de imersão de

esfregações de medula óssea e em segundo lugar em esfregaços de linfonodos. As mórulas foram mais freqüentemente detectadas em linfócitos do que em monócitos. O maior número do total de mórulas foi encontrado em esfregaços de cultura.

É importante distinguir *E. canis* de outros protozoários e estruturas em esfregaços sanguíneos como *Leishmania donovani*, *Hepatozoon canis*, babesias fagocitadas, aglomerados de plaquetas sanguíneas, depósitos de corantes e artefatos superpostos nos leucócitos (NEITZ, THOMAZ, 1938).

Embora em áreas endêmicas, a visualização direta (usando microscópio de luz) de *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* spp. seja preciosa, a tendência da doença crônica ou subclínica estar associada com uma infecção oculta reduz sua sensibilidade e não permite diferenciação intraespécies. Entretanto, o uso de métodos diretos de imunoistoquímica e imunocitoquímica pode aumentar a sensibilidade (SHAW et al., 2001).

II.7.2. REISOLAMENTO E CULTIVO DE *Ehrlichia canis*

Ristic e Holand (1993) citaram que devido a *E. canis* ser extremamente hospedeiro-específica, estudos precoces focaram-se na doença, na sua transmissão e tratamento, com pouca informação sobre as características biológicas dos organismos. Cultivo de bactérias transmitidas por carrapatos é geralmente difícil por estes organismos serem fastidiosos e requererem sistemas de co-cultura em células eucarióticas (SHAW et al., 2001). O isolamento e cultivo de *E. canis* em células mononucleares do sangue e de tecidos são citados na literatura. Segundo Andereg e Passos (1999) essa técnica é muito demorada, cara e exige equipamento adequado. Para o isolamento geralmente utiliza-se *E. canis* obtida a partir de um cão naturalmente infectado (propagada por infecção experimental em outros cães) com posterior separação de mononucleares destes animais e inoculação em células macrofágicas de linhagem estabelecida de origem canina, denominadas DH82 (TORRES et al., 2002). Keysary et al. (1996) e Aguirre et al. (2004) descreveram o primeiro isolamento, propagação *in vitro* e caracterização molecular de *E. canis* no Israel e Espanha, respectivamente, a partir de infecções naturais em linhagem celular DH82.

Iqbal et al. (1994) concluíram que o reisolamento de *E. canis* provou ser o método mais sensível para um diagnóstico definitivo e precoce da doença, porém ele não é um método muito conveniente, pois leva um longo tempo (14 até 34 dias) para mostrar-se positivo. Da mesma maneira, McBride et al. (2001) discutiram que o isolamento de *E. canis* consome muito tempo e somente poucos laboratórios têm conseguido consistente sucesso com este método, ademais, testes adicionais para caracterizar o agente são requeridos para definir uma etiologia específica. No entanto, Mutani e Kaminjolo (2001) descreveram uma técnica de cultura celular que pode ser utilizada na detecção de erliquias. Os leucócitos do sangue periférico de diferentes animais foram isolados do sangue total e mantidos em meio de Dulbecco, contendo soro homólogo sem antibióticos e após 72 horas, um exame microscópico destas células confirmou que a maioria dos animais estava infectada com a riquetsia. Entretanto a observação de esfregaços de sangue dos mesmos animais revelou que apenas dois eram positivos para estas bactérias. Os resultados desta pesquisa indicaram que a cultura de leucócitos é superior ao método tradicional de esfregaço de sangue na detecção de erliquias, e que portadores assintomáticos são facilmente detectados, além do método ser de baixo custo e não exigir linhagens de células específicas.

II.7.3. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE ERLIQUIOSE CANINA

O isolamento e o desenvolvimento de métodos de cultivo *in vitro* de *E. canis* levaram ao uso do teste sorológico de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção e titulação de anticorpos *E. canis* em cães. O teste sorológico IFI descrito por Ristic e colaboradores em 1972 tem sido o teste sorológico “Gold Standard”, indicando exposição à riquetsia *E. canis* (WANER et al., 2001).

O diagnóstico de erliquiose pode ser feito sorologicamente empregando-se a técnica de IFI. O anticorpo anti-*E. canis* pode ser detectado entre duas a três semanas após a infecção, elevando-se em níveis máximos por volta dos três meses após o contágio (SWANGO et al., 1992). Os métodos sorológicos para diagnósticos de *E. canis* e *E. platys* (*A. platys*) são comumente utilizados, mas carecem de especificidade, pois apresentam reatividade cruzada entre as diferentes espécies de *Ehrlichia* spp. (MACHADO, 2006). Animais soroconvertidos para antígenos de *E. canis* podem estar infectados com *E.*

ewingii, *E. chaffeensis* ou *E. canis*. A infecção por qualquer uma dessas três espécies pode causar doenças graves, que podem ser indistinguíveis clínica, hematológica e sorologicamente uma das outras (BREITSCHWERDT et al., 1998b)

Testes sorológicos são os mais comumente usados na metodologia diagnóstica, e IFI e ELISA são os mais amplamente empregados. Entretanto, tais testes são limitados por reduzirem a habilidade de identificar infecção aguda, dificuldade em diferenciar infecção presente de exposição prévia ou títulos vacinais, e reação cruzada entre espécies (SHAW et al., 2001).

Recentemente, Aguiar et al. (2007b) relataram a manutenção contínua do isolado Jaboticabal de *E. canis* em células DH82 e, conseqüentemente, sua utilização na produção de antígenos para o diagnóstico complementar da erliquiose canina brasileira.

O uso do teste IFI para o diagnóstico de EMC é um importante auxílio na confirmação da exposição a *E. canis* quando técnicas mais sofisticadas como Western blotting, PCR e cultura de tecidos não estão prontamente disponíveis. Ele pode ser usado em combinação com uma história completa e exame físico do cão. Entretanto, os veterinários deverão estar atentos para suas armadilhas, as quais podem confundir o diagnóstico. O processo da doença, reatividade cruzada com outras espécies de erliquias, múltiplas infecções transmitidas por carrapatos e títulos persistentes de anticorpos pós tratamento deverão ser considerados quando se interpretam resultados sorológicos para *E. canis*. Seguindo este pensamento, o uso de outros métodos, especialmente técnicas moleculares, poderá ser usado para identificar o patógeno específico (WANER et al., 2001).

II.7.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO-ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY) DE ERLIQUIOSE CANINA

O ensaio imunoenzimático (ELISA) como método diagnóstico de erliquiose, “Dot-ELISA”, foi citado por Andereg e Passos (1999) como uma técnica sensível para a detecção de anticorpos anti-*E. canis* no soro e que dispensa o emprego de equipamentos caros. Kits comerciais para o diagnóstico da erliquiose canina baseados no princípio do “Dot-ELISA” são testes que tem a capacidade de determinar anticorpos IgG específicos para o

parasito, podem ser realizados na clínica, são práticos, de baixo custo e provavelmente tornar-se-ão os exames de rotina para o diagnóstico de erliquiose (MORAIS et al., 2004). Harrus et al. (2001b) desenvolveram um ELISA para a detecção de anticorpos anti-*E. canis*, salientando que a leitura rápida e objetiva do método por eles desenvolvido apresentou uma vantagem sobre a interpretação visual e frequentemente subjetiva de IFI.

Bélanger et al. (2002) determinaram o valor de quatro testes sorológicos para o diagnóstico de EMC, comparando-os com o “Método ouro” IFI. A especificidade do Dip-S-Ticks (PamBio InDx, Inc., Baltimore, Md.) foi significativamente menor que todos os outros testes avaliados. A sensibilidade de Dip-S-Ticks foi significativamente maior que Snap-3Dx (IDEXX Laboratories, Inc.) ou Snap Canine Combo (IDEXX Laboratories, Inc.). A sensibilidade de ELISA rMAP2, assim como descrito por Alleman et al. (2001) foi significativamente maior que Snap Canine Combo. Os níveis de acurácia de ELISA rMAP2, Snap-3Dx, Dip-S-Ticks e Snap Canine Combo foram 97,0, 89,8, 85,1 e 82,9%, respectivamente.

II.7.5. WESTERN IMMUNOBLOTTING (WI) DE ERLIQUIOSE CANINA

Outra opção para se estabelecer o diagnóstico é WI, que tem a grande vantagem da objetividade da leitura, pois não sofre influência da subjetividade do operador, como ocorre com a IFI. Entretanto é uma técnica cara, que consome muito tempo para sua execução e necessita de uma tecnologia mais avançada (ANDEREG, PASSOS, 1999). Shaw et al. (2001) descreveram que WI tem sido usado para caracterizar e diferenciar diferentes espécies envolvidas.

II.7.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE ERLIQUIOSE CANINA

PCR é um método que amplifica uma sequência alvo de nucleotídeos e tem sido amplamente usada para o diagnóstico de doenças infecciosas (CHANG et al., 1996; FARAH, 2000). Shaw et al. (2001) mencionaram que PCR vem se tornando cada vez mais viável para todas as infecções transmitidas por carrapatos já descritas e sua sensibilidade à torna

particularmente apropriada para o diagnóstico deste grupo de infecções, embora não distinga entre infecção aguda e estado de portador.

Segundo McBride et al. (1996) a PCR para a detecção específica de *E. canis* têm demonstrado ser mais sensível que isolamento por cultura. No entanto, Iqbal et al. (1994) descreveram que a sensibilidade da PCR é similar ou levemente menor que de outros métodos estabelecidos, porém sua conveniência, rapidez e natureza direta de detecção de DNA de *E. canis* fazem a PCR mais útil para o diagnóstico clínico. Relataram que a PCR, especialmente em combinação com IFI, fornece o mais aceitável e rápido diagnóstico para erliquiose canina.

Em um estudo, Martin et al. (2005) compararam dois ensaios de PCR para diagnóstico de *A. platys* em sangue de cão usando-se “primers” baseados no gene 16S rRNA. O primeiro utilizou um protocolo padrão de PCR (amplificação direta), usando-se um “primer” específico para o gênero *Ehrlichia* e sequenciamento genético. O segundo ensaio nPCR, envolveu um “primer” universal bacteriano que amplificou a maioria do gene 16S rRNA, seguido da amplificação “nested”, usando-se um “primer” específico para *A. platys*. O protocolo “nested” demonstrou uma maior sensibilidade. As análises das seqüências confirmaram uma maior especificidade (MARTIN et al., 2005). Testes de sensibilidade mostraram que a PCR em duas etapas (“nested”) é dez vezes mais sensível que a direta e foi capaz de detectar tão pouco DNA como cinco inclusões erliquiais em uma amostra sanguínea. Já PCR única amplifica moldes de DNA de amostras contendo pelo menos 50 plaquetas infectadas. A aplicação desta técnica é útil em detectar *A. platys* em fases precoces da infecção (cinco dias pós-infecção) ou em estágios crônicos da doença, como também em diagnósticos diferenciais de trombocitopenias em cães (CHANG et al., 1996). De tal modo, Harrus et al. (1998 c) ao realizarem uma investigação sobre a amplificação de DNA erliquial de cães 34 meses depois da infecção por *E. canis*, concluíram que nPCR de DNA extraído de aspirados esplênicos é um método seguro pra determinar o estado de portador de EMC.

Nagaghi et al. (2004) compararam a PCR baseada no gene *dsb* e a nPCR no diagnóstico da erliquiose canina. A nPCR consiste de duas amplificações, sendo que a primeira amplifica o gênero *Ehrlichia*, enquanto a segunda amplifica apenas a espécie; já a PCR baseada no gene *dsb* de

Ehrlichia spp. codifica as proteínas das pontes de dissulfeto erliquiais em apenas uma amplificação. Concluiu-se que apesar de apenas a nPCR ser capaz de realizar a diferenciação entre as espécies de erliquias, sem a necessidade do sequenciamento, a PCR e a nPCR podem ser utilizadas do diagnóstico direto da erliquiose. Nagaghi et al. (2006) relataram que a nPCR é o método mais sensível no diagnóstico da erliquiose canina, entretanto a PCR com base no gene *p-28* pode também ser útil, considerando-se a vantagem de ser uma técnica mais rápida e econômica por consistir de apenas uma reação de amplificação.

Wen et al. (1997) comparando nPCR e IFI para diagnóstico de *E. canis* em cães tratados com doxiciclina, concluíram que nPCR é altamente sensível e específica para a detecção de *E. canis* e pode ser mais útil em avaliações de eliminação dos organismos depois da antibióticoterapia que IFI, especialmente em áreas nas quais *E. canis* é endêmica. Mylonakis et al. (2003) realizaram duas nPCR em aspirados de medula óssea, como um dos métodos diagnósticos para *E. canis* em 69 animais suspeitos de EMC. Os autores também usaram os testes IFI, ELISA, esfregaços de capa leucocitária, linfonodos, medula óssea, “imprint” de pulmão e sangue corados por Giemsa. Todos os animais foram positivos para anticorpos anti- *E. canis* pela técnica de IFI enquanto a amplificação do DNA erliquial foi obtida em 91,3% dos animais e mórulas de *E. canis* foram observadas em 58% dos vários exames citológicos utilizados no presente estudo. ELISA mostrou que 65,2% dos animais apresentaram anticorpos anti-*E. canis* (MYLONAKIS et al., 2003).

García-Pérez et al. (1999) ao desenvolverem uma PCR específica para o diagnóstico de *E. phagocytophila* (*A. phagocytophilum*) em ovelhas relataram que embora a “nested” possa aumentar a sensibilidade do diagnóstico em algumas situações, ela também acarreta um risco substancial de contaminação pela necessidade de se abrir os tubos contendo produtos amplificados antes da segunda amplificação o que foi corroborado por Walker (2006b) ao mencionar que a nPCR está sujeita a falsos positivos devido à contaminação pelos “amplicons”.

Com o objetivo de implementar uma rotina diagnóstica de alta especificidade e sensibilidade, Brito et al. (2004) compararam a técnica de eletroforese capilar por *microchips* à técnica de eletroforese em gel de agarose

na análise de produtos de PCR (nPCR) para *E. canis*. Concluíram que a utilização da tecnologia *Lab-on-a-chip* mostrou-se uma alternativa mais condizente com as boas práticas em biossegurança, eliminando a contaminação por brometo de etídio além de propiciar a diminuição dos custos de extração de DNA, PCR e análises dos “*amplicons*”, pois utiliza 1 µL da amostra na análise, além da alta sensibilidade.

Também na tentativa de aumentar a sensibilidade da PCR, os produtos de uma destas reações foram submetidos a uma hibridização quimiluminescente (CH) por McBride et al. (1996). Os resultados comprovaram que esta associação de técnicas teve maior sensibilidade que o cultivo *in vitro*, sendo que sensibilidade da PCR deste protocolo foi de 300 pg com gel corado com brometo de etídeo, o equivalente a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ organismos *E. canis*, enquanto a CH aumentou a sensibilidade para 30 fg, o equivalente a aproximadamente 150 organismos erliquiais e concluíram que a técnica PCR/CH é realizável, rápida e sensível para a detecção de *E. canis* de amostras sanguíneas.

Sirigireddy e Ganta (2005) descreveram um teste molecular multiplex (Multiplex PCR) que é capaz de detectar infecções simples ou coinfeções com até cinco espécies de erliquias ou anaplasmas. O protocolo do teste incluiu a purificação baseada na captura magnética do 16S RNA ribossomal, seu enriquecimento, e detecção de patógenos específicos pela reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa por tempo real (RT-PCR Real Time). O teste foi avaliado pelo exame de amostras sanguíneas de cães suspeitos de erliquiose. Relataram que o cão foi o modelo escolhido, por ser susceptível a adquirir infecções com até cinco patógenos do gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma*. O teste identificou infecções simples no hospedeiro canino com *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum* e *A. platys* e coinfeção entre *E. canis* e *A. platys*.

Doyle et al. (2005) relataram o desenvolvimento do primeiro ensaio por PCR em tempo real multicolor (Multicolor Real-Time PCR) capaz de detecção e discriminação de espécies de erliquias de importância médica em uma única reação, por amplificação do gene *dsb*. Descreveram que a sensibilidade analítica do ensaio é comparável ao ensaio molecular mais sensível já relatado, esta PCR é capaz de distinguir “amplicons” de *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E.*

canis e ainda detectar coinfeções dentro da mesma amostra e este eficiente ensaio poderá proporcionar novas habilidades no diagnóstico e tratamento de pacientes humanos e animais de companhia infectados, assim como poderá ser usado em estudos epidemiológicos.

Marsilio et al. (2006) desenvolveram um ensaio PCR que teve como alvo o gene citrato sintase (glTA) e asseguraram que a alta conservação da seqüência analisada revelada por análises moleculares confirmou a utilidade desse gene para a detecção de *E. canis*.

Durante a fase crônica de EMC a sensibilidade da PCR em amostras de sangue pode diminuir devido à baixa presença do agente (AGUIRRE et al., 2004) e aspirados de baço não são superiores às amostras sanguíneas para a detecção precoce de DNA erliquial por PCR (HARRUS et al., 2004). Entretanto, quando o animal é tratado (doxiciclina, 10 mg/kg, sid, 60 dias consecutivos), DNA erliquial pode ser detectado no baço depois da sua eliminação no sangue, indicando que aspirados de baço são superiores na avaliação da resposta a terapia. Este fato poderia ser explicado por uma persistência maior dos organismos vivos em macrófagos esplênicos do que em monócitos sanguíneos ou porque o DNA de erliquias degradadas esteja dentro dos macrófagos esplênicos (HARRUS et al., 2004).

Para o uso de PCR em animais necropsiados geralmente o sangue e linfonodos são os únicos tecidos positivos 72 horas “post mortem”. Isto provavelmente ocorra devido à melhor preservação de DNA erliquial ou a uma maior prevalência deste patógeno nestes dois tecidos (GAL et al., 2007).

Morais et al. (2004) sugeriram que sempre que um cão assintomático for testado e apresentar anticorpos, é necessário diferenciar o cão que teve apenas contato com o agente e tem anticorpos persistentes, de cães com erliquiose. Concordaram que, como a PCR não está disponível para a maioria dos médicos veterinários, recomenda-se que o clínico tente documentar a presença do agente em esfregaço de sangue periférico, ou a presença de alterações hematológicas compatíveis com erliquiose.

II.8. BABESIOSE CANINA

Parasitas do gênero *Babesia* (Starcovicki, 1893) foram primeiramente reconhecidos por Babés em 1888. Nesta época o pesquisador procurava determinar a causa de uma doença grave, que estava acometendo bovinos na Romênia. O autor chegou à conclusão que o agente etiológico que estava provocando a enfermidade naquela região, era um pequeno organismo cocóide, intraeritrocítico, chamado por ele de *Haematococcus bovis*. Em 1893, Starcovicki reavaliou o parasito, denominando-o de *Babesia bovis*, em homenagem a Babés (ALMOSNY, 2002). A babesiose é uma doença febril e hemolítica caracterizada pela infecção dos eritrócitos circulantes por hematozoários do gênero *Babesia* spp. Essa moléstia acomete diferentes espécies de mamíferos, inclusive a humana, acarretando o desenvolvimento de sintomas como febre, letargia e anemia hemolítica aguda com características regenerativas, na dependência da intensidade da parasitemia promovida pelo protozoário (BRANDÃO, HAGIWARA, 2002).

A babesiose canina é uma doença transmitida por carrapatos causada por microorganismos do gênero *Babesia*, ordem Piroplasmida, que se multiplicam preferencialmente em eritrócitos jovens (ALMOSNY, 2002; VIDOTTO, TRAPP, 2004).

De acordo com Taboada (1998) os vetores (*R. sanguineus*) se infectam ao ingerir hemácias parasitadas por merozoítos do protozoário, dando início a um complexo ciclo que culmina com a formação de esporozoítos nas células de suas glândulas salivares. A capacidade de transmissão transtestual e transovariana do agente permite a sua perpetuação, tornando o carrapato infectante por várias gerações.

Brandão e Hagiwara (2002) descreveram que os cães são parasitados por duas espécies de babesia: *Babesia canis* (*B. canis*), mais freqüente nos países tropicais, incluindo o Brasil, e *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*), encontrada primariamente no norte e oeste da África, sudeste asiático e, de forma endêmica, no sudoeste dos EUA. Pelo menos um caso de babesiose humana provocado por *Babesia canis* ssp. já foi identificado (OYAFUSO et al., 2002 apud MARSAUDON et al., 1994).

Segundo Brandão e Hagiwara (2002) com base em estudos sorológicos, bem como nas diferenças de patogenicidade e espécie de vetor transmissor,

um sistema de nomenclatura trinominal para *Babesia canis* foi proposto. *Babesia canis canis* é a cepa, de patogenicidade intermediária, encontrada na Europa e em partes do continente asiático; é transmitida por carrapatos do gênero *Dermacentor*. A cepa mais patogênica, encontrada no sudeste asiático e transmitida por *Haemaphysalis leachi*, é a *Babesia canis rossi*; sendo a *Babesia canis vogeli* (*B. canis vogeli*) a menos patogênica, transmitida pelo *R. sanguineus*. Para Shaw et al. (2001) *B. canis vogeli* causa uma doença relativamente branda em todo o mundo e a importância das espécies de carrapatos na transmissão da babesiose canina varia de acordo com a localização geográfica.

Cacciò et al. (2002) caracterizaram molecularmente infecção natural por *Babesia canis* em 11 cães da Europa e os agentes foram identificados como *B. canis canis* e *B. canis vogeli* com base em análises completas das seqüência dos genes *ssrRNA*. Análises filogenéticas confirmaram que as espécies grandes de babesias de cães pertencem à clade *stricto sensu*, a qual inclui espécies caracterizadas por transmissão transovariana nos seus vetores e por desenvolverem-se exclusivamente dentro de eritrócitos de hospedeiros mamíferos.

Földvári et al. (2005) relataram o primeiro levantamento molecular de babesiose canina (*Babesia canis canis*) na Hungria com o objetivo de caracterizar subespécies (genotipos) destes grandes piroplasmas caninos, utilizando-se PCR e sequenciamento genético. Segundo Földvári e colaboradores, a biologia molecular proporcionou um método poderoso de investigação, não somente para identificação de subespécies, mas também em casos onde sintomas e/ou esfregaços sanguíneos não providenciaram informação diagnóstica definitiva para o Médico Veterinário.

No Brasil, *B. canis vogeli* é a principal babesia de cães. Existem descrições isoladas de *B. gibsoni* baseadas em análise morfológica do parasita em esfregaços sanguíneos corados por Giemsa no estado do Rio Grande do Sul (VIDOTTO, TRAPP, 2004). Estudos soro-epidemiológicos realizados em Minas Gerais apontaram prevalência de cães positivos para a *B. canis* ssp. que variou entre 34,1% e 66,9% (GUIMARÃES et al., 2002).

Aspectos epidemiológicos de infecção por *B. canis vogeli* foram estudados por Maia et al. (2007). Amostras de sangue foram coletadas e

testadas por IFI para detectar anticorpos anti-*B. canis vogeli*. A prevalência desses anticorpos foi de 18,8%, entretanto, nenhuma correlação foi encontrada entre a prevalência da infecção e idade ou sexo dos animais. Cães mestiços apresentaram uma chance maior de adquirirem infecção em comparação aos de raça pura. Diferenças significantes com relação à incidência foram encontradas durante o período de abril a junho em comparação com outros meses, demonstrando que a transmissão de *B. canis vogeli* é relacionada com uma variação sazonal de infestações de carrapatos.

Os sinais clínicos inespecíficos presentes na babesiose canina podem ser provocados pela ação direta do parasito, ou por infecção concomitante entre *B. canis* ssp. e um ou mais agentes, como enterovírus, bactérias ou parasitos intestinais. A infecção mista com *E. canis*, cujo vetor é o mesmo, é citada em vários trabalhos. Essa infecção conjunta pode provocar uma grave síndrome, caracterizada por anemia mormocítica-normocrômica, com a babesia destruindo as hemácias e a erliquia inibindo a eritropoiese (GUIMARÃES et al., 2002).

Almosny (2002) descreveu que a gravidade das manifestações clínicas está associada à patogenicidade da cepa de babesia, à intensidade da parasitemia, à resposta imune e à idade do hospedeiro. As manifestações variam de doença subclínica até doença hiperaguda sendo que cães jovens são mais sensíveis e frequentemente apresentam formas mais graves da doença. A forma hiperaguda ocorre em cães muito jovens, com idade inferior a quatro semanas. Conforme Vidotto e Trapp (2004), no Brasil, a forma subclínica da babesiose canina é provavelmente a apresentação predominante.

A imunidade celular, segundo Vidotto e Trapp (2004) é a mais importante no combate às infecções por *Babesia* spp., consequentemente, a fagocitose de hemácias danificadas, parasitas livres e intra-eritrocíticos ocorre no fígado e baço. Brandão e Hagiwara (2002) citaram que a hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear esplênico ocorre em decorrência da depuração das hemácias circulantes parasitadas pelos merozoítos, enquanto a resposta humoral atua coibindo a infecção de células ainda não infectadas, impedindo a penetração dos esporozoítos. A resposta imune desenvolvida pelos cães contra babesiose é fraca, requer estimulação contínua para sua manutenção e pode não eliminar completamente o parasita e os cães podem tornar-se

portadores crônicos (VIDOTTO, TRAPP, 2004). Andereg e Passos (1999) mencionaram a possibilidade de que infecções agudas por *E. canis* possam ser imunossupressoras para cães infectados com *B. canis* ssp. deve ser considerada, pois foi observado, em alguns casos, que a manifestação clínica da babesiose estava relacionada com infecções agudas de *E. canis*.

Brandão e Hagiwara (2002) relataram que o estado de portador crônico da babesiose canina é decorrente da permanência do agente no organismo animal de modo controlado, não havendo a ocorrência de sintomas agudos da infecção, mas sim a estimulação antigênica periódica que mantém os títulos de anticorpos por longos períodos, protegendo os animais contra infecções futuras. Esses animais são fonte de infecção quando mantidos em colônias ou quando utilizados como doadores de sangue, e uma vez submetidos a condições de estresse podem desenvolver a doença. Segundo Brandão e Hagiwara (2002) o tratamento dos cães doentes com dipropionato de imidocarb causaria a eliminação completa do agente do organismo animal, impedindo assim a perpetuação do estímulo antigênico, limitando a proteção e tornando os animais susceptíveis a novas infecções em decorrência da queda precoce dos títulos de anticorpos protetores. Nessas condições, torna-se desejável a persistência da infecção residual, que possibilite estimulação antigênica periódica e a manutenção de um adequado título de anticorpos, capaz de promover proteção prolongada. Para Vidotto e Trapp (2004) doxiciclina utilizada na dose de 20 mg/kg/dia foi capaz de evitar sinais clínicos e parasitemia em animais inoculados experimentalmente com *B. canis* ssp., porém se utilizada em dose inferior a essa, o animal pode manifestar sinais clínicos, entretanto mais brandos. A eficácia da doxiciclina é inferior ao dipropionato de imidocarb e aceturato de diminazeno. De forma similar, Brandão e Hagiwara (2002) citaram que o estímulo antigênico periódico promovido pela picada do carrapato, e conseqüente inoculação de formas infectantes, parece ser fundamental para a manutenção de títulos protetores de anticorpos. Portanto, animais livres de carrapatos tornam-se mais sensíveis à reinfecção em decorrência do declínio lento dos títulos de anticorpos, sendo susceptíveis 5 a 8 meses após a infecção precedente.

Na Europa encontra-se disponível uma vacina produzida com antígenos solúveis (exo-antígenos) de *B. canis* ssp. liberados em cultivo celular, com

eficiência de 70 a 100%. A vacina não previne a infecção e é capaz de limitar o desenvolvimento da parasitemia, a redução do hematócrito e esplenomegalia após desafio com cepa homóloga. No entanto, as diferenças antigênicas entre os isolados limitam o uso desta vacina em outras regiões, tornando-se necessário produzir uma vacina específica para cada cepa em cada parte do mundo (VIDOTTO, TRAPP, 2004; BRANDÃO, HAGIWARA, 2002).

Os métodos para diagnóstico da babesiose canina baseiam-se na observação direta do agente ou de seus componentes ou na detecção de anticorpos (VIDOTTO, TRAPP, 2004). Exames de esfregaços sanguíneos mostram os parasitos tipicamente piriformes, agrupados em pares em um ângulo característico, com sua extremidade mais fina unida. *B. canis* ssp. é uma grande babesia, cujas formas piriformes variaram de 2,61 a 5,22 µm de comprimento. Além das formas piriformes, predominam parasitos redondos, ovais, alongados ou amebóides. Hemácias podem ser parasitadas com quatro, oito ou mais trofozoítos. Também é freqüente o encontro de formas livres no plasma, bem como hemácias fagocitadas no interior de macrófagos (ALMOSNY, 2002). Segundo Brandão e Hagiwara (2002) a análise do sangue capilar obtido da ponta das orelhas ou dos coxins, corado por colorações tipo Romanowsky (Wright, Giemsa, Rosenfeld ou Diff-Quick), parece aumentar a oportunidade de evidenciar hemácias parasitadas em virtude da diminuição de sua deformabilidade, que decorre da peroxidação lipídica da membrana eritrocitária pelo parasito, e conseqüente acúmulo em vasos de menor calibre como capilares e vênulas. A análise citológica do esfregaço sanguíneo é imprescindível, pois permite a diferenciação morfológica entre *B. canis* ssp., com cerca de 2/5 µm, geralmente aos pares, e *B. gibsoni*, medindo 1/3 µm; essa diferenciação é necessária porque há reação sorológica cruzada entre as duas espécies (BRANDÃO, HAGIWARA, 2002).

Para Almosny (2002) testes genéticos, que detectam o DNA do parasito também vêm sendo utilizados cada vez mais, principalmente em nível experimental e ainda não são utilizados na rotina laboratorial.

A PCR pode ser utilizada para detectar fragmentos de DNA de *Babesia* spp. Esta técnica é sensível, específica, rápida e simples para o diagnóstico de infecção para várias espécies do gênero *Babesia*, proporcionando o diagnóstico em infecções agudas, subclínicas ou crônicas mesmo nos casos de

baixa parasitemia. A PCR também pode ser utilizada para monitoramento de terapia, detecção de animais portadores de *Babesia* spp. e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica deste patógeno emergente (VIDOTTO, TRAPP, 2004). Matos et al. (2006) descreveram o desenvolvimento de uma “nPCR multiplex” para diagnóstico simultâneo de *B. canis* ssp. e *H.* spp. utilizando-se alinhamentos sucessivos do gene 18S rRNA.

Ano et al. (2001) realizaram “nPCR” em amostras sanguíneas de 13 cães acometidos de babesiose canina para confirmar a especificidade e a sensibilidade deste método diagnóstico para esta patologia. Relataram que somente a “nPCR” produziu a visualização de bandas não vistas na primeira rodada da PCR e que estes resultados indicaram que a “nPCR” é altamente sensível e útil para o diagnósticos de babesiose canina.

ELISA foi citado por Vidotto e Trapp (2004); Almosny (2002); Brandão e Hagiwara (2002).

Brandão e Hagiwara (2002) descreveram que a babesiose canina é uma doença endêmica em várias regiões do Brasil, caracterizada pela benignidade dos sintomas e responsividade à terapia específica. No entanto, casos agudos acompanhados de crise hemolítica, choque endotóxico, pancreatite e morte são observados. A recente evolução dos conhecimentos a respeito da patogênese da doença, da importância do desenvolvimento de vacinas, ou ainda, do estado de portador crônico que mantém a imunidade animal em detrimento do controle ambiental do agente, permitindo sua transmissão em nosso meio, torna importante a atualização dos conceitos, o uso se medicamentos ectoparasiticidas eficientes e o controle do uso de animais como doadores de sangue.

III. MATERIAL E MÉTODO

III.1. ANIMAIS

Foram selecionados 56 cães, machos ou fêmeas, de raças e idades variadas, atendidos no Hovet-UFU. Como critério de inclusão desses animais no protocolo experimental, utilizou-se a presença de mórulas e/ou granulações atípicas em leucócitos e/ou presença de mórulas em plaquetas em extensões de sangue periférico de orelha externa, sugestivas de infecção por *Ehrlichia*

spp. ou *Anaplasma platys*, respectivamente. Estes animais foram selecionados a partir das extensões sanguíneas realizadas pelo técnico do Laboratório de Patologia Clínica do Hovet-UFU. Dentre os 56 animais selecionados, 6 apresentaram merozoítos indicativos de infecção por *Babesia* spp., no entanto, isto não foi critério de inclusão ou exclusão dos animais. Dois cães que vieram a óbito foram utilizados para estudos histopatológicos e ultra-estruturais de órgãos.

III.2. LOCAIS DA EXECUÇÃO

As extensões de sangue periférico, venoso e de leucoconcentração foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hovet-UFU.

TEM e MO foram processadas no Instituto de Ciências Biomédicas; Centro de Microscopia Eletrônica e Laboratório de Histologia da UFU, respectivamente.

O método PCR (“Nested PCR” e “Seminested PCR”) foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Molecular, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, SP.

III.2.4. COLHEITA DO MATERIAL

III.2.4.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: ULTRAESTRUTURA DE *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* EM CÉLULAS SANGÜÍNEAS.

No ambulatório clínico do Hovet-UFU foram colhidos dois mL de sangue periférico dos animais selecionados por venopunção cefálica. Posteriormente, no Laboratório de Patologia Clínica transferiu-se o sangue adquirido para frascos de vidro siliconizados contendo 0,1 mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que foi centrifugado em 50 g por 10 minutos. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, aspirou-se o sobrenadante para um tubo de macro-hematócrito (Wintrobe) e executou-se uma segunda centrifugação, pelo mesmo período e velocidade. A capa leucocitária foi aspirada; com uma gota realizou-se extensão de leucoconcentração e o restante foi depositada em frascos de vidro de 10 mL, contendo 5 mL de glutaraldeído a 2% em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,2.

III.2.4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: ULTRA-ESTRUTURA DE ÓRGÃOS

De quatro a cinco fragmentos de aproximadamente um mm³ de baço, medula óssea, pulmão, rim, linfonodos, fígado e coração de dois animais que vieram a óbito foram colhidos, identificados de acordo com o órgão e número do animal e fixados em glutaraldeído a 2% em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 em frascos de vidro de 10 mL.

III.2.4.3. MICROSCOPIA ÓPTICA: HISTOPATOLOGIA DE ÓRGÃOS

Dois fragmentos de aproximadamente um cm³ de baço, medula óssea, pulmão, linfonodos, rim, fígado e coração foram obtidos de dois animais que vieram a óbito. Estes fragmentos foram imediatamente fixados em formol 10%, acondicionados em frascos plásticos de 20 mL e identificados relativamente ao órgão e número do animal.

III.2.4.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

No ambulatório clínico do Hovet-UFU foram colhidos dois mL de sangue dos animais selecionados por venopunção cefálica, transferidos para frascos de vidro siliconizados contendo 0,1 mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), congelados em - 20°C em refrigerador e identificados.

III.2.4.5. EXTENSÕES DE SANGUE PERIFÉRICO, SANGUE VENOSO E DE LEUCOCONCENTRAÇÃO

Também no ambulatório clínico do Hovet-UFU, utilizou-se para a realização de cada extensão de sangue periférico dos 56 animais selecionados, uma agulha 25 X 7, com a qual foi feita uma punção em vaso venoso de orelha externa e colhido o sangue com um tubo de micro-hematócrito. De 42 animais utilizou-se uma gota dos dois mL de sangue colhidos para a TEM de células sanguíneas para realizar as extensões de sangue venoso e uma gota da capa leucocitária para preparar as extensões de leucoconcentração.

III.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

III.3.1. EXTENSÕES DE SANGUE PERIFÉRICO, SANGUE VENOSO E DE LEUCOCONCENTRAÇÃO

III.3.1.1. TÉCNICA UTILIZADA

As extensões de sangue periférico foram realizadas a partir de uma gota de sangue do tubo de micro-hematócrito, utilizando-se a técnica descrita no próximo parágrafo (FERREIRA NETO et al., 1982). Para a realização das extensões de sangue venoso e as extensões de leuconcentração, utilizou-se uma gota do sangue colhido para a obtenção da capa leucocitária e uma da própria capa, respectivamente, empregando-se também a mesma técnica utilizada para realizar a extensões de sangue periférico. Foram feitas extensões de sangue periférico dos 56 animais selecionados. No entanto, foi possível coletar sangue para a realização de extensões de sangue venoso e leuconcentração em 42 dos 56 animais.

Inicialmente, foram preparadas duas lâminas novas e desengorduradas, sendo uma com os cantos recortados. Posteriormente, o frasco de sangue foi agitado lentamente para uma homogeneização e com um bastonete transferiu-se uma gotícula de sangue ou da capa leucocitária para a lâmina. Após isso, com o auxílio da lâmina de canto recortado que foi colocada à frente de cada gotícula em um ângulo de aproximadamente 45°, foi feito um ligeiro movimento para trás, até o material se espalhar na borda da lâmina. Com um movimento uniforme, para frente, fez-se essa lâmina deslizar sobre a outra, arrastando atrás de si o sangue ou a capa leucocitária que espalhou-se em fina camada. Nesse momento, agitou-se a lâmina com a extensão até que ela secasse completamente.

III.3.1.2. COLORAÇÃO

Utilizou-se o método de May-Grünwald-Giemsa como descreveram Ferreira Neto et al. (1982).

Primeiramente a extensão foi colocada voltada para cima entre duas barras metálicas, onde foram depositadas 15 a 20 gotas de May Grünwald, deixando-se agir por aproximadamente três minutos. Em seguida, foi adicionada igual quantidade de água destilada, soprando-se imediatamente os líquidos, para que se misturassem, permitindo que a extensão corasse por um

minuto. Após esse tempo, derramou-se o líquido da lâmina que foi imersa em uma cuba de vidro onde foi depositado o Giemsa na diluição de uma gota de corante para um ml de água destilada neutra. Aguardou-se que corasse por 15-30 minutos e finalmente a lâmina foi retirada e lavada em água corrente, secada por agitação e guardada em caixas de madeira para serem posteriormente examinadas.

III.3.1.3. AVALIAÇÕES DAS EXTENSÕES DE SANGUE PERIFÉRICO, SANGUE VENOSO E DE LEUCOCONCENTRAÇÃO

Os três tipos de extensões sanguíneas dos 42 animais foram posteriormente examinados em microscópio de luz por um segundo examinador, avaliando-se as células da borda franjada de todas as extensões e também as bordas laterais das mesmas. As inclusões citoplasmáticas identificadas em leucócitos foram devidamente contadas e registradas relacionando-as com a respectiva lâmina e animal. Não foram novamente avaliadas as inclusões intra-plaquetárias. Quando pertinente, as inclusões ou alterações celulares foram fotografadas e também identificadas, utilizando-se fotomicroscópio óptico (Zeiss Axiolab, Alemanha) em objetiva de 40X. Foi também realizada contagem diferencial dos leucócitos.

III.3.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (“NESTED PCR” E “SEMINESTED PCR”) DE AMOSTRA DE SANGUE TOTAL PARA *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma platys* E *Babesia canis vogeli*

O material colhido, congelado a -20 °C e armazenado para a realização da PCR foi enviado após acondicionamento em gelo reciclável para ser processado como descrito a seguir.

III.3.2.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Todas as 56 amostras de sangue foram examinadas para a presença de DNA alvo (*E. canis*, *E. spp.*, *A. platys*) pela técnica de Reação em cadeia da polimerase (“nested PCR”) descrita por Wen et al., (1997). Para o exame pela “seminested PCR” (*B. canis vogeli*) foram analisadas somente as amostras que apresentaram merozoítos indicativos de infecção por *Babesia* spp. utilizando-se a adaptação da técnica descrita por Birkenheuer et al., (2003).

DNA genômico foi extraído de sangue, utilizando-se o GFX™ Genomic Blood DNA Purufication Kit (Amersham, Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA).

III.3.2.2. PCR DE ERLIQUIAS: PREPARO DAS MISTURAS E CONDIÇÕES DA REAÇÃO

III.3.2.2.1. AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia* spp. E *Anaplasma platys* UTILIZANDO-SE GO TAQ® GREEN MASTER MIX

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se uma solução de reagentes “pronta para uso” que já contém o tampão de reação, os deoxinucleotídeos (DNTPS), Cloreto de magnésio (MgCl₂) e a enzima DNA Polimerase (GoTaq® Green Master Mix; Promega, Madison, WI-USA), bastando apenas acrescentar à reação o DNA da amostra e os oligonucleotídeos iniciadores, que neste caso, foram usados pares específicos que amplificam uma região conhecida do gene 16S rRNA para *E. canis*, *A. platys* e *E. spp.* para cada uma das reações (Tabelas 1, 2 e 3). Quando esta solução foi usada para preparar as reações de PCR, as condições da reação seguiram um volume final de 25 µl contendo 12.5 µl de 2X Go Taq® Green Master Mix buffer [pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM

dTTP, 3.0 mM MgCl₂], 80 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 5 µl do DNA da amostra para a reação.

As condições de amplificação foram idênticas às descritas no protocolo de PCR para cada um dos parasitas. A amplificação das reações foi realizada em termociclador automático (Eppendorf® Mastercycler Gradient; Hamburg, Germany). A reação de PCR consistiu em uma etapa inicial a 94°C por 10 minutos para a desnaturação do DNA e uma sequência de 40 ciclos repetidos, composto de três temperaturas para cada ciclo: 94°C por 1 minuto para desnaturação da fita de DNA, 60°C por 1 minuto para hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores e 72°C por um minuto para a extensão da cadeia. Para garantir a finalização do processo de extensão e a presença dos DNAs amplificados, realizou-se ainda uma incubação a 72°C por quatro minutos e finalmente 4°C por quatro minutos.

A segunda reação da “nPCR” foi idêntica à primeira, diferindo no molde e oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Os “iniciadores” usados na “nPCR” foram específicos para o segmento de *E. canis*, *E. spp.* e *A. platys* (gene 16S rRNA) e foram designados por sequências publicadas (BULLA et al., 2004; MARTIN et al., 2005, WEN et al., 1997) (Tabelas 1, 2 e 3). O DNA molde utilizado para a amplificação “nested” foi uma alíquota de 1,0 µL proveniente da reação inicial.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para diagnóstico de *Ehrlichia canis* que amplificam um amplicono de ~ 390 pb.

Fase da reação	Nome	Sequência do oligonucleotídeo (5' – 3')
PCR	EHO sense	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'
PCR	EHO antisense	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
“nested”	ECA sense	5'-AATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3'
“nested”	ECA antisense	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para diagnóstico de *Anaplasma platys* que amplificam um amplicono de ~ 390 pb.

Fase da reação	Nome	Sequência do oligonucleotídeo (5' – 3')
PCR	EHO sense	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'
PCR	EHO antisense	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
“nested”	EHPL sense	5'-TTTTTGTCTAGCTTGCTATGATA-3'
“nested”	EHPL antisense	5'-TGTGGGTACCATTATCCCCA-3'

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para diagnóstico de *Ehrlichia* spp. que amplificam um amplicono de ~ 390 pb.

Fase da reação	Nome	Sequência do oligonucleotídeo (5' – 3')
PCR	EHO sense	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'
PCR	ECA antisense	5'-GGGCAGTGTGTACAAGACCCGAGAA-3'
“nested”	ESPP sense	5'-AACACATGCAAGTCGAACGGA-3'
“nested”	ECA antisense	5'-AACACATGCAAGTCGAACGGA-3'

III.3.3. “SEMINESTED PCR” PARA DETECÇÃO DO DNA DE *Babesia canis vogeli*

III.3.3.1. PCR: PREPARO DAS MISTURAS E CONDIÇÕES DA REAÇÃO

A reação de “seminested PCR” também foi realizada utilizando-se a mesma solução de reagentes “pronta para uso” que foi citada na PCR de *E. canis*, *E. spp.* e *A. platys*. Entretanto, na primeira reação (PCR), foram usados os oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene 18S rRNA de *Babesia canis vogeli* (*B. canis vogeli*) (Tabela 4). Quando esta solução foi usada para preparar as reações de PCR, as condições da reação também seguiram um volume final de 25 µl contendo 12.5 µl de 2X GoTaq® Green Master Mix buffer [pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3.0 mM MgCl₂], 400 nM de cada oligonucleotídeo iniciador (1µl de oligonucleotídeos iniciadores) e 5.0 µl do DNA da amostra.

A amplificação foi realizada em termociclador automático (Eppendorf® Mastercycler Gradient) realizando-se uma incubação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 50 ciclos a 95°C por um minuto, 58° C por 45 segundos e 72°C por um minuto. Ao final foi realizada uma incubação a 72°C por cinco

minutos. Para a segunda fase da reação (“seminested”) foram realizados 30 ciclos com as mesmas temperaturas e tempos descritos acima. Os três oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão inseridos na Tabela 4.

Tabela 4. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para diagnóstico de *Babesia canis vogeli*, que amplificam um amplicono de ~ 200 pb.

Fase da reação	Nome	Seqüência do oligonucleotídeo (5' – 3')
PCR	455-479 sense	GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC
PCR	793-772 antisense	ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA
“seminested”	BCV sense	GTTGAGTTTGCCATTCGTT

III.4. MONITORAÇÃO DAS REAÇÕES

Objetivando-se prevenir eventuais problemas de contaminação, as técnicas de Reação em cadeia da polimerase (“nested” e “seminested”) foram processadas em cinco ambientes diferentes e para cada etapa de preparação das reações utilizaram-se conjuntos diferentes de pipetas de precisão e ponteiros de uso único.

III.4.1. CONTROLES

Para a comprovação da eficiência da PCR e detecção de eventuais contaminações, utilizaram-se os controles positivo e negativo. Dentro de cada corrida da PCR, DNA genômico de três casos confirmados de *E. canis*, *E. spp.* e *A. platys* e um de *B. canis vogeli* foram usados como controles positivos, os quais foram previamente seqüenciados e comparados com seqüências depositadas no “Genbank”, apresentando-se compatíveis para cada um dos agentes testados.

Igualmente, para cada ciclo da PCR, água ultrapura autoclavada foi usada como molde e simulada como controle negativo.

III.5. MÉTODO DE DETECÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES

Os produtos obtidos na amplificação pelas técnicas utilizadas foram analisados em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL. Em seguida foram examinados comparativamente com marcadores de DNA de 50 e 100 bp (GE healthcare, Piscataway, Nova Jersey., EUA) com auxílio de transiluminador ultravioleta. Foram considerados

positivos os que apresentaram banda de tamanho específico e compatível com o produto amplificado por cada reação. Por último foi realizada fotodocumentação em analisador de imagem (AlphaImager-Alphaeasy FC Software-AlphaImaging Corporation®) do material de interesse.

III.6. REALIZAÇÃO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CAPA LEUCOCITÁRIA E ÓRGÃOS

Posteriormente a fixação, com o objetivo de retirar resíduos de glutaraldeído, a capa leucocitária foi homogeneizada na solução fixadora, distribuída em microtubos de dois mL e centrifugada em 50 g por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, acrescentou-se tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 até completar dois mL. Realizou-se nova centrifugação em 50 g por 5 minutos e descarte do sobrenadante. Este procedimento foi repetido três vezes. Em seguida foi adicionado agar neutro 4% aquecido em aproximadamente 50°C. Antes que a solução de agar se solidificasse, o microtubo foi agitado vigorosamente. Com o resfriamento do material, formou-se um pequeno bloco de agar misturado com papa de leucócitos que foi retirado do frasco e cortado em fragmentos de aproximadamente 1 mm³. A partir desta etapa o material foi processado como se fosse fragmento de órgão.

A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1% durante 30 minutos e tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% por mais 30 minutos. Posteriormente realizou-se desidratação em etanol e óxido de propileno e inclusão em resina Epon (Fluka, Suíça).

Finalmente, utilizando-se ultramicrotomo e navalha de diamante foram obtidos cortes ultrafinos, colhidos em grades de cobre de 250 “mesh”, contracordados com acetado de uranila (Merck, Darmstadt, Alemanha) como descrito por Watson (1958) e citrato de chumbo (Merck, Darmstadt, Alemanha), Reynolds (1963). A avaliação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão EM-109, (Zeiss, Alemanha).

III.7. REALIZAÇÃO DA MICROSCOPIA ÓPTICA

Depois da fixação dos fragmentos em solução de formalina a 10%, estes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (50, 75, 85 e 100%). Em seguida os tecidos foram embebidos e incluídos em parafina e seccionados em micrótomo (Leica Instruments Gmbh, Nussloch, Alemanha). Cortes de 6 µm de espessura foram posteriormente corados em hematoxilina e eosina e analisados por microscopia de luz em fotomicroscópio óptico (Zeiss Axiolab, Alemanha), onde se efetuou microfotografias dos órgãos analisados, em objetivas de 10X, 40X e 100X.

IV. RESULTADOS

IV.1. EXTENSÕES DE SANGUE PERIFÉRICO, SANGUE VENOSO E DE LEUCOCONCENTRAÇÃO: ANÁLISE E DESCRIÇÃO DAS INCLUSÕES INTRALEUCOCITÁRIAS, INTRAPLAQUETÁRIAS E INTRAERITROCITÁRIAS

No presente trabalho, as inclusões intraleucocitárias que foram sugestivas de infecção natural por *Ehrlichia* spp., apresentaram forma tendendo a circular ou circular (Figuras 2-9 e 10), um número variado de inclusões por célula parasitada (Figura 2-6), uma ampla variação no número de células parasitadas por extensão sanguínea (Figuras 2-6), distintas intensidades de coloração (Figuras 3-6) e múltiplos tamanhos (Figuras 2-7).

As alterações morfológicas observadas em extensões sanguíneas de animais com diagnóstico laboratorial de infecção por *E. spp.* foram principalmente vacuolizações em monócitos e em linfócitos, macroplaquetas, eritrofagocitose, leucofagocitose (Figura 4).

As inclusões intracitoplasmáticas que foram sugestivas de infecção natural por *Anaplasma platys* apresentaram forma circular e um variado número de inclusões por célula parasitada (Figura 10).

As inclusões intraeritrocíticas indicativas de infecção natural por *Babesia* spp. foram visualizadas em diversas formas; arredondadas, piriformes e em número 2 a 4 merozóitos dentro da mesma hemácia, quando coradas pelo

método de Giemsa. Os merozoítos apresentaram-se em tamanhos variados, desde estruturas um pouco menores, até estruturas maiores, que ocupavam quase todo o citoplasma da hemácia (Figuras 11-12).

Na avaliação realizada pelo primeiro examinador, quarenta e três extensões (76,8%) possuíam mórulas em leucócitos ou também mórulas em plaquetas e/ou granulações atípicas. Destas; 36 (64,3%) apresentaram mórulas exclusivamente em leucócitos, três (5,4%) também apresentaram granulações atípicas em neutrófilos, duas (3,6%) continham também mórulas em plaquetas e duas (3,6%) além de possuir mórulas em leucócitos também apresentaram mórulas em plaquetas e granulações atípicas. Das 13 (23,2%) extensões restantes, 12 (21,4%) possuíam somente granulações atípicas em neutrófilos e uma (1,8%) apenas mórula em plaquetas.

Tabela 5. Número de animais e de resultados positivos para *E. canis* e *A. platys* de acordo com os achados em extensões de sangue periférico de acordo com o primeiro examinador.

Achados citológicos	Número de animais
Mórula em leucócitos	36
Mórula em leucócitos e granulações atípicas	3
Mórula em leucócitos e em plaquetas	2
Mórula em leucócitos, mórula em plaquetas e granulações atípicas	2
Granulações atípicas	12
Mórula em plaquetas	1



Figura 2: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusão intracitoplasmática característica de mórula de *Ehrlichia* spp. em monócito. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 35 μ m.



Figura 3: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Setas: Inclusões intracitoplasmáticas características de corpos elementares (cabeça de seta), corpo inicial (seta fina) e mórula (seta grossa) de *Ehrlichia* spp. em um mesmo monócito. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 35 μ m.

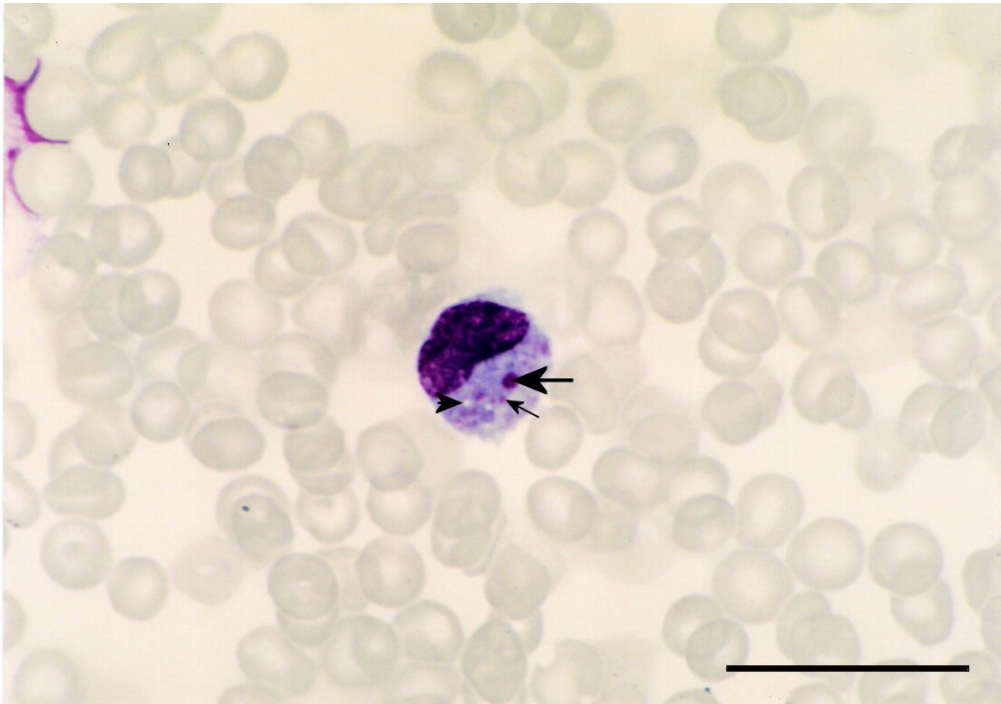


Figura 4: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusões intracitoplasmáticas características de corpos elementares (seta fina) e corpos iniciais (seta grossa) de *Ehrlichia* spp. em monócito. Notar a presença de vacuolizações (cabeça de seta). Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 30 μ m.

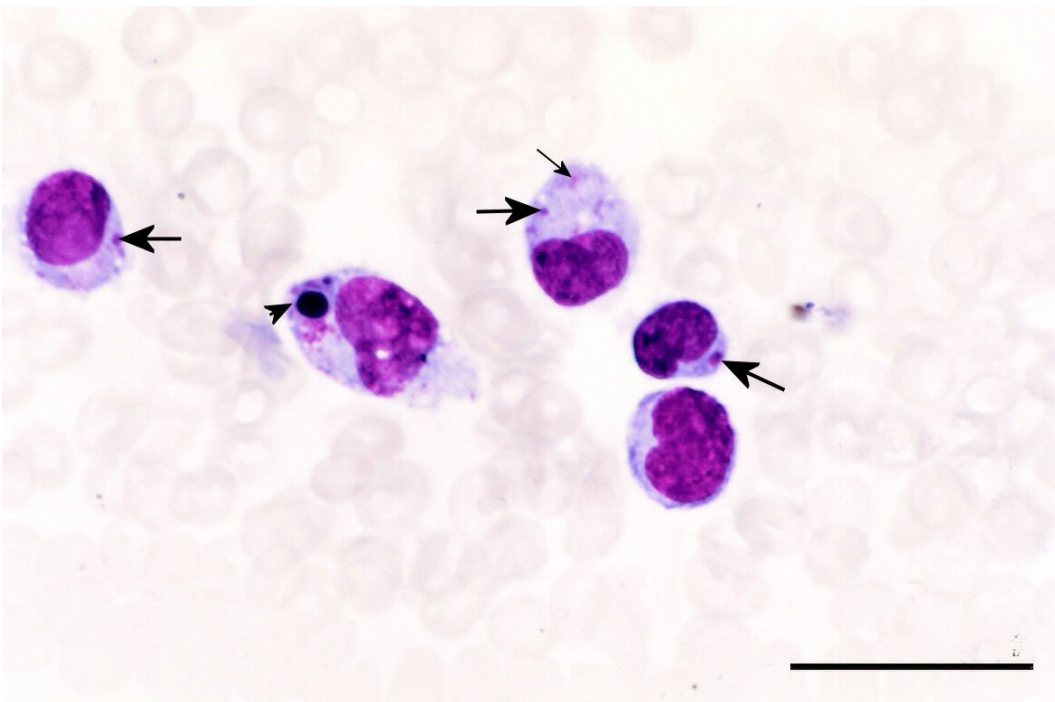


Figura 5: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusões intracitoplasmáticas características de corpos elementares (seta fina), corpos iniciais (seta grossa) e mórula (cabeça de seta) de *Ehrlichia* spp. em monócito. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 30 μ m.

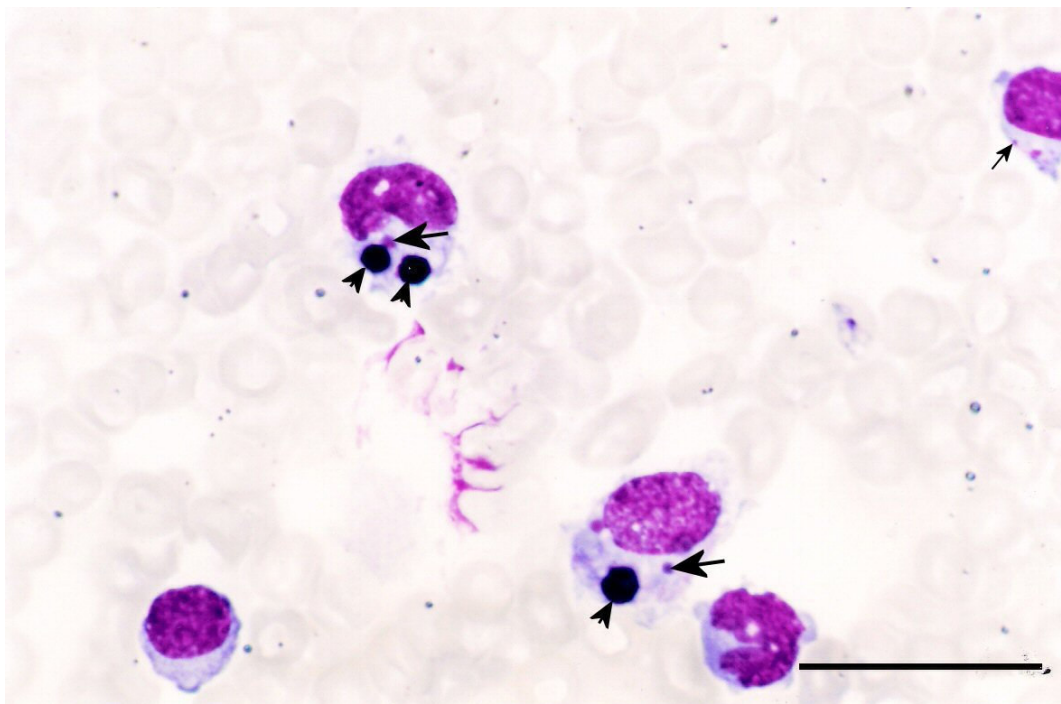


Figura 6: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusões intracitoplasmáticas características de corpos elementares (seta fina), corpos iniciais (seta grossa) e mórulas (cabeça de seta) de *Ehrlichia* spp. em monócito. Notar a presença de 2 mórulas em um mesmo monócito. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 30 μ m.



Figura 7: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: 4 corpos iniciais (setas) de *Ehrlichia* spp. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 35 μ m.

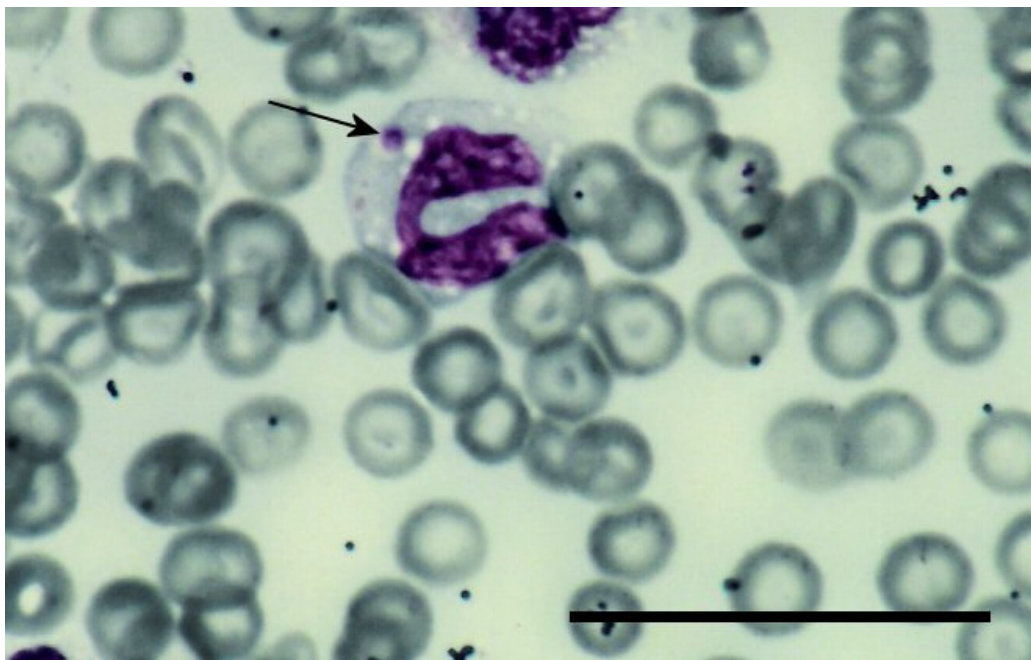


Figura 8: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusões intracitoplasmáticas características de corpo inicial (seta) de *Ehrlichia*. spp. em neutrófilo bastonete. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 35 μ m.

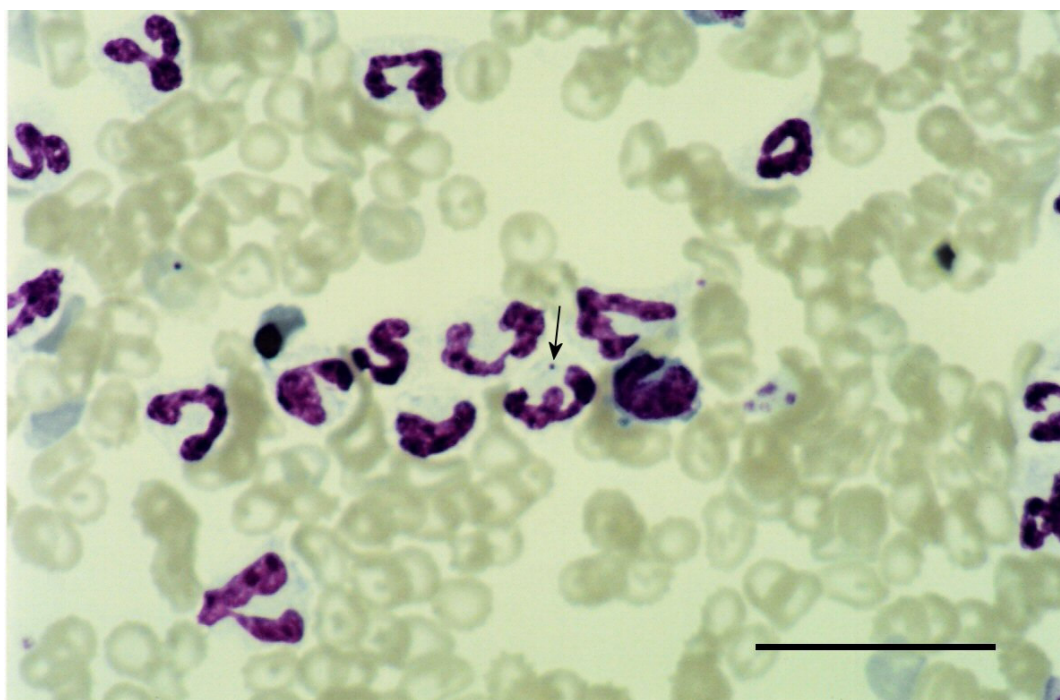


Figura 9: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusão intracitoplasmática característica de granulação atípica (seta) de *Ehrlichia*. spp. em neutrófilo segmentado. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 35 μ m.

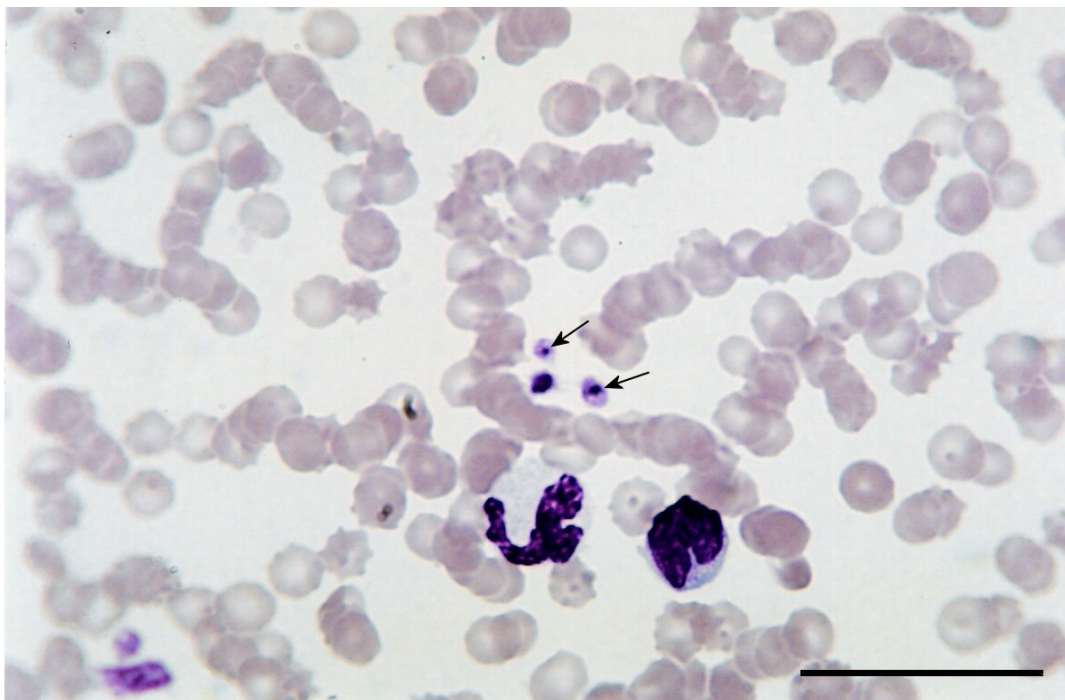


Figura 10: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusão intracitoplasmática característica de mórula (seta) de *Anaplasma platys* em plaqueta. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 35 μ m.

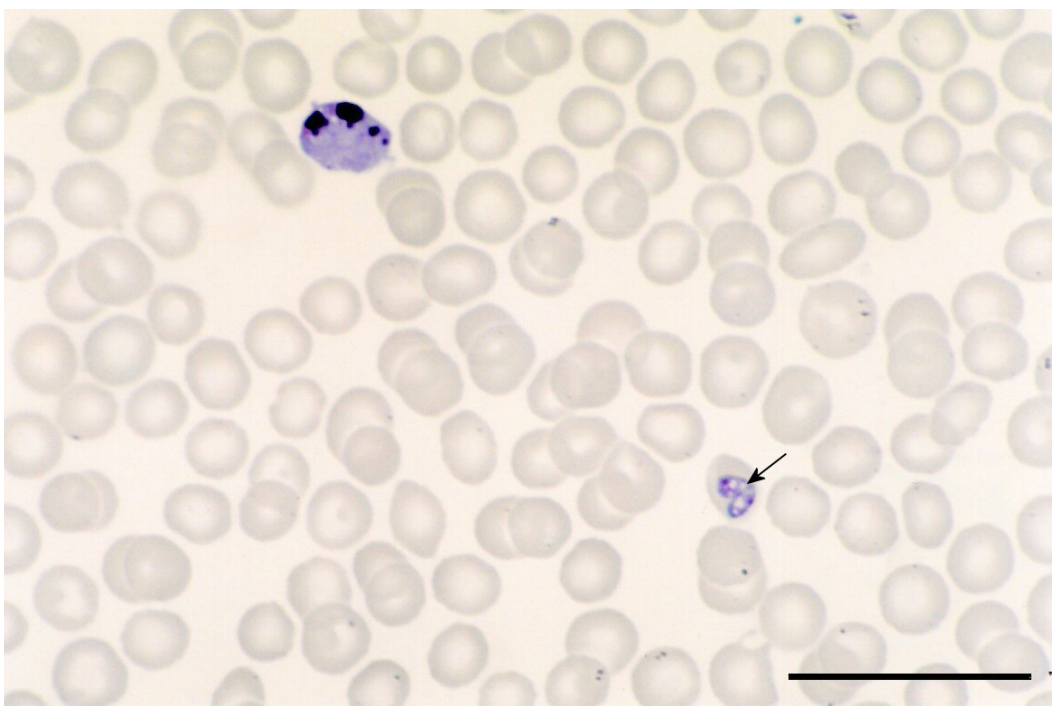


Figura 11: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusões intraeritrocitárias características de merozoítos de *Babesia* spp. Notar a presença de 2 grandes merozoítos (seta). Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 30 μ m.

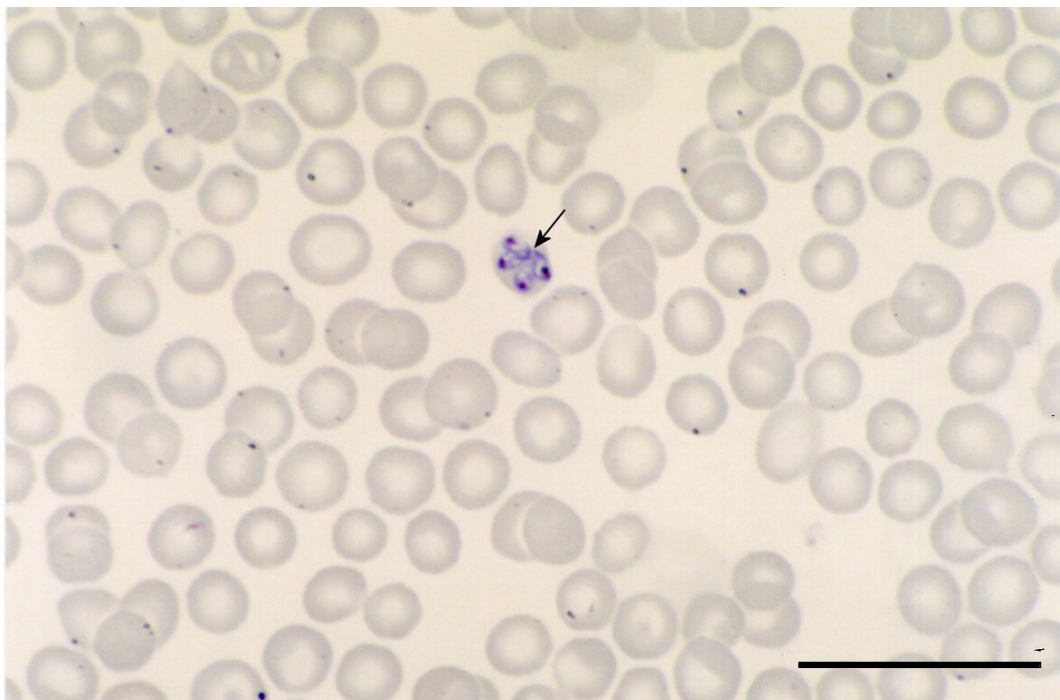


Figura 12: Fotomicrografia de extensão de sangue periférico de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Seta: Inclusões intraeritrocitárias características de merozoítos de *Babesia* spp. Notar a presença de 4 grandes merozoítos no eritrócito (seta). Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Barra = 30 μ m.

Posteriormente, foram novamente avaliadas as extensões de sangue periférico de 43 animais, por outro examinador. Foram encontradas mórulas em leucócitos de 31 (73,8%) das extensões. Destas, em três (7,1%) foram observadas mórulas somente em neutrófilos, em duas (4,8%) somente em linfócitos, em 17 (40,5%) somente em monócitos, em seis (14,3%) em monócitos e linfócitos e em três (7,1%) monócitos e neutrófilos. Vinte e sete extensões apresentaram granulações atípicas em neutrófilos, sendo que em 17 também existiam mórulas em leucócitos e 11 possuíam somente granulações atípicas (Tabela 6).

Nas extensões de sangue venoso realizadas em 42 animais, foram encontradas mórulas em leucócitos de 16 (38,1%) delas. Destas, em apenas uma (2,4%) foram observadas mórulas somente em neutrófilos, em apenas uma (2,4%) foram observadas mórulas somente em linfócitos, em 13 (30,9%) somente em monócitos e em uma (2,4%) em monócitos e linfócitos. Vinte e quatro (57,1%) esfregaços apresentaram granulações atípicas em neutrófilos (Tabela 6).

Nas extensões de leucoconcentração realizadas nos mesmos 42 animais foram encontradas mórulas em leucócitos de 17 (40,5%) delas. Destes, em dois (4,8%) foram observadas mórulas somente em linfócitos, 9 (21,4%) somente em monócitos, quatro (9,5%) em monócitos e linfócitos, um (2,4%) em monócitos e neutrófilos e um (2,4%) em monócito, linfócitos e neutrófilos. Trinta (71,4%) esfregaços apresentaram granulações atípicas em neutrófilos (Tabela 6).

Das 43 amostras de sangue periférico avaliadas por dois examinadores, em nove (21%) não foram observadas mórulas em leucócitos pelo primeiro examinador, mas em quatro delas (9%) foram observadas mórulas pelo segundo examinador. Nas 34 (79%) amostras restantes, enquanto o primeiro examinador encontrou mórulas em todas elas, o segundo examinador encontrou em 28 (65%). Portanto, houve discordância em 10 (23%) das amostras.

Tabela 6: Porcentagem de extensões sanguíneas avaliadas que apresentaram mórulas somente em monócitos, exclusivamente em linfócitos, apenas em neutrófilos e que apresentaram em uma mesma extensão mórulas em monócitos e linfócitos, em monócitos e neutrófilos e em monócitos, linfócitos e neutrófilos e ausência de mórulas, avaliadas por um segundo examinador.

	Monócito	Linfócito	Neutrófilo	Monócito-Linfócito	Monócito-Neutrófilo	Monócito-Linfócito-Neutrófilo	Ausência de mórula
Sangue periférico	40,5	4,8	7,1	14,3	7,1	0	26,2
Sangue venoso	30,9	2,4	2,4	2,4	0	0	61,9
Leuco-concentração	21,4	4,8	0	9,5	2,4	2,4	59,5

IV.2. DETECÇÃO DE DNA DE *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma platys* E *Babesia canis vogeli*

Considerando a avaliação realizada pelo técnico do Laboratório de Patologia Clínica do Hovet-UFU, das 56 amostras sanguíneas avaliadas pela técnica de “Nested-PCR”, foram amplificados DNAs de agentes da família Anaplasmataceae em 41 animais (73%) (Tabela 7 e Figura 13). Entretanto,

quando avaliou-se apenas amostras com presença de mórulas em leucócitos e plaquetas, e detecção somente de DNA de *E. canis* e/ou *E. spp.*, este número foi de 36 amostras positivas (82%) de 44 examinadas. Analisando-se somente as amostras com a presença de granulações atípicas (17/56) e a amplificação de DNA para *E. canis* e/ou *E. spp.*, a porcentagem foi de 53% (9/17) de positividade (Tabela 7).

Quando se considerou apenas as 12 amostras com granulações atípicas e ausentes de mórulas, apenas 5 (41,5%) foram positivas pela nPCR, sendo que duas (40%) amplificaram DNA somente de *E. spp.* e três (60%) amplificaram para *E. canis* e *E. spp.*

Dos 56 animais incluídos no experimento, 5 (9%) apresentaram mórulas em plaquetas, sugestivas de infecção por *A. platys*, nas extensões realizadas pelo primeiro examinador. Destas amostras, somente uma (1) amplificou DNA deste agente (20%) pela nPCR.

Uma amostra apresentou mórula em leucócitos e plaquetas (20%) das 6 amostras que amplificaram o DNA de *A. platys*, sendo que todas as 6 (100%) que formaram bandas típicas para essa bactéria também apresentaram mórulas em leucócitos. Nenhuma amostra que formou amplímeros de *A. platys* apresentava granulações atípicas isoladas ou em associação com mórulas em leucócitos.

Das 6 amostras que amplificaram DNA para *A. platys* 5 (83%) dessas amostras apresentaram bandas específicas para *E. canis*, *E. spp.* e *A. platys* ao mesmo tempo e uma amostra formou amplímeros tanto de *E. spp.* como de *A. platys*. Uma amostra que amplificou o DNA tanto de *E. canis*, *E. spp.* e *A. platys* apresentou também gamontes de *Hepatozoon* spp. em neutrófilos.

Seis amostras (11%) foram positivas para *E. spp* e não foram positivas para *E. canis* e/ou *A. platys*.

Das amostras analisadas pela reação semi-nested PCR, 5 (83%) produziram amplímeros de *B. canis vogeli* (Figura 14) dentre as 6 que apresentaram merozoítos em microscopia de luz (11%). Uma amostra apresentou-se negativa por esse mesmo teste molecular e positiva em microscopia de luz.

Dentre 5 amostras que amplificaram o DNA de *B. canis vogeli*, 4 (80%) apresentaram concomitantemente mórulas em leucócitos e uma amostra (20%) apresentou apenas granulações atípicas.

Das 5 amostras que amplificaram DNA de *B. canis vogeli*, uma (20%) apresentou também bandas específicas para *E. canis* e *E. spp.*, duas (40%) formaram bandas específicas unicamente para *Babesia canis vogeli*, uma (20%) amplificou DNA de *E. spp.* e *B. canis vogeli* ao mesmo tempo e uma (20%) apresentou amplímeros para *E. canis*, *E. spp.*, *A. platys* e *B. canis vogeli* simultaneamente.

Tabela 7. Número de animais e de resultados positivos de PCR para *E. canis* e *A. platys* de acordo com os achados em extensões de sangue periférico.

Achados citológicos	Número de animais	Porcentagem de animais (%)	PCR <i>Ehrlichia. spp.</i> positivo	PCR <i>E. canis</i> positivo	PCR <i>A. platys</i> positivo
Mórula em leucócitos	36	64,3	29	26	5
Mórula em leucócitos e granulações atípicas	3	5,4	2	2	0
Mórula em leucócitos e em plaquetas	2	3,6	2	0	1
Mórula em leucócitos, mórula em plaquetas e granulações atípicas	2	3,6	2	2	0
Granulações atípicas	12	21,4	5	4	0
Mórula em plaquetas	1	1,8	0	0	0

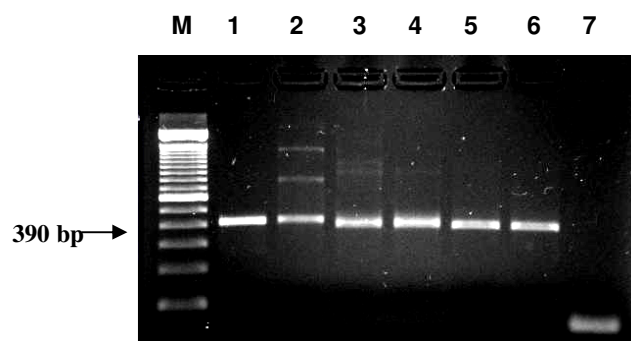


Figura 13: Fotografia de eletroforese em gel de Agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Os amplicómeros mostrados da foto são relativos à “Nested-PCR” para *Ehrlichia* spp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, e têm tamanho aproximado de 390 bp. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pb (Amersham Biosciences®); canaletas 1, 2, 3, 4 e 5: amostras testadas e positivas; canaleta 6: controle positivo (amostra previamente seqüenciada e comparada no “Genbank”); e canaleta 7: controle negativo da reação.

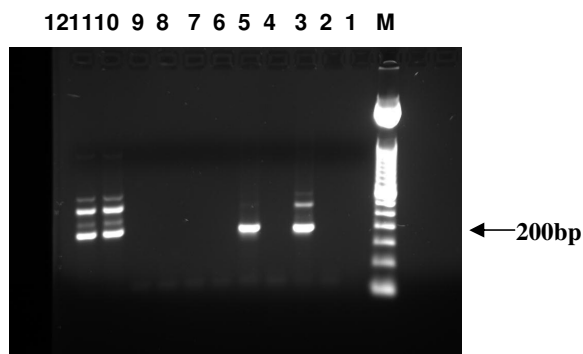


Figura 14: Fotografia de eletroforese em gel de Agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Os amplicómeros mostrados da foto são relativos à “Seminested-PCR” para *Babesia canis vogeli*, e têm tamanho aproximado de 200 pb. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 50 bp (Amersham Biosciences®); canaleta 11: controle positivo (amostras previamente seqüenciadas e analisadas filogeneticamente); canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10: amostras testadas (3, 5 e 10 foram positivas); e canaleta 12: controle negativo da reação.

IV.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CAPA LEUCOCITÁRIA: ULTRAESTRURA DE *Ehrlichia* spp. E *Anaplasma platys*

O exame por TEM mostrou frações celulares distintas (granulócitos, agranulócitos, plaquetas e eritrócitos), contudo eritrócitos e plaquetas também foram visualizados entremeados entre os leucócitos (Figuras 15-18). Na grande maioria das amostras não foi possível observar leucócitos ou plaquetas contendo mórulas ou erliquias isoladas, mas em uma delas, observou-se a presença de corpos elementares, isoladamente ou em grupos, em baixa parasitemia, em neutrófilos (Figuras 19-24).

Curiosamente, apesar de serem encontradas mórulas e/ou granulações atípicas nos 56 animais selecionados em extensões de sangue periférico, em TEM não foi visualizada nenhuma mórula ou erliquia isolada em qualquer leucócito mononuclear. Em um animal foi observado grande número de neutrófilos contendo mórulas, mesmo assim não foram detectadas mórulas em mononucleares. Tanto os corpos elementares como as mórulas, foram encontrados no interior de vacúolos parasitóforos que eram formados por uma única membrana. O interior dos vacúolos mostrou-se eletrólucido contendo erliquias que variaram de um a cinco organismos. Geralmente, próximo aos vacúolos foram observados numerosos lisossomos e mitocôndrias (Figuras 21 e 22).

As erliquias foram vistas como estruturas levemente elípticas, esféricas ou em forma de rim (Figuras 19-24), possuindo duas membranas. A membrana interna apresentava-se lisa e a externa ondulada (Figura 22 e 24). No seu interior foram observados material granular fino (material reticular) e eventualmente alguns grânulos mais eletrondensos e maiores. Não foram visualizadas erliquias intraplaquetárias.

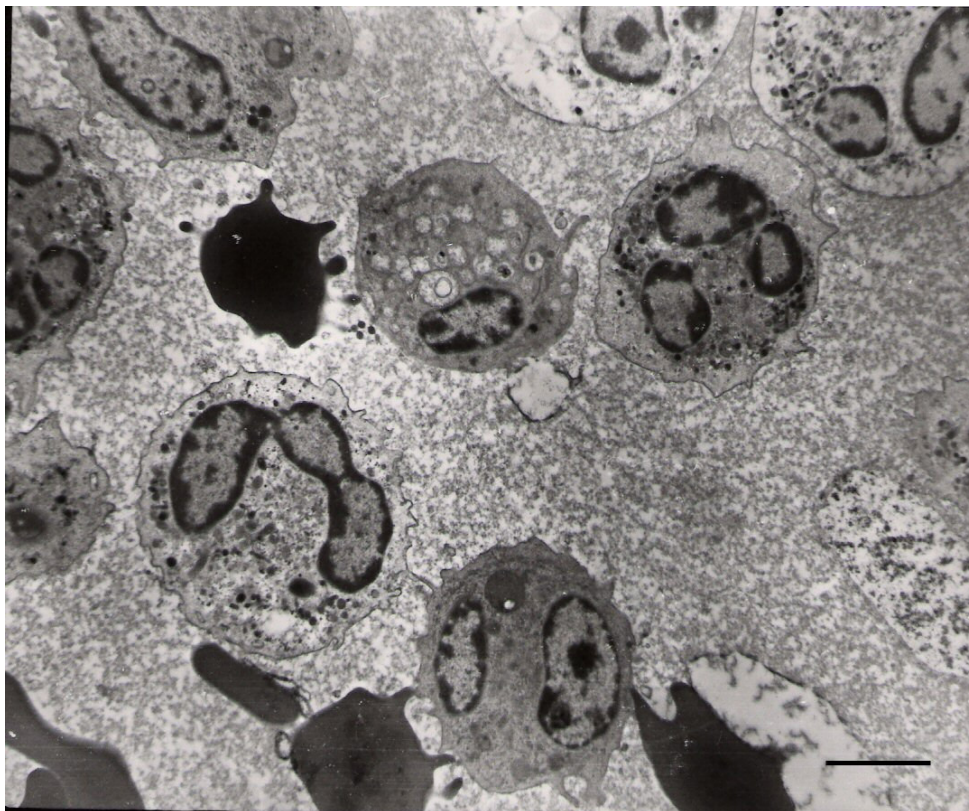


Figura 15: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Frações celulares distintas (granulócitos). Barra = 5 μ m.

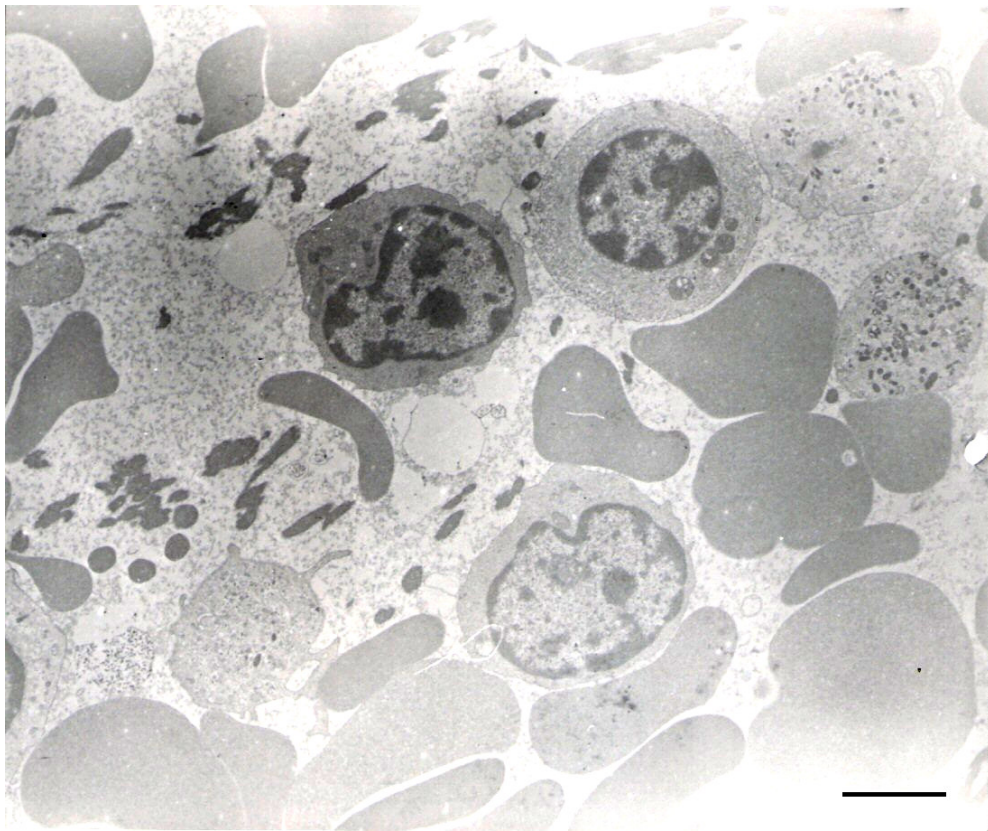


Figura 16: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Frações celulares distintas (agranulócitos). Barra = 5 μ m.

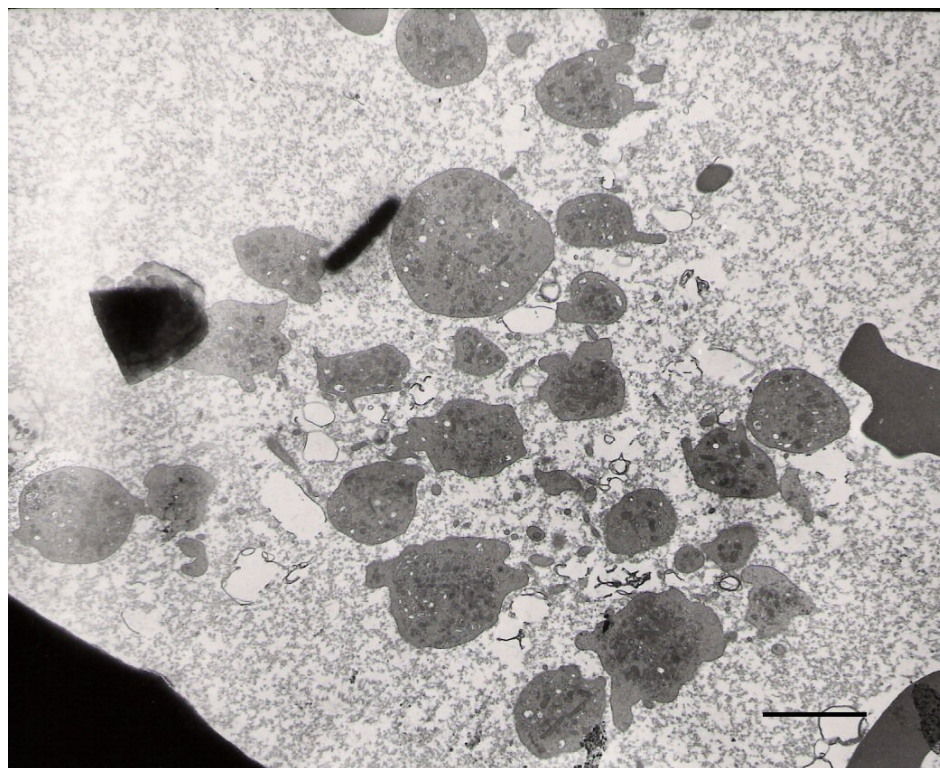


Figura 17: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Frações celulares distintas (plaquetas). Barra = 5 μ m.

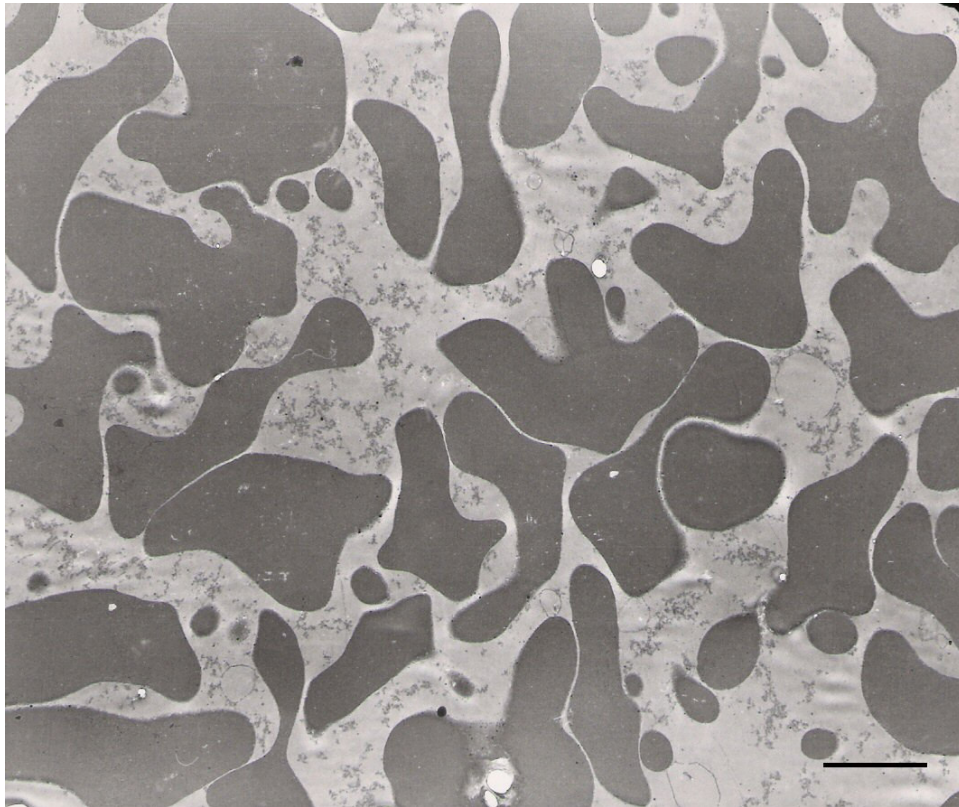


Figura 18: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Frações celulares distintas (eritrócitos). Barra = 5 μ m.

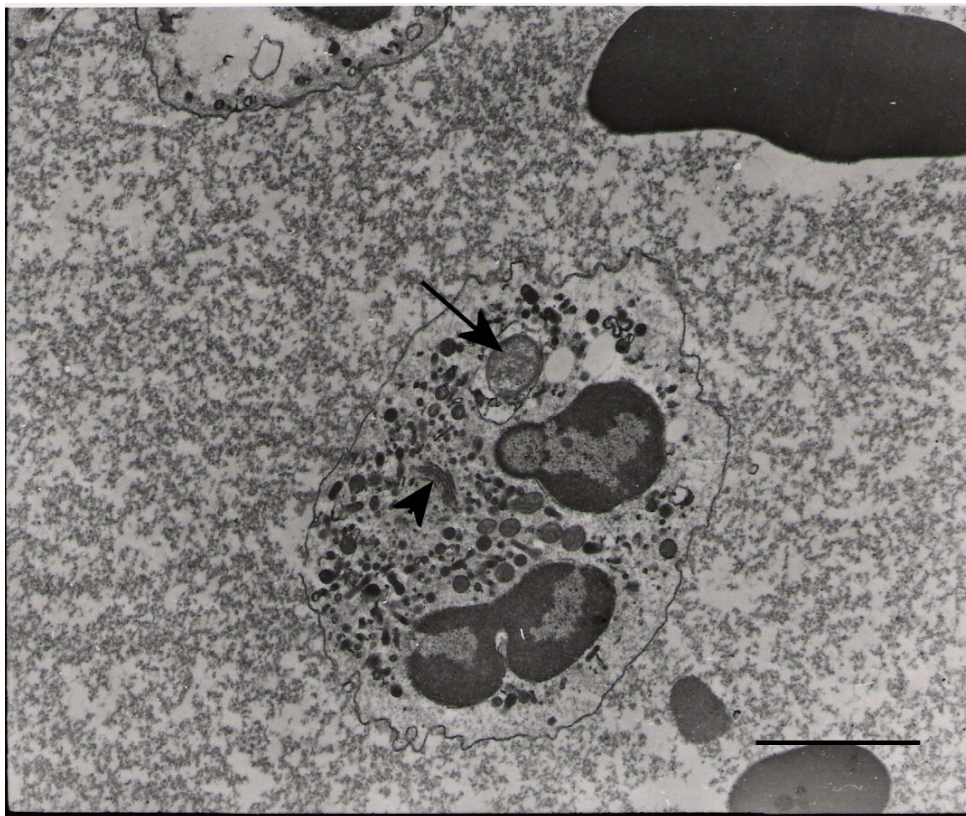


Figura 19: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Neutrófilo com inclusão intracitoplasmática (corpo elementar) (seta) de *Ehrlichia* spp. Notar a identificação do complexo de golgi (cabeça de seta). Barra = 5 μ m.

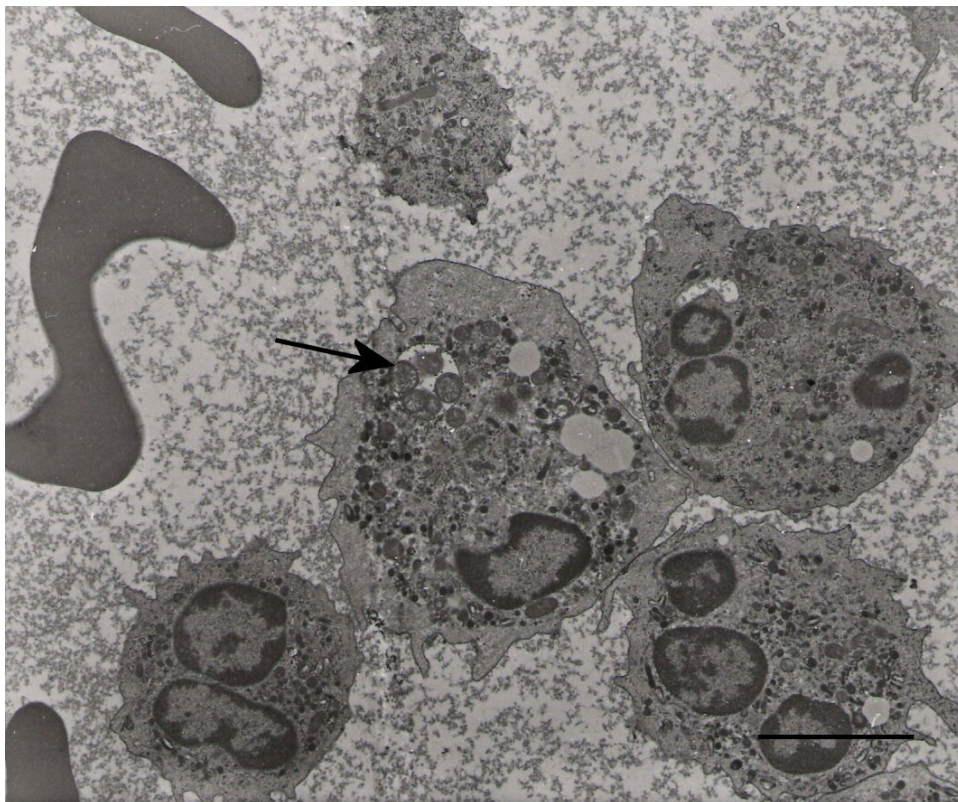


Figura 20: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Neutrófilo com inclusão intracitoplasmática (mórula), (seta) de *Ehrlichia* spp. com 4 corpos elementares.. Barra = 5 μ m.

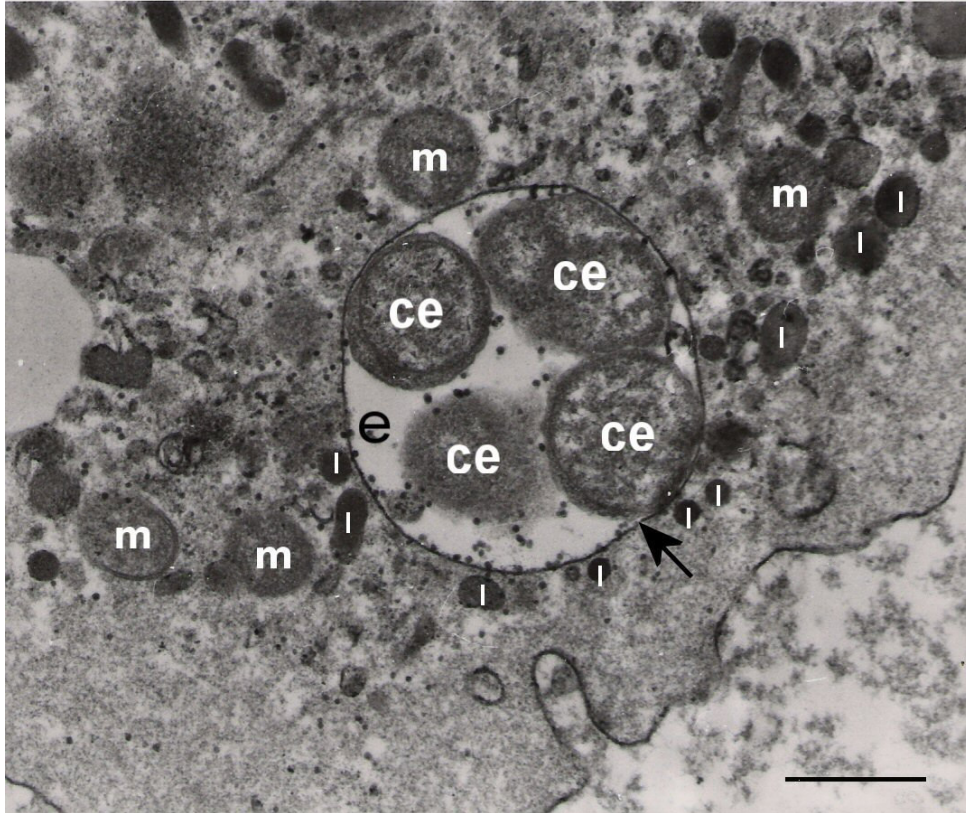


Figura 21: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Inclusão intracitoplasmática (mórula), de *Ehrlichia* spp. formada por um vacúolo parasitóforo de conteúdo eletrólucido (e), constituído por uma única membrana (seta). Quatro corpos elementares (ce). Mitocôndrias (m) e lisossomos (l) próximos ao vacúolo parasitóforo, sendo que uma delas está em íntimo contato com a membrana do vacúolo. Barra = 2 μ m.

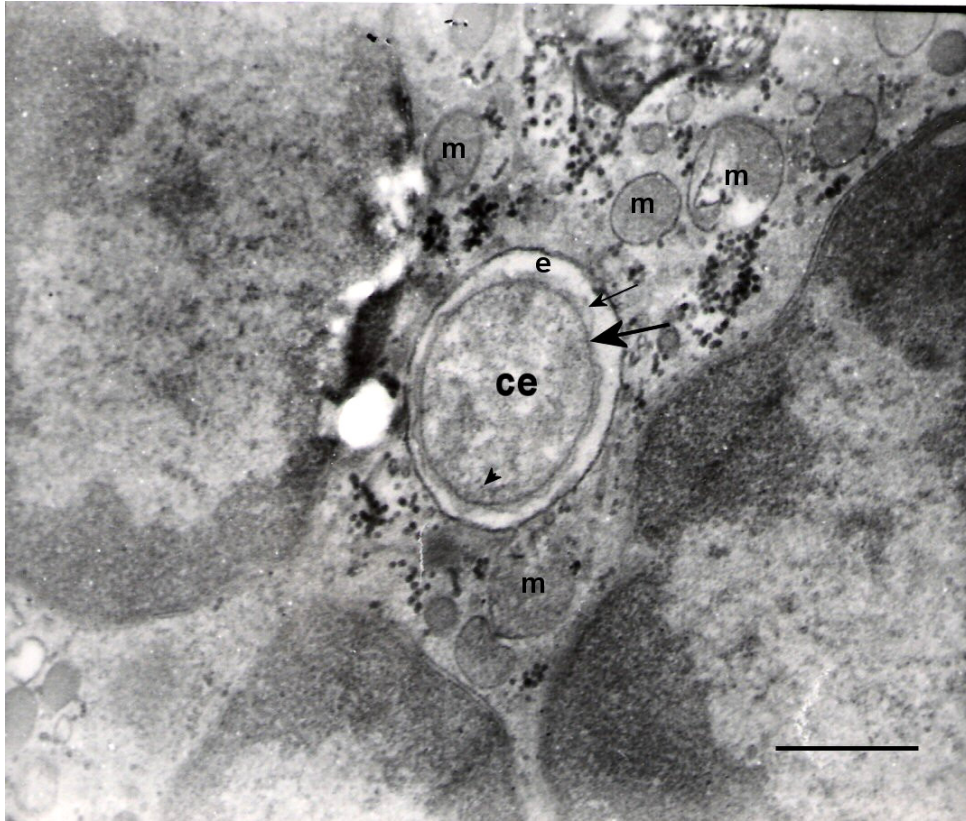


Figura 22: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Neutrófilo com mórula formada por um vacúolo parasitóforo de conteúdo eletrólucido (e), constituído por uma única membrana, com mitocôndrias (m) adjacentes, contendo um corpo elementar (ce), levemente elíptico formado por duas membranas; externa pregueada (seta pequena) e interna lisa (seta grande), material granular fino e ribossomas (cabeça de seta). Barra = 2 μ m

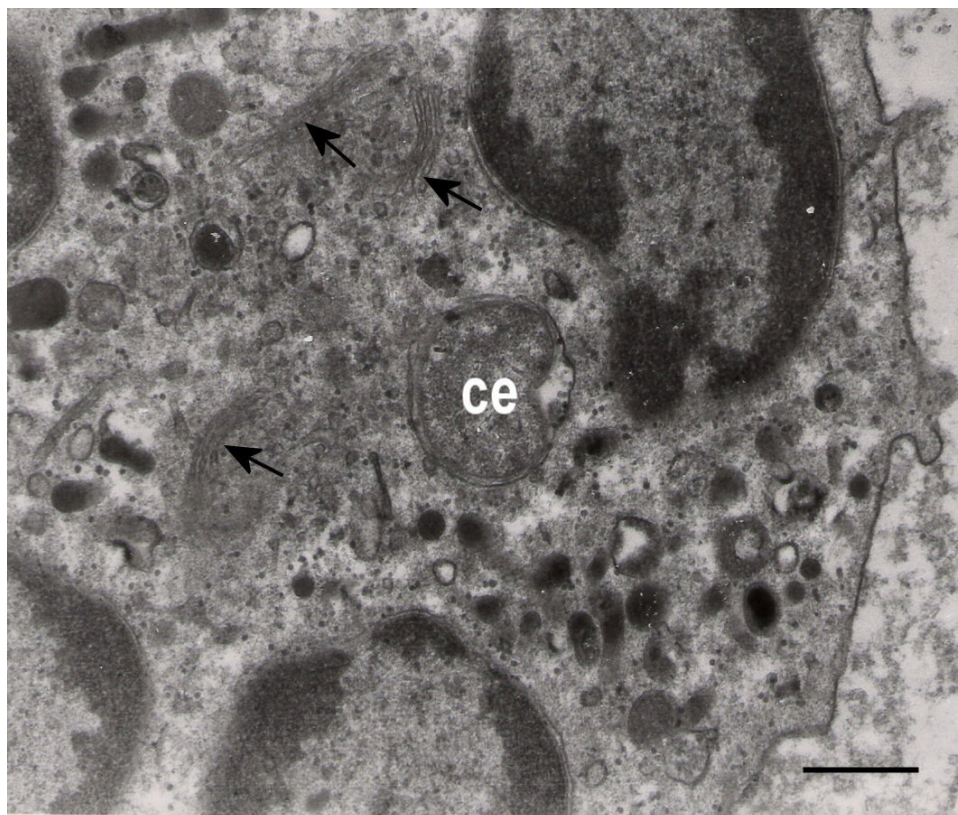


Figura 23: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Mórula com erliquia (corpo elementar) (ce) de *Ehrlichia* spp. em forma de rim. Notar a identificação do complexo de golgi (setas). Barra = 2 μ m.

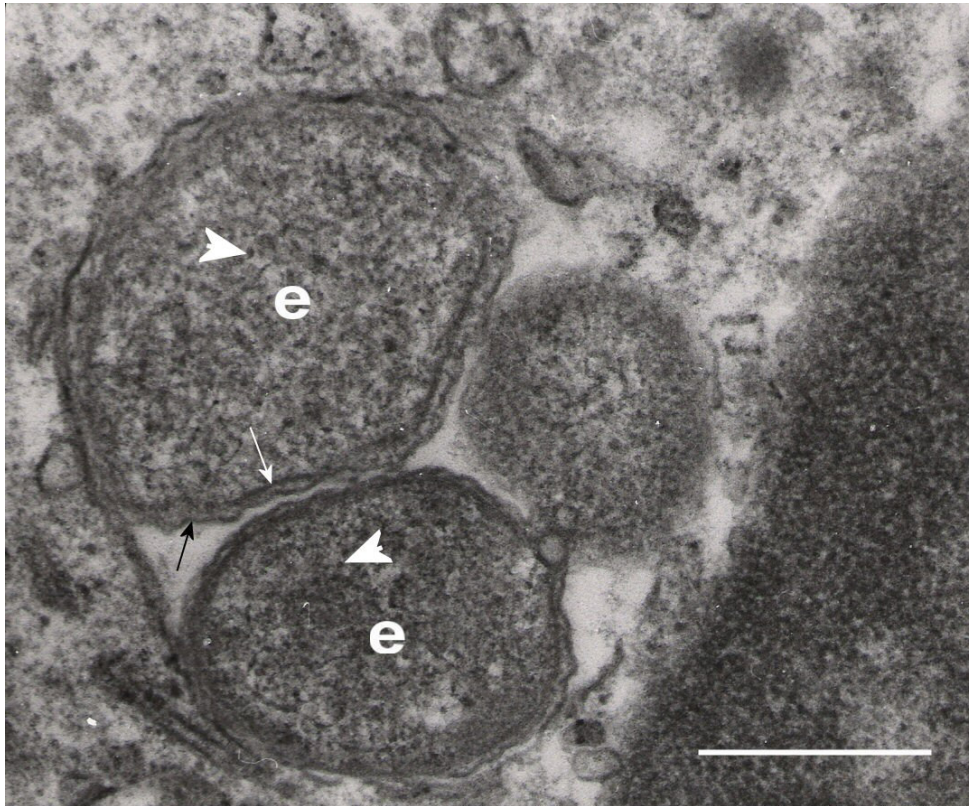


Figura 24: Eletromicrografia de capa leucocitária de sangue de cão com diagnóstico citológico de erliquiose. Mórula de *Ehrlichia* spp. contendo erlíquias levemente elípticas (e) formadas por duas membranas, externa pregueada (seta preta) e interna lisa (seta branca), material granular fino e ribossomas (cabeça de seta). Barra = 2 µm.

IV.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS ÓRGÃOS

A despeito da terapia instituída, alguns animais vieram a óbito por erliquiose. Apesar disso, de maneira geral o tecido dos órgãos preparados para observação em TEM apresentaram sinais iniciais de autólise instalada, dificultando sua avaliação detalhada. No entanto, foi freqüente a observação de macrófagos com grandes vacúolos repletos de erliquias. A ultraestrutura das erliquias em macrófagos e monócitos alveolares foi idêntica à da capa leucocitária, diferindo apenas no número de erliquias por mórula. No tecido pulmonar foi possível a identificação de aproximadamente 23 organismos em uma única mórula (Figuras 25-27).

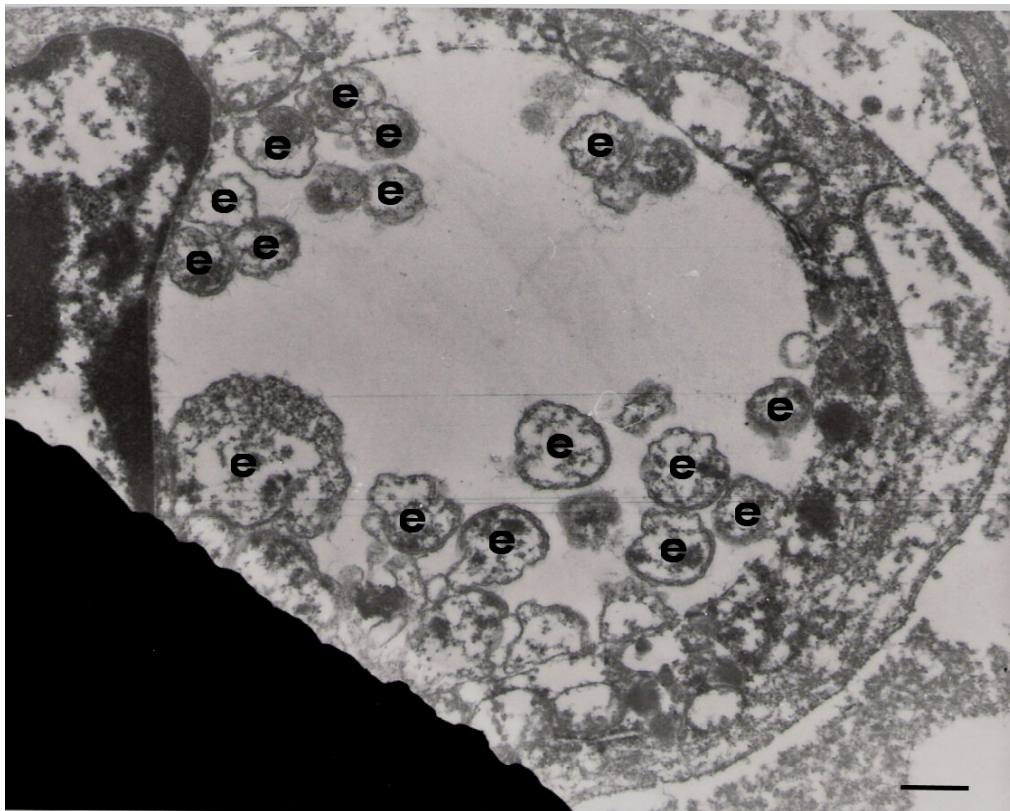


Figura 25: Eletromicrografia de tecido pulmonar de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose canina. Macrófago alveolar apresentando mórula de *Ehrlichia* spp. contendo várias erliquias (e). Barra = 2 μ m.

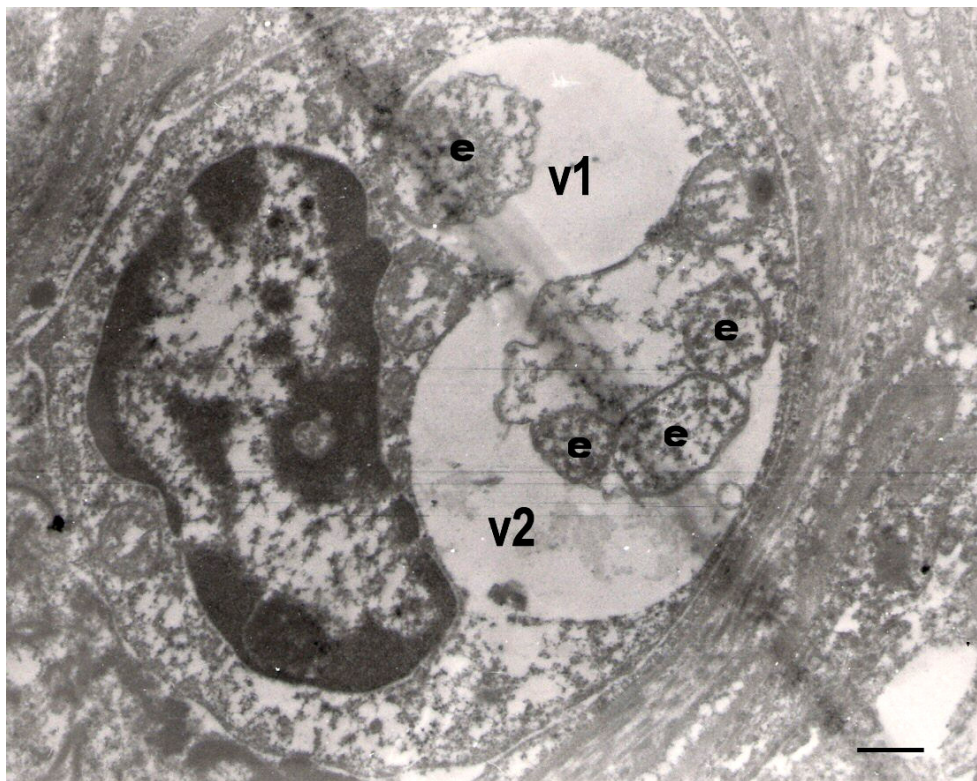


Figura 26: Eletromicrografia de tecido pulmonar de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose canina. Monócito apresentando dois vacúolos com *Ehrlichia* spp. (v1 e v2) e corpos elementares (e). Barra = 2 μ m.

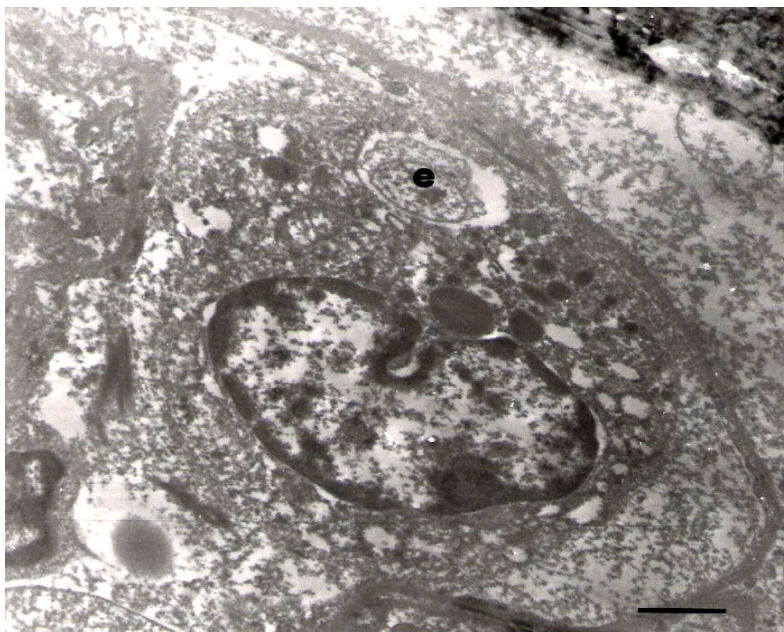


Figura 27: Eletromicrografia de tecido pulmonar de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose canina. Monócito apresentando um corpo elementar de *Ehrlichia* spp. (e). Barra = 2 μ m.

IV.5. HISTOPATOLOGIA DOS ÓRGÃOS

Apesar de freqüentemente serem observadas regiões indicativas de autólise nos órgãos parenquimatosos, foi possível a avaliação histopatológica.

IV.5.1. FÍGADO

A análise histológica do fígado mostrou áreas focais de necrose coagulativa localizadas principalmente na região central de lóbulos, associada à infiltrado neutrofílico e plasmocitário. Nos espaços porta havia infiltrado plasmocitário “moderado”, frequentemente associado a macrófagos contendo hemossiderina (Figuras 30 e 31).

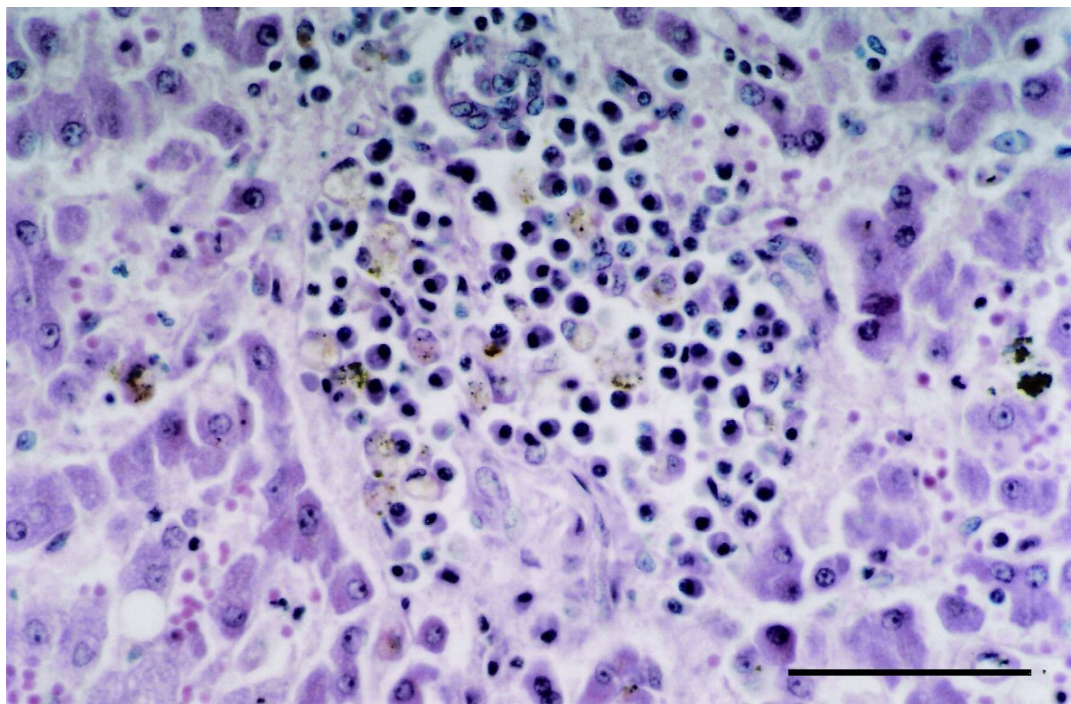


Figura 28: Fotomicrografia de corte histológico de fígado de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Espaço porta com infiltrado plasmocitário. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 70 µm.

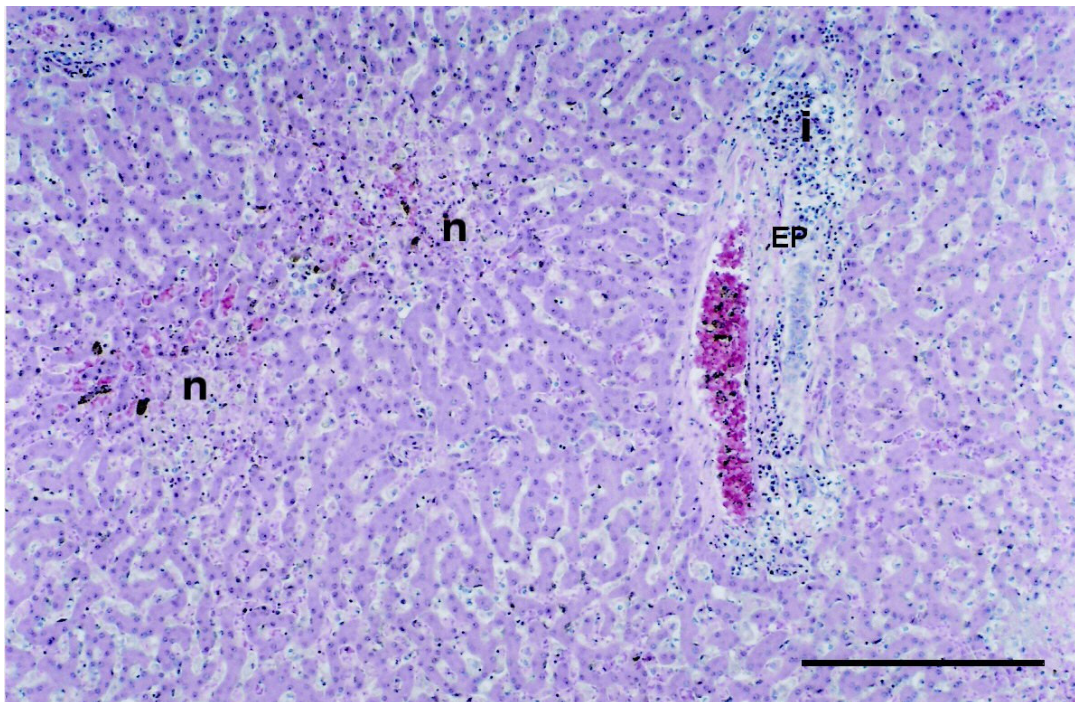


Figura 29: Fotomicrografia de corte histológico de fígado de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Espaço porta (EP) com infiltrado mononuclear (i) e áreas focais de necrose (n). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 280 μ m.

IV.5.2. RIM

A análise histológica do rim mostrou infiltrado plasmocitário cortical de intensidade moderada, especialmente periglomerular, e difuso no interstício medular, muitas vezes acentuado (Figuras 30 e 31).

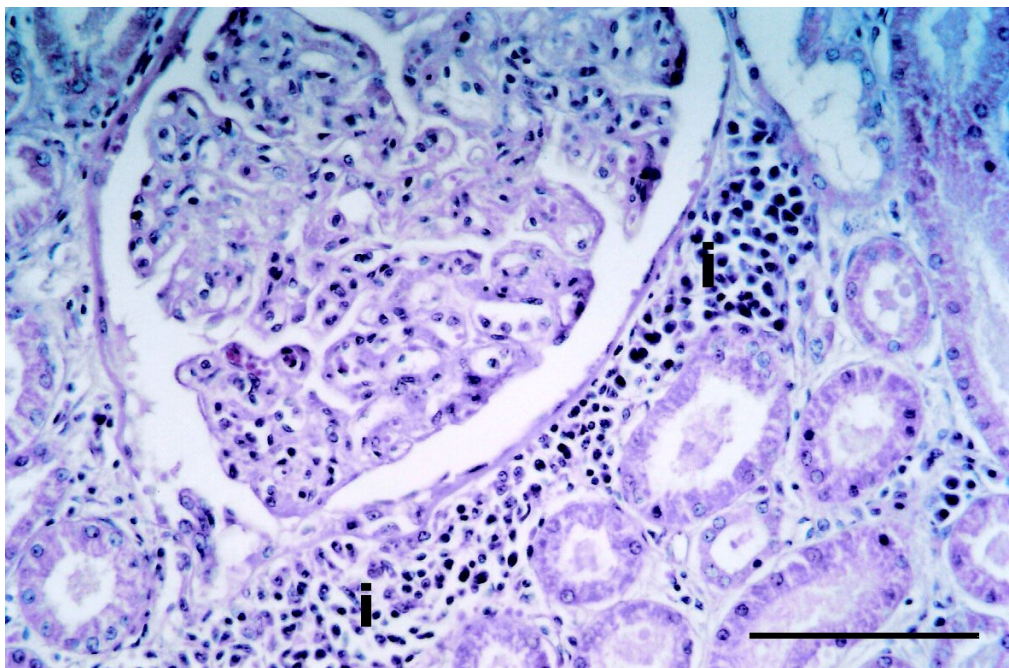


Figura 30: Fotomicrografia de corte histológico de rim de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Observar infiltrado plasmocitário (i) na córtex. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 110 μ m.

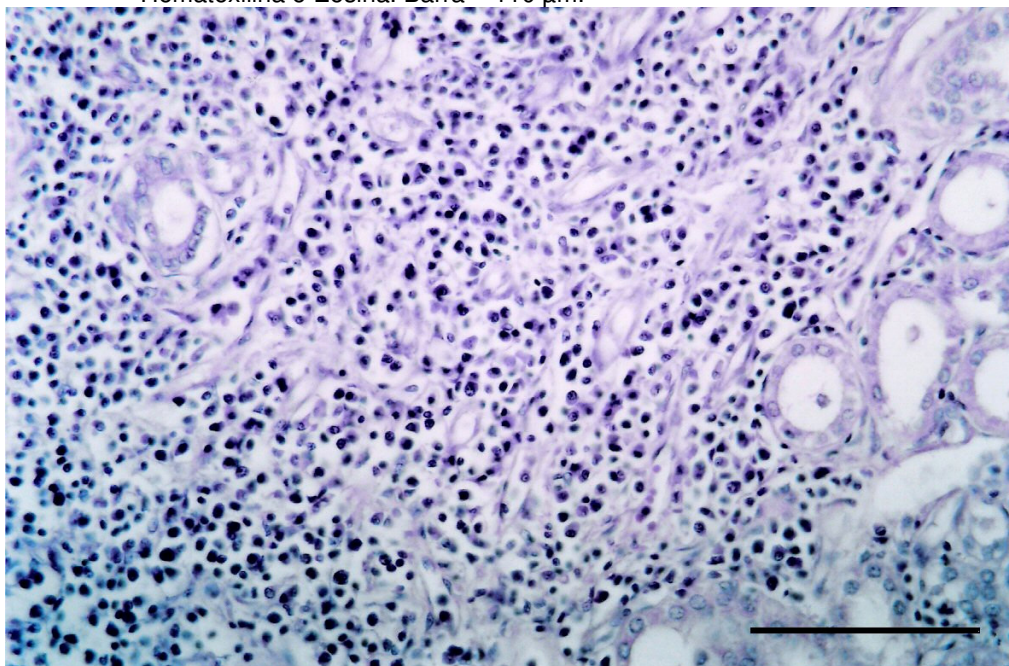


Figura 31: Fotomicrografia de corte histológico de rim de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Observar infiltrado plasmocitário difuso na medula. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: Barra = 110 μ m.

IV.5.3. PULMÃO

Este órgão apresentou espessamento das paredes septais com infiltrado de linfócitos e plasmócitos. Presença no interior dos alvéolos de macrófagos, apresentando aparentemente grandes vacúolos (regiões citoplasmáticas claras). Presença de conteúdo acidófilo amorfo dentro dos alvéolos (edema) onde também identificou-se vários macrófagos com grandes vacúolos. Também foram observados macrófagos no parênquima pulmonar (Figuras 32 e 33).

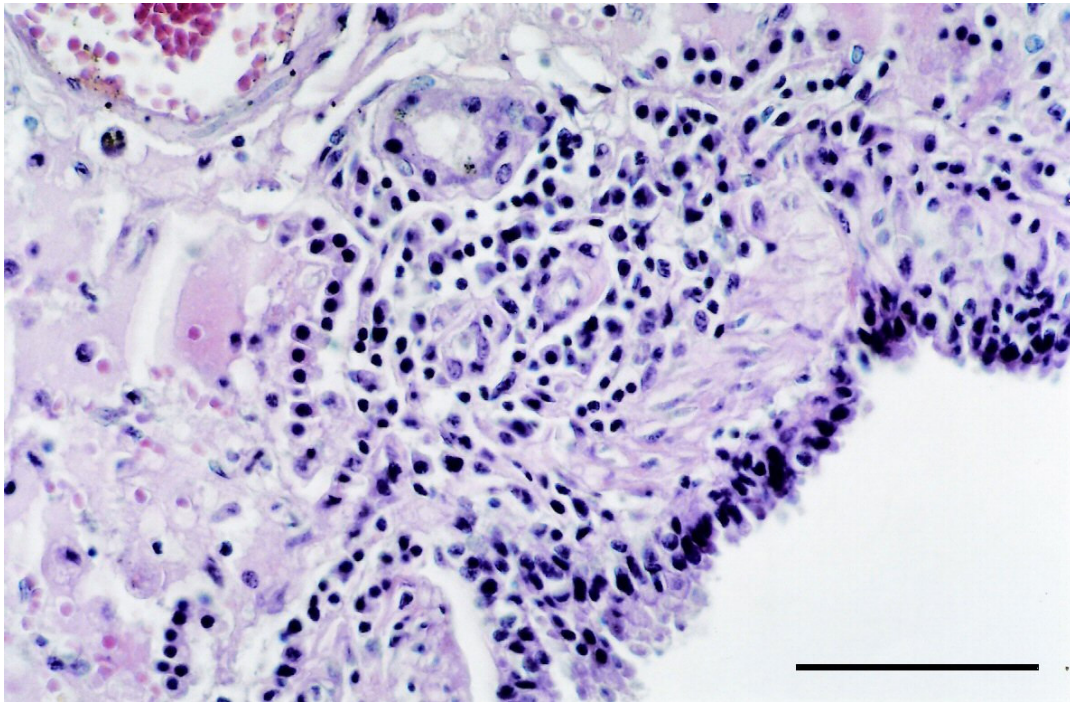


Figura 32: Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Observar infiltrado de linfócitos e plasmócitos (i). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: Barra = 70 µm.

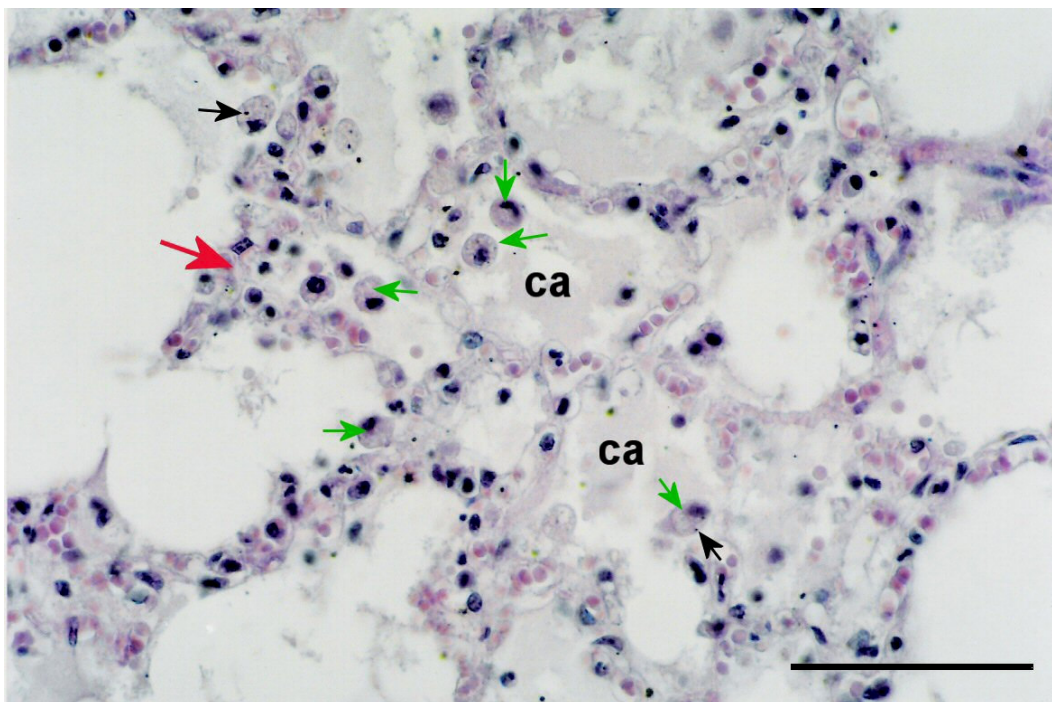


Figura 33: Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Observar espessamento das paredes septais (seta vermelha). Presença de conteúdo acidófilo amorfo (ca) no lúmen dos alvéolos caracterizando edema e na mesma região observou-se a presença de vários macrófagos (setas verdes) com grandes vacúolos. Notar a presença de inclusões intracitoplasmáticas em macrófagos alveolares (seta preta). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 70 µm.

IV.5.4. MEDULA ÓSSEA

Os dois animais apresentaram as mesmas alterações histopatológicas na medula óssea, porém com diferentes intensidades, as quais foram predominância de macrófagos, diminuição da linhagem eritrocítica e megacariocítica (predomínio da linhagem de leucócitos) e linfócitos e precursores de vários tamanhos e formas (Figuras 34 e 35).

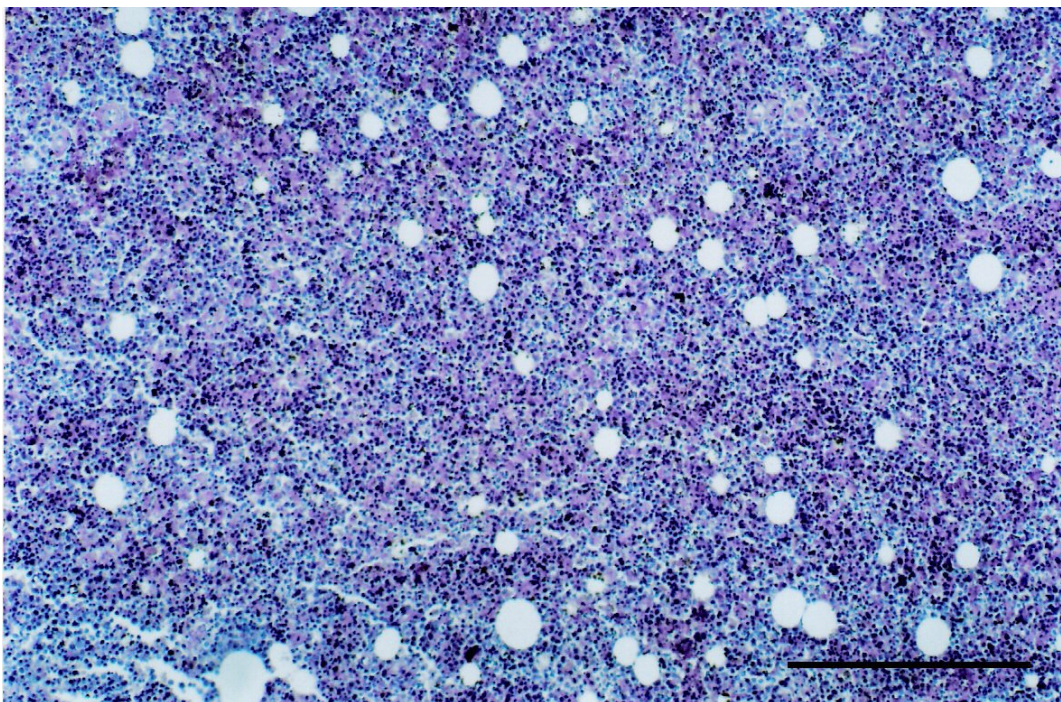


Figura 34: Fotomicrografia de corte histológico de medula óssea de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Diminuição da linhagem megacariocítica (predomínio da linhagem de leucócitos). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 280 μ m.

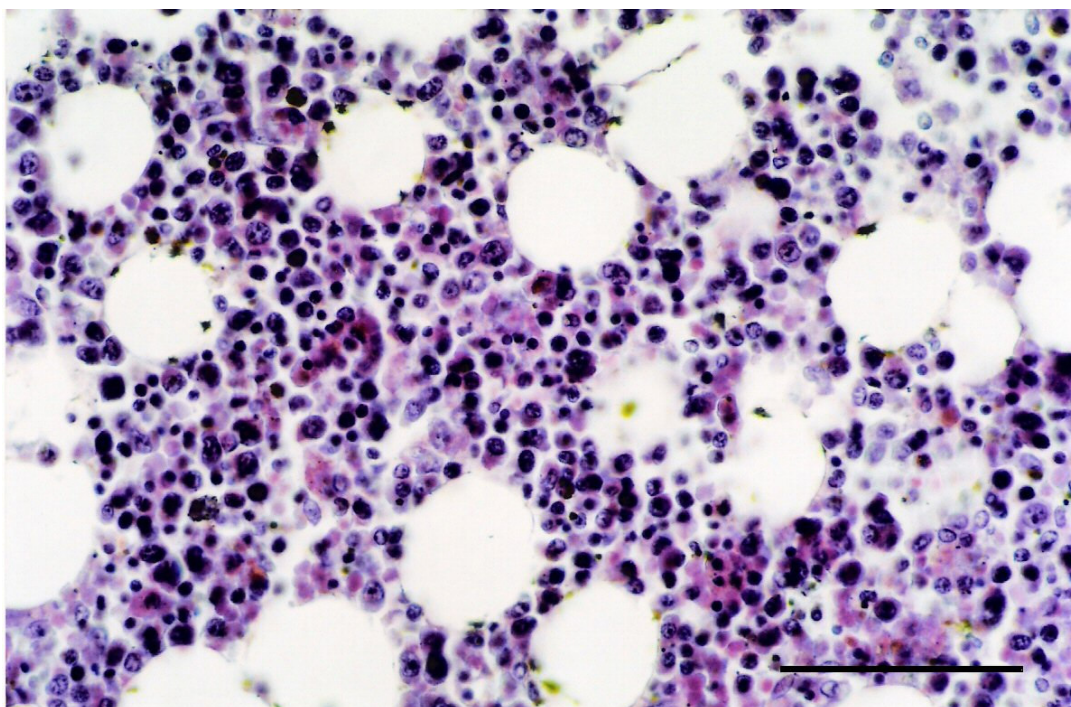


Figura 35: Fotomicrografia de corte histológico de medula óssea de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Predominância de macrófagos, diminuição da linhagem eritrocítica e megacariocítica (predomínio da linhagem de leucócitos) e predominância da linhagem blástica. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 70 μ m.

IV.5.5. LINFONODO

Na avaliação histopatológica dos linfonodos observou-se folículos linfóides corticais com rarefação da celularidade do centro germinativo, linfocitopoese reduzida com diminuição de linfócitos e seus precursores e aumento da quantidade de plasmócitos e polimorfonucleares (Figuras 36 e 37).

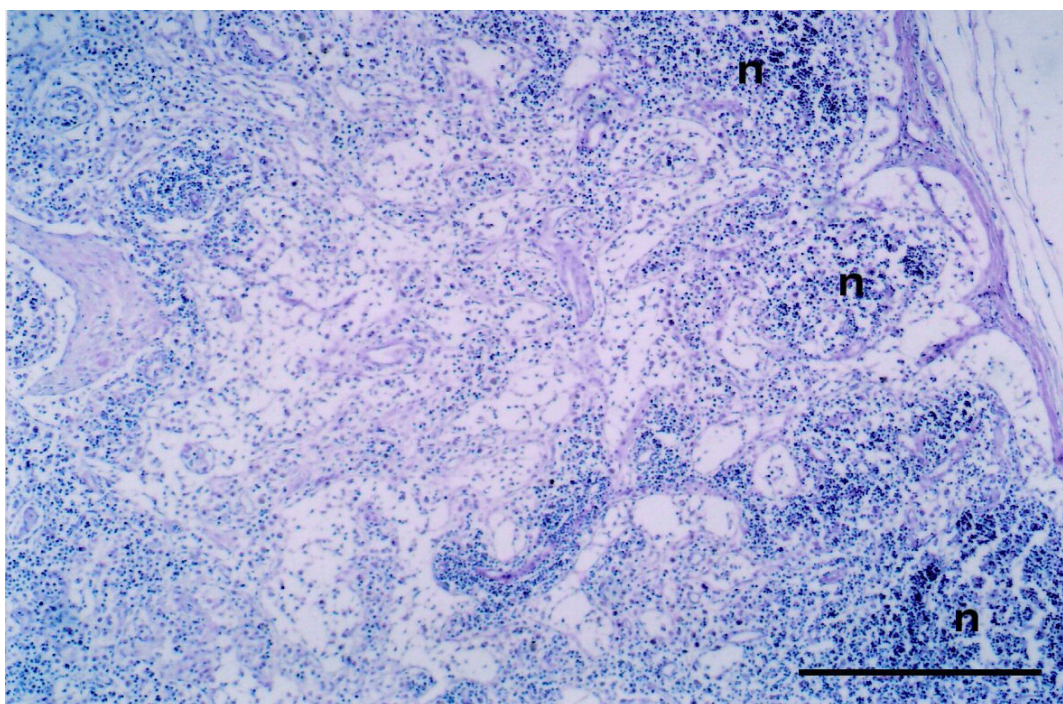


Figura 36: Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose. Notar folículos corticais (n) com rarefação de células do centro germinativo, linfocitopoese reduzida com diminuição de linfócitos e seus precursores. Coloração: Hematxilina e Eosina. Aumento: Barra = 430 µm.

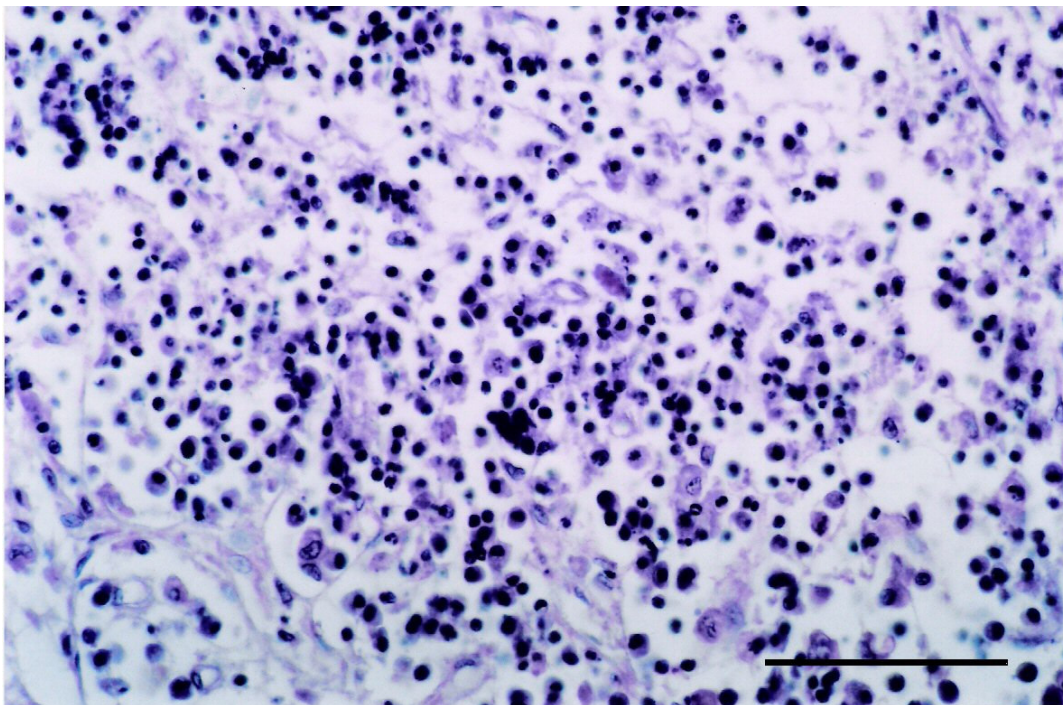


Figura 37: Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose canina. Notar linfocitopoeese reduzida com diminuição de linfócitos e seus precursores e aumento da quantidade de plasmócitos e polimorfonucleares. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: Barra = 70 μ m.

IV.5.6. BAÇO

Histologicamente observou-se aparente hiperplasia do folículo e cordões esplênicos, porém apresentando nesta região grande quantidade de plasmócitos e relativamente poucos linfócitos e macrófagos (Figura 38).

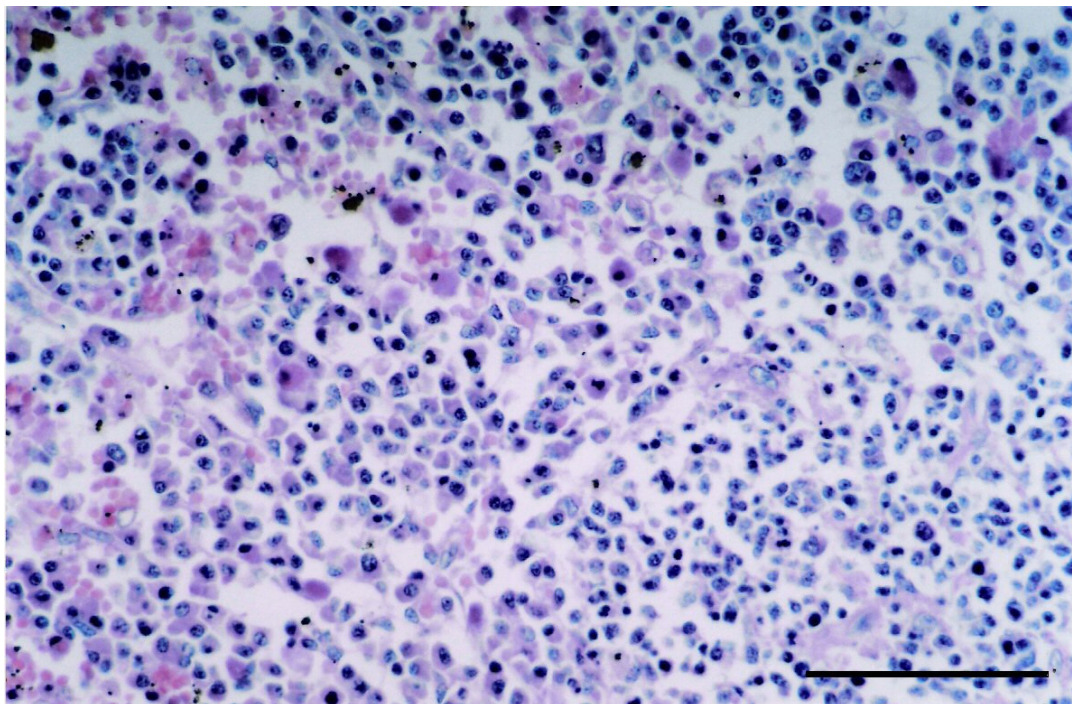


Figura 38: Fotomicrografia de corte histológico de baço de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose canina. Folículo e cordões esplênicos apresentando grande quantidade de plasmócitos e relativamente poucos linfócitos. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: Barra = 70 μ m.

IV.5.7. CORAÇÃO

Os cortes histológicos de coração mostraram infiltrados linfocitários e de polimorfonucleares disseminados no endocárdio, miocárdio (Figura 39) e epicárdio.

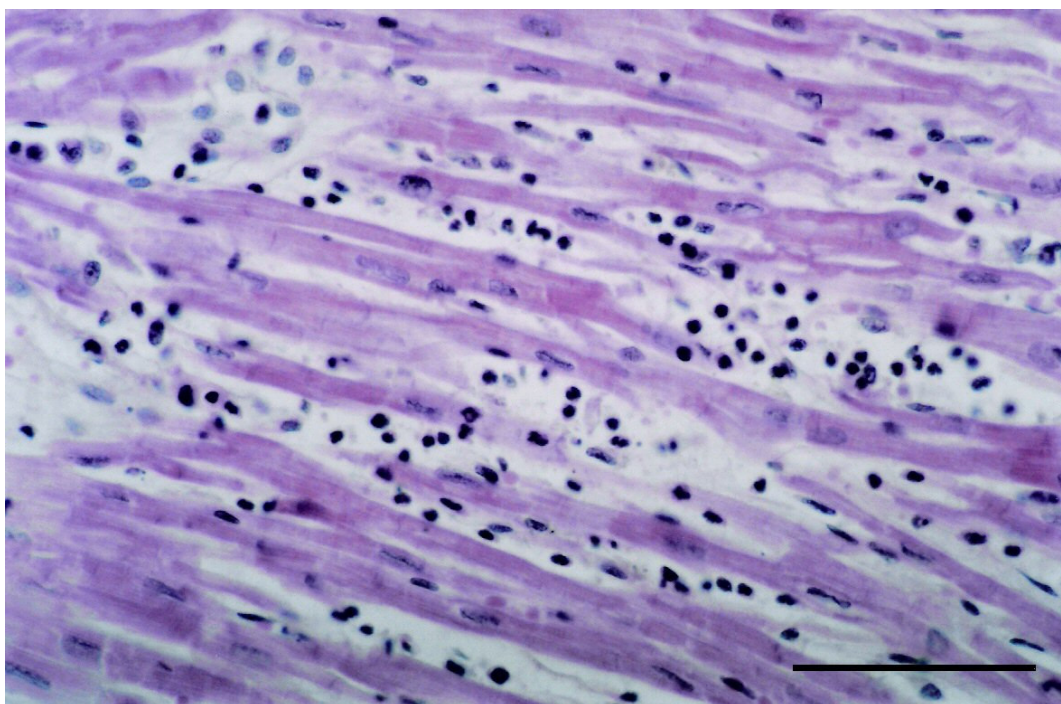


Figura 39: Fotomicrografia de corte histológico de coração de cão com diagnóstico citológico e molecular de erliquiose canina. Observar infiltrado linfocitário e de polimorfonucleares em miocárdio. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 70 μ m.

V. DISCUSSÃO

Considerando que em 23% das amostras de sangue periférico avaliadas por dois examinadores ocorreu discrepância de resultados, fica claro que este método diagnóstico é subjetivo e depende da experiência do examinador. Segundo Moraes et al. (2004) a pesquisa de parasitas em esfregaços sanguíneos corados possui baixa sensibilidade, sendo negativa na maioria dos casos de erliquiose. Mylonakis et al. (2003) descreveram grandes diferenças de sensibilidade na citologia de sangue periférico entre vários investigadores, com valores variando de porcentagens tão baixas quanto 0% até tão altas como

84%, associado a uma baixa sensibilidade (8%) demonstrada em estudos por eles realizados, têm os desencorajado a usar esta técnica no diagnóstico de EMC aguda. Segundo Macieira (2003), Mutani e Kaminjolo (2001) e Iqbal et al. (1994a), a detecção dos parasitos costuma ocorrer somente na fase aguda da infecção, com poucas células infectadas, é laborioso e requer muito tempo e paciência do profissional que estiver analisando o esfregaço sanguíneo, tendo assim uma baixa sensibilidade e grande ocorrência de falsos negativos. Para Neitz e Thomaz (1938) e Almosny (2002) é importante distinguir *E. canis* de outros protozoários e estruturas em esfregaços sanguíneos como babesias fagocitadas, aglomerados de plaquetas sanguíneas, depósitos de corantes e artefatos superpostos nos leucócitos, o que poderia ocasionar falsos positivos. Da mesma forma, Mylonakis et al. (2003) comparando métodos diagnósticos de citologia para o diagnóstico de erliquiose canina descreveram que para esquivar-se de diagnósticos falso positivos, plaquetas, grânulos azurofílicos linfocíticos, corpos linfoglandulares e material nuclear fagocitado deveriam ser diferenciados da mórula. Mesmo assim, a detecção dos parasitos em esfregaços sanguíneos é um método que não requer equipamentos sofisticados, necessitando-se apenas de um microscópio óptico para a leitura dos esfregaços. E ainda, Elias, (1991) concluiu que este método é apropriado para clínicas veterinárias, as quais não têm laboratórios sofisticados a sua disposição.

Comparando os resultados obtidos com as extensões de sangue periférico, sangue venoso e leucoconcentração, observa-se no presente trabalho que o primeiro método apresentou maior sensibilidade, detectando maior número de animais positivos. Huxsoll (1976), Andereg e Passos (1999) e Elias (1991) relataram que no diagnóstico de EMC por esfregaços sanguíneos recomenda-se o uso de sangue de capilares da orelha externa do cão (sangue periférico). Este procedimento foi também indicado por Neitz e Thomaz (1938) onde descreveram que para a confecção dos esfregaços sanguíneos é importante que eles sejam realizados com a primeira gota de sangue que exsuda de um ponto de punção ou corte na orelha externa (sangue periférico), pois nesta muitos leucócitos estão presentes em comparação com as posteriores. Segundo Macieira (2003) esse procedimento foi confirmado por Almosny (1998), que em avaliação experimental observou maior número de

leucócitos mononucleares em relação às gotas seguintes e o número de mórulas foi maior nos esfregaços sanguíneos efetuados com a primeira gota. Este procedimento (ou conduta semelhante) é adotado na preparação das extensões sanguíneas no Hovet-UFU, onde é aspirada uma pequena quantidade de sangue em uma parte do tubo de micro-hematócrito que então é transferida para uma lâmina de vidro e feita a extensão sanguínea.

Interessantemente, em um trabalho desenvolvido por Simpson (1974), estudando a ligação de células mononucleares infectadas com *E. canis* em vasos sanguíneos de pulmão por meio de TEM, observou-se que os leucócitos contendo mórulas estavam aderidos a um ou mais pontos na superfície das células endoteliais de capilares ou arteríolas por meio de interdigitações ou pequenas áreas de adesão. Nós suspeitamos que além da maior quantidade de leucócitos em capilares sanguíneos, os da margem da orelha possam ser locais onde ocorram mecanismos semelhantes de aderência e conseqüentemente permanência de leucócitos infectados aos descritos por Simpson e desta maneira, facilitar ainda mais a detecção das células infectadas nesses órgãos.

Entretanto, Huxsoll (1976) mencionou que esfregaços de capa leucocitária são muito úteis no diagnóstico de EMC uma vez que aumentam a concentração de células sanguíneas brancas e elevam ainda mais a chance para serem detectadas as células infectadas. Porém, Almosny (1998) descreveu que a mórula é dificilmente observada no esfregaço sanguíneo porque o parasita está presente em pequeno número e a proporção de células infectadas pode ser inferior a 1%. Logo, a observação de mórulas em leucócitos circulantes é rara, exceto durante a fase aguda da doença, que se inicia entre 14 a 20 dias após a infecção e termina em aproximadamente um mês depois, razão pela qual seria indicado a primeira gota de capilares da margem da orelha externa (sangue periférico). É oportuno observar que apesar de ocorrer leucoconcentração na capa leucocitária, o sangue utilizado é venoso e não periférico; fato que justificaria nossos resultados. Contudo, Mylonakis et al. (2003) ao compararem a sensibilidade do diagnóstico entre as técnicas de citologia (coloração por Giemsa) de papa de leucócitos, sangue periférico, linfonodos, medula óssea e cultivo celular de curta duração para a detecção de mórulas de *E. canis* em cinquenta cães com a doença aguda, verificaram que a

maior sensibilidade foi alcançada depois da avaliação de 1000 campos em imersão nos esfregaços de capa leucocitária (66%) e em aspirados de linfonodos. Santarém (2003) também descreveu que a técnica de leucoconcentração apresentou maior sensibilidade em relação às demais empregadas para pesquisa de mórulas de *E. canis*. Descreveu que as mórulas foram detectadas em 73,33% (44/60), 26,67% (16/60) e 13,33% (8/60) extensões, quando utilizadas as técnicas de leuconcentração, esfregaço de margem de orelha e venopunção jugular, respectivamente.

Moreira et al. (2003) realizaram um estudo retrospectivo (1998-2001) sobre a casuística clínica de erliquiose em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais e constataram que a maioria das infecções foi detectada em monócitos, igualmente ao que foi observado no presente trabalho. Entretanto é interessante ressaltar que algumas extensões de sangue periférico apresentaram mórulas somente em neutrófilos, o que também ocorreu nas observações em TEM, particularmente nos positivos para *E. canis* pela nPCR. Este fato nos leva a supor que provavelmente exista na região de Uberlândia uma cepa neutrofílica ou uma variante de *E. canis*, diferentemente da maioria descrita até o momento pela literatura, que refere a predominância monocítica ou linfocítica, como relatado por Mylonakis et al. (2003), Elias (1991), Anderreg e Passos (1999), Keysary et al. (1996) e Bounous et al. (1992).

É importante salientar que Neitz e Thomaz (1938), Almosny (1998) e Simpson (1974) descreveram a presença de *E. canis* em neutrófilos e ainda, como mencionado por Almosny (1998), Anderreg e Passos (1999) às vezes a mórula de *E. canis* pode ocorrer em monócitos, neutrófilos, linfócitos ou eosinófilos, dependendo da cepa infectante. Além disso, como descrito por Macieira (2003) e Murphy et al. (1998), as seguintes espécies do gênero *Ehrlichia* também já foram descritas como causadoras de infecções naturais em cães; *E. ewingii*, *E. phagocytophila*, *E. equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana (estas últimas três atualmente denominadas *Anaplasma phagocytophilum*), para as quais não foi realizada nPCR no presente trabalho. Estas riquetsias parasitam granulócitos e podem infectar os neutrófilos caninos. A observação de resultados positivos de nPCR no presente trabalho para *Ehrlichia* ssp. e negativo para *E. canis* e *A. platys*, endossa a suposição de que possam existir outras espécies de erliquias infectando cães em Uberlândia.

Mas essas bactérias ainda não foram identificadas por técnicas moleculares como agentes etiológicos de doença em cães no Brasil, como descrito Machado (2004) e Labruna et al. (2007).

Recentes relatos têm caracterizado a expressão de genes da família *bcl-2* em neutrófilos humanos, mostrando que essas células expressam dois genes anti-apoptóticos; *bfl-1* e *mcl-1* (GE et al. 2005). AKGUL et al. (2001) descreveram que neutrófilos tipicamente sofrem apoptose 6-12 horas depois de serem liberados da medula óssea. RIKIHISA (2006) referiu que apoptose é um importante mecanismo para destruir patógenos intracelulares e que as células hospedeiras induzem apoptose na presença de vários patógenos, porém, somente alguns deles são conhecidos por inibi-la. Mencionou também que *A. phagocytophilum* inibe essa apoptose espontânea de neutrófilos humanos, permitindo tempo suficiente para a bactéria (mais de 24 horas pós-infecção) se desenvolver em microcolônias intracelulares (mórulas) reduzindo o mRNA de membros da família *bcl-2* anti-apoptóticas. GE et al. (2005) observaram que a inibição da apoptose de neutrófilos desempenha um papel central na Anaplasmoose Granulocítica Humana, pois os níveis de mRNA de *bfl-1* em neutrófilos infectados em cultura, permaneceram altos, enquanto foram reduzidos em neutrófilos não infectados. Os resultados descritos por estes pesquisadores sugerem que *A. phagocytophilum* inibe a apoptose de neutrófilo humanos via *bfl-1*. Estes autores relataram também que *A. phagocytophilum* em ovelhas reduziu a apoptose de neutrófilos sanguíneos periféricos. Foi interessante o fato de que a provável cepa encontrada tenha sido evidenciada parasitando granulócitos (neutrófilos), visto que o tempo de desenvolvimento de *E. canis* é maior que o tempo de permanência desta célula na corrente sanguínea. Nós hipotetizamos que mecanismos semelhantes a *A. phagocytophilum* podem ter sido desenvolvidos por esta provável cepa neutrofílica de *E. canis*, ou mesmo ser outra espécie de erliquia ainda não diagnosticada, como acima mencionado, em infecção dupla com *E. canis*.

No presente trabalho 82% das amostras possuindo mórulas foram positivas para a nPCR. Esta observação poderia indicar uma menor sensibilidade deste método diagnóstico, porém, devido à alta subjetividade da avaliação de extensões sanguíneas, como já discutido anteriormente, é mais

provável que o diagnóstico realizado pela observação de mórulas tenha apresentado falsos positivo e negativo.

Iqbal et al. (1994) comparando a PCR com reisolamento e cultura celular, IFI e WI para o diagnóstico de EMC em cães experimentalmente infectados, verificaram que IFI e WI detectaram anticorpos entre o 2º e o 8º dias pós inoculação. Reisolamento e cultura mostraram ser o mais sensível e definitivo método para o diagnóstico precoce da doença, entretanto não é um método muito conveniente, em função do tempo (14 a 34 dias) para mostrar-se positivo. Estes autores concluíram que a sensibilidade da PCR é similar ou levemente menor que de outros métodos estabelecidos, porém sua conveniência, rapidez e natureza direta de detecção de DNA de *E. canis* fazem a PCR útil para o diagnóstico clínico. Wen et al. (1997), descreveram que nPCR é altamente sensível e específica para a detecção de *E. canis*. Para Shaw et al. (2001) testes sorológicos são limitados por reduzirem a habilidade de identificar infecção aguda, dificuldade em diferenciar infecção atual de anterior ou títulos vacinais além de reação cruzada entre espécies. Semelhantemente ao trabalho aqui descrito, Mylonakis et al. (2005) realizaram nPCR como um dos métodos diagnósticos para *E. canis* em 69 animais suspeitos de EMC, em aspirados de medula óssea. Os autores também aplicaram os testes IFI, ELISA, esfregaços de capa leucocitária, linfonodos, sangue e “imprint” de pulmão corados por Giemsa. Todos os animais foram positivos para anticorpos anti-*E. canis* pela técnica de IFI, a amplificação do DNA erliquial foi obtida em sessenta e três do total de animais (91,3%), enquanto que mórulas de *E. canis* foram observadas em 40 (69, 58%) animais. ELISA apontou que quarenta e cinco (65,2%) animais apresentaram anticorpos anti-*E. canis*. Segundo McBride et al. (1996) a PCR é o método de escolha para o diagnóstico de erliquiose canina, uma vez que o agente pode ser detectado antes mesmo da formação de mórulas ou da soroconversão, o que poderia ter sido um dos eventos ocorridos no trabalho de Mylonakis e colaboradores para justificar a baixa sensibilidade apresentada pela detecção de mórulas. Pelo exposto anteriormente e devido à subjetividade das técnicas citológicas (extensões sanguíneas) consideramos no presente estudo que a nPCR foi o método diagnóstico que apresentou menor subjetividade.

Quando se considerou somente as amostras com granulações atípicas e ausentes de mórulas, apenas 41,5% foram positivas utilizando-se nPCR, demonstrando que a relação entre granulações atípicas e a erliquiose não é absoluta, não devendo necessariamente ser sua presença utilizada como indicativo da doença. Isto é ainda mais justificável, se considerarmos que embora na extensão sanguínea não tivesse evidência de mórulas, a amostra poderia conter o DNA erliquial. A identificação de mórulas de *E. canis* em neutrófilos no presente trabalho comprovou a possibilidade de existirem erliquias que se desenvolvem nesses granulócitos na região de Uberlândia, células essas que naturalmente apresentam granulações utilizadas na destruição de microorganismos.

Os exames por PCR também demonstraram a existência de *A. platys* na região de Uberlândia, geralmente em infecção dupla com *E. canis*, semelhante ao descrito por Shaw et al. (2001) e Machado (2006), que afirmam poder ocorrer coinfeção em cães com combinações de espécies de *Ehrlichia* e outros hemoparasitos, provavelmente por possuírem o mesmo vetor.

Dos 56 animais incluídos no experimento, cinco extensões (9%) apresentaram mórulas em plaquetas, sugestivas de infecção por *A. platys*. e destas 9%, somente uma amplificou DNA deste agente pela nPCR. No entanto das 56 amostras totais, seis (11%) amplificaram o DNA de *A. platys*, sendo que cinco destas (83%) não apresentaram inclusões em plaquetas características de infecção por esta bactéria. Almosny (1998) relatou a presença de mórulas de *E. canis* em plaquetas no 12º dia após a inoculação e Dawson et al. (1997) relataram que mais de uma espécie de erliquia pode infectar determinada linhagem celular do hospedeiro e algumas espécies podem infectar diferentes tipos celulares. Com base no exposto acima podemos concluir que a técnica de detecção de *A. platys* utilizada para o diagnóstico desta doença no Hovet-UFU (extensões sanguíneas) apresentou, quando comparada a nPCR, uma alta porcentagem de falsos negativos. Uma outra possibilidade seria a possível infecção destas plaquetas (falsos positivos) por *E. canis* e/ou *E. spp.*, já que de seis amostras falso positivo em citologia, cinco eram positivos em nPCR para *E. canis* e/ou *E. spp.*

A presença de *B. canis vogeli* em infecções duplas ou mesmo isoladas também é uma importante constatação, assim como um caso de infecção dupla

entre *E. canis* e *Hepatozoon* spp. e outro de infecção tripla de *E. canis*, *A. platys* e *B. canis vogeli*, os quais ainda carecem de esclarecimentos quanto à transmissão, epidemiologia, patogenia e tratamento dessas coinfeções.

Outro achado interessante foi que das amostras analisadas pela reação “semi-nested PCR”, 5 (83%) produziram amplicómeros de *B. canis vogeli* dentre as 6 que apresentaram merozoítos em microscopia de luz (11%) e uma amostra apresentou-se negativa para esse teste molecular e positiva em microscopia de luz. Como foi verificado pela fotomicrografia os merozoítos das 5 que amplificaram o DNA de *B. canis vogeli* mostraram-se como grandes estruturas intraeritrocitárias, enquanto os supostos merozoítos que não amplificaram para este protozoário especificamente eram menores. Como já mencionado anteriormente, existem descrições isoladas de *B. gibsoni* baseadas em análise morfológica do parasita em esfregaços sanguíneos corados por Giemsa no estado do Rio Grande do Sul (VIDOTTO, TRAPP, 2004). E ainda, Brandão e Hagiwara (2002) relataram que a análise citológica do esfregaço sanguíneo é imprescindível, pois permite a diferenciação morfológica entre *B. canis* ssp., com cerca de 2 a 5 µm, geralmente aos pares, e *B. gibsoni*, medindo 1 a 3 µm; essa diferenciação seria necessária porque há reação sorológica cruzada entre as duas espécies. Baseado no que foi relatado, nós sugerimos que talvez a reação negativa da amostra que apresentou o “pequeno piroplasma” em microscopia de luz possa na verdade ser outra babesia para a qual não tenha sido feita a PCR, mais possivelmente *B. gibsoni*, ou mesmo ser um artefato sobreposto na hemácia.

Harvey et al. (1978) utilizando TEM confirmaram que inclusões plaquetárias encontradas dentro de vacúolos revestidos por membranas (mórulas) eram riquetsias e Mathew et al. (1997) descreveram que TEM pode ser usada para o estudo das características dessas bactérias e para determinar se os microorganismos observados no esfregaço de sangue periférico são verdadeiramente *E. platys*. Observamos no presente trabalho que Microscopia eletrônica de transmissão é uma importante ferramenta para estudos da patogenia da infecção por estas bactérias e também da morfologia ultra-estrutural.

As erliquias foram vistas como estruturas levemente elípticas, esféricas ou em forma de rim, possuindo duas membranas, sendo que a membrana

interna apresentava-se lisa e a externa ondulada, o que está de acordo com o relatado por Keysary et al. (1996), Popov et al. (1998) e Arraga-Alvarado et al. (2003) e no seu interior foi observado material granular fino e eventualmente alguns grânulos mais eletrondensos e maiores, como já havia sido descrito por Simpson (1972).

A presença de erliquias em forma de rim ou de halteres pode ser justificada por estas estarem possivelmente em processo de divisão binária como já descrito por Hildebrandt et al. (1973), Keysary et al. (1996), Arraga-Alvarado et al. (2003), Simpson (1974) e Rikihisa (1999).

Os grânulos eletrondensos eventualmente observados no interior das erliquias sugerem ser ribossomas e já haviam sido descritos por Hildebrandt et al. (1973), Rikihisa (1991) e Popov et al. (1998). A presença de mitocôndrias próximas aos vacúolos parasitóforos que foi identificada neste trabalho, também foi relatada por Popov et al. (1998) e Arraga-Alvarado et al. (2003).

Zhang et al. (2007) observaram que *E. chaffeensis* tem um ciclo de desenvolvimento, no qual as células densamente compactadas se aderem, penetram nas células hospedeiras e se transformam em células reticuladas. Estas últimas se multiplicam por divisão binária por 48 horas e amadurecem para forma densamente compactadas em 72 horas. Assim, a típica ultra-estrutura da forma denominada reticular, (POPOV et al., 1998; MCBRIDE et al., 2007; POPOV et al., 1995; ZHANG et al., 2007) observada no presente trabalho, provavelmente são erliquias que se multiplicam, mas não são infecciosas. As formas denominadas erliquias densamente compactadas, não observadas neste trabalho, são infecciosas, mas não se multiplicam. Isto abre novas opções de estudos em relação ao desenvolvimento, mecanismos de infecção, evasão imune e sobrevivência de *E. canis*, bactérias que supostamente apresentam um ciclo de desenvolvimento semelhante ao de *E. chaffeensis*.

Castro (1997) e Andereg e Passos (1999) descreveram que mórulas de *E. canis* são mais eficientemente observadas em esfregaços de sangue periférico (coletados de capilares no pavilhão auricular) do que em esfregaços sanguíneos venosos e que elas são encontradas com maior frequência na borda franjada do esfregaço sanguíneo na fase aguda da infecção. Neste trabalho, a avaliação por TEM foi feita de capa leucocitária proveniente de

sangue venoso e observando-se as células individualmente, fato que, associado ao baixo índice de infecção do parasito justificaria a enorme dificuldade de visualização das mórulas em TEM.

Apesar da grande dificuldade de identificação de erliquias em TEM de capa leucocitária, foi relativamente fácil a demonstração da ultraestrutura erliquial em tecido pulmonar *pos mortem*, onde foi freqüente no pulmão a observação de macrófagos com grandes vacúolos repletos de erliquias em 2 animais avaliados. Este fato está de acordo com o descrito por Huxsoll (1976) e Hildebrandt (1973) ao relatarem que as mórulas podem ser encontradas facilmente em “imprint” de tecido pulmonar. Semelhantemente, Neitz e Thomaz (1938), Simpson (1974), descreveram que existe relativa dificuldade em demonstrar os organismos em extensões sanguíneas, mas é relativamente fácil encontrar as células parasitadas em “imprint” de órgãos dos animais, como identificado no presente trabalho. Neitz e Thomaz (1938) e Rikihisa (1991) descreveram também que a demonstração dos parasitos em esfregaços de órgãos, em pulmão particularmente, é comparativamente fácil em animais mortos. Ainda, Almosny (2002) descreveu que *E. canis* tem sido observada em TEM em células endoteliais pulmonares de cães experimentalmente infectados. Um fato que nos chamou a atenção foi que o animal que apresentou as erliquias no pulmão foi positivo na nPCR apenas para *E. spp.* e negativo para *E. canis* e *A. platys*.

NO pulmão em MO verificou-se a presença de vários macrófagos grandes e dilatados com estruturas intracitoplasmáticas que supostamente poderiam corresponder às mórulas observadas em TEM no citoplasma de macrófagos alveolares.

Os achados histopatológicos demonstram que os animais que vieram a óbito tiveram um comprometimento geral dos órgãos, com inflamação crônica predominantemente plasmocitária, diminuição da eritropoiese e linfocitopoiese. Rikihisa (1991), Iqbal e Rikihisa (1994b), Almosny (2002) já haviam descrito como no presente trabalho que a principal alteração observada na histopatologia dos cães acometidos por EMC, é um comprometimento geral dos órgãos, com inflamações predominantemente plasmocitárias Segundo Iqbal e Rikihisa (1994b) ao estudarem o reisolamento de *E. canis* do sangue e tecidos de cães depois do tratamento com doxiciclina, a histopatologia dos

órgãos examinados revelou marcada plasmocitose, o que lhes sugeriu que o aumento dessas células em tecidos de cães com infecção persistente por *E. canis*, poderia levar no hospedeiro, a uma reação de hipersensibilidade ou uma destruição tecidual imunologicamente mediada.

No pulmão observou-se espessamento das paredes septais com infiltrado de linfócitos e plasmócitos o que está de acordo com Andereg e Passos (1999) que descreveram que no exame histopatológico o achado mais comum é um infiltrado de células perivasculares nos tecidos do pulmão e Castro (2004) que relatou a observação de pequenos focos de infiltração celular mononuclear em septos alveolares e vasculite celular mononuclear.

No presente trabalho observou-se que nos linfonodos foram verificados nódulos corticais com depleção dos centros germinativos, linfocitopese reduzida (diminuição de linfócitos e seus precursores) e aumento da quantidade de plasmócitos e polimorfonucleares nos seios e cordões medulares. Castro (2004) descreveu que a histopatologia dos linfonodos revelou discreta hiperplasia folicular com a presença de macrófagos sanguíneos e ocasionalmente perda da delimitação da área paracortical. Além disso, moderada expansão da área paracortical e hiperplasia de cordões medulares com a presença de muitos plasmócitos e um grande número de histiócitos. Machado (2004) descreveu que na fase aguda da EMC experimental havia plasmocitose em linfonodos e segundo Andereg e Passos (1999) o achado mais comum é um infiltrado de células perivascularres no tecido linfóide.

No exame histopatológico do fígado dos cães que vieram a óbito foram observados vários espaços porta e veias centro-lobulares com infiltrado plasmocitário e menos freqüentemente com regiões de necrose. Também foram observados Infiltrados polimorfonucleares (necrose) e mononucleares não plasmocitário. Andereg e Passos (1999) observaram neste órgão necrose centro-lobular, principalmente na fase aguda, e um infiltrado celular no sistema porta. Castro (2004) descreveu que severa esteatose, leve a moderado infiltrado celular mononuclear perivascular e periportal e congestão de sinusóides foram evidentes no fígado. No presente trabalho não foi observada esteatose.

Em um dos animais a medula óssea apresentava-se pouco alterada, entretanto no outro ela apresentou alta concentração de macrófagos, diminuição da linhagem eritrocítica e megacariocítica (predomínio da linhagem de leucócitos) e pleomorfismo de linfócitos e precursores. Almosny (2002) descreveu como alterações em medula óssea de cães acometidos por EMC, uma redução da população celular da medula óssea. Segundo essa autora a medula óssea está hiperplásica na fase aguda e torna-se hipoplásica na crônica, e em casos crônicos à avaliação da medula óssea revelou pancitopenia, pronunciada hipoplasia eritróide, depleção de megacariócitos e precursores granulocíticos e ocasionalmente perda da arquitetura sinusoidal.

No baço observou-se aparente hiperplasia dos folículos e cordões esplênicos, apresentando grande quantidade de plasmócitos e relativamente poucos linfócitos. Castro (2004) descreveu marcada hiperplasia da polpa branca, cordões esplênicos espessados e moderada expansão das bainhas linfóides periarteriolas e Anderreg e Passos (1999) descreveram neste órgão um infiltrado de células perivasculares.

VI. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos neste estudo permitiu as seguintes conclusões:

- 1- O uso da citologia para a detecção de inclusões intracitoplasmáticas em microscopia óptica de extensões de sangue periférico é um método útil (apesar da sua subjetividade) no diagnóstico em infecções causadas por *Ehrlichia* spp., quando comparado a nPCR.
- 2- O uso da citologia para a detecção de inclusões intracitoplasmáticas em microscopia óptica de extensões de sangue periférico não foi compatível com a nPCR no diagnóstico de infecções causadas por *Anaplasma platys*.

- 3- O uso da citologia para a detecção de inclusões intraeritrocitárias em microscopia óptica de extensões de sangue periférico, apresentou-se compatível com nPCR em infecções causadas por *Babesia* spp.
- 4- Extensão de sangue periférico mostrou-se a melhor técnica quando comparada às extensões de leucoconcentração e sangue venoso para detecção de inclusões intracitoplasmáticas de infecção por *Ehrlichia* spp.
- 5- “Nested PCR” mostrou-se como o método menos subjetivo para o diagnóstico de EMC.
- 6- TEM mostrou que mórulas de *Ehrlichia* spp. são facilmente detectadas em tecido pulmonar (pos mortem) de animais com EMC.
- 7- *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis* existem na região de Uberlândia e foram confirmadas por métodos moleculares.
- 8- Provavelmente exista uma cepa neutrofílica de *E. canis* na região de Uberlândia.
- 9- Provavelmente existam variantes de *E. canis* não identificáveis pelo nPCR utilizado ou outras espécies de erliquias na região de Uberlândia.

VII. REFERÊNCIAS

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

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B., M. K.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p. 796-802, 2007b.

AGUIRRE, E.; SAINZ, A.; DUNNERB, S.; AMUSATEGUIA, I.; LÓPEZ, L.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; LUACESC, I.; CORTÉS, O.; TESOUROD, M. A. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.125, p. 365-372, 2004.

AKGUL, C.; MOULDING, D. A.; EDWARDS, S. W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS Letters**, Heidelberg, v.487, p. 218-322, 2001.

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 of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p. 2494-2499, 2001.

ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação Parasitológica, Hematológica e Bioquímica Sérica da Fase Aguda de Cães e Gatos Experimentalmente infectados. 1998. 200f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Rural Federal Rural do Rio de Janeiro, Itajaí, 1998.

ALMOSNY, N. R. P. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: _____. **Hemoparasitoses em pequenos animais e como zoonoses**, Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda, 2002, cap. 1. p. 57-66.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Eriiquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.19, p. 31-38, 1999.

ANGERAMI, R. N.; SOUZA, E. R.; SHUMACKER, T. T. S.; GEHRKE, F. S., COLOMBO, S.; SANTOS, F. C. P.; NASCIMENTO, E. M. M.; GARCIA, M. T.; MORAIS, E. O.; RESENDE, M. R.; SILVA, L. J. Clinical epidemiological aspects of the first confirmed human ehrlichiosis cases in an endemic area of Brazilian spotted fever. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006. **Resumos...** p. 371.

ANO, H.; MAKIMURA, S.; HARASAWA, R. Detection of Babesia Species from Infected Dog Blood by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.63, p. 111-113, 2001.

ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in Dogs from Maracaibo, Venezuela: An Ultraestrutural Study of Experimental and Natural Infections. **Veterinary Pathology**, Basel, v.40, p.149-156, 2003.

BARBOSA, F. C.; BORGES, A. P. L.; MUNDIM, A. V. Achados clínicos e hematológicos de cães com Babesiose, Babesiose e Ehrlichiose. Estudo retrospectivo. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006. **Resumos...** p. 389.

BEECHING, N. J.; HART, C. A.; DUERDEN, B. I. Tropical and exotic infections. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.49, p. 5-27, 2000.

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

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.9, p. 4172-4177, 2003.

BOUNOUS, D. I.; HOSKINS, J. D.; BOUDREAUX, M. K. O sistema hematopoiético. In: _____ **Pediatria veterinária: cães e gatos até 6 meses de idade**. São Paulo: Manole, 1992, cap. 11, p. 317-351.

BRANDÃO, P. L.; HAGIWARA, M. K. Babesiose canina-revisão. **Clínica Veterinária**. São Paulo, n.41, p. 50-59, 2002.

BREITSCHWERDT, E. B. As riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1998, p. 543-553.

BREITSCHWERDT, E. B.; BARBARA C.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n.9, p. 2645-2651, 1998.

BREMER, W. G.; SCHAEFER, J. J.; WAGNER, E. R.; EWING, S. A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D. L.; STICH, R. W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.131, p. 95-105, 2005.

BRITO, L. G.; TERRA, V. J. B.; HUACCA, M. E. F.; OLIVEIRA, M. C. S.; PEREIRA, A. P.; REGITANO, L. C.; LEMOS, E. R. S. Utilização da tecnologia LAB-ON-A-CHIP para detecção de *Ehrlichia canis* por PCR em amostras de sangue de cães experimentalmente infectados. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, 2004. **Resumos... p. 579.**

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAÚJO JÚNIOR, 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**, Gloucestershire, v.35, p. 141-146, 2004.

CACCIÒ, S. M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANGILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R. R.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.106, p. 285-292, 2002.

CALIC, S. B. Sorologia das Rickettsioses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p. 185-187, 2004. Suplemento 1.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.119, p. 73-86, 2004.

CASTRO, M. B. Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães por *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935). 1997. 97 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Jaboticabal, 1997.

CHANG, W.; PAN, M. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.2, p. 3142-3146, 1996.

COSTA JR.; L. M.; REMBECK, K.; ROBEIRO, M. F. B.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Sero-prevalence and risk for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, London, (2007), in press, doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.002.

COSTA, J. O.; BATISTA, JR.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M. P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte-Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária**, Belo Horizonte, v.25, n.2, p. 199-200, 1973.

COUTO, C. G. Doenças Rickettsiais. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998, cap.10, p.139-142.

DAGNONE, A. S. Caracterização molecular de espécies da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS. 2006. 118 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DAVOUST, B. L'ehrlichiose canine. **Le Point Veterinaire**, Rueil Malmaison, v.25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DAWSON, J. E.; WARNER, C. K.; EWING, S. A. Fingerprinting of Ehrlichia species by repetitive element PCR. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v.57, p. 109-114, 1997.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence in Algeria d'une *Rickettsia* du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v.28, p. 418-419, 1935.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y., CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, 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. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, 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**, Washington, v.33, p. 1098-1103, 1995.

DUMLER, J. S.; ANTHONY, F. B.; CORNELIS, P. J.; BEKKER, G. A.; DASCH, G.H.; PALMER, S. C.; RAY, Y. R.; 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* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p. 2145-2165, 2001.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **Journal of Small Animal Practice**, Gloucestershire, v.33, p. 540-543, 1991.

FARAH, S. B. **DNA: segredos & mistérios**. São Paulo: Savier, 2000, cap. 5, p.103-140.

FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L. M. Hematologia Veterinária, In: _____. **Patologia Clínica Veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 1982, p. 293.

FÖLDVÁRI, G.; HELL, E.; FARKAS, R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.127, p. 221-226, 2005.

GAL, A.; LOEB, E.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **The Veterinary Journal**, London, (2007), in press, doi:10.1016/j.tvjl.2007.01.013.

GARCÍA-PÉREZ, A. L.; MANDALUNIZ, N.; BARRAL, M.; JUSTE, R. A. Microscopic and PCR findings in sheep after experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila*. **Small Ruminantes Research**, Amsterdam, New York, v.37, p.19-25, 1999.

GE, YAN.; YOSHILE, K.; KURIBAYASHI, F.; LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of *bfl-1*, maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3 activation. **Celular Microbiology**, Oxford, v.7, n.1, p. 29-38, 2005.

GUIMARÃES, A. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.41, p. 60-68, 2002.

HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; BOGUN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.66, p. 241-249, 1996.

HARRUS, S.; OFRI, R.; AIZENBERG, I.; WANER, T. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.78, p. 155-160, 1998a.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.62, p. 15-27, 1998b.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M., BARK, S. H. Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.1, p. 73-76, 1998c.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; ALBERT, W. C. A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. MINIREVIEW: Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; MICHAEL, D.; TREVOR, W.; HYLTON, B. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.83, p. 343-349, 2001a.

HARRUS, S.; WANER, T.; STRAUSS-AYALI, D.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; HECHT, G.; BANETH, G. Dynamics of IgG1 and IgG2 subclass response in dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.99, p. 63-71, 2001b.

HARRUS, S.; WANER, T.; FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; FISHMAN, Z., BARK, H.; HARMELIN, A. Down-regulation of MHC class II receptors of FH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.96, n.3-4, p. 239-243, 2003.

HARRUS, S.; MARTIN, K.; MIARA, L.; AINZENBERG, I.; WANER, T.; SAHW, S. Comparasion of Simultaneous Splenic Sample PCR with Blood Sample PCR for Diagnosis and Treatment to Experimental *Ehrlichia canis* Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, 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. **The journal of infectious diseases**, Chicago, v.137, p.182-188, 1978.

HESS, P. R.; ENGLISH, R. V.; HEGARTY, B. C.; BROWN, G. D.; BREITSCHWERDT, E. B. Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.109, p.117-125, 2006.

HILDEBRANDT, P. K.; CONROY, J. D.; MCKEE, A. E.; NYINDO.; M. B. A.; HUXSOLL, D. L. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. **Infection and Immunity**, Washington, v.7, n.2, 265-271, 1973.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M. J.; ORELLANA, N. G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.36, p. 211-216, 2005.

HUXSOLL, D. Canine Ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia): A Review). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.2, p. 49-60, 1976.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the Polymerase Chain Reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissue of dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.42, p. 281-287, 1994a.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from Blood and Tissues of Dogs after Doxycycline Treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.7, p. 1644-1649, 1994b.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with Other Tests for Early Diagnosis of Canine Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.7, p.1658-1662, 1994.

JOHNSON, E. M.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; CROW, D. W.; KOCAN, K. M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichiae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.74, p. 277-288, 1998.

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

KANAYAMA, M. S.; CABRAL, D. D.; MUNDIM, A. V. Achados hematológicos e bioquímicos em cães com erliquiose canina atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia-MG. **Revista Horizonte Científico**, v.1, p.1-11, 2002. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2002/e.html>

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, v.37, n.8, p. 2631-2638, 1999.

LABRUNA, B. M.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.48, p. 28-30, 2001.

LABRUNA, M. B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p. 123-124, 2004. Suplemento 1.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, J. M.; 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 Ehrlichias species en ticks, humans, dogs, and

capibaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.143, 189-145, 2007.

LEGATZKI, K.; JORGE, P. S. Erliquiose Canina. Uma doença emergente? **Nosso Clínico**, São Paulo, n.26, p.12-20, 2002.

LEIVA, M., NARANJO, C., PEÑA, M. T. Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.8, n.6, p. 387-393, 2005.

MACHADO, R. Z., Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia**, Suplemento 1. São Paulo, v.13, p. 53-57, 2004.

MACHADO, R. Z. Erliquiose nos animais domésticos e silvestres do Brasil. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006. **Plenárias...** p. 163.

MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M. B.; DAGNONE, A. S.; SZABÓ, M. P. J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* In Brazilian marsh deer (*Blatocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.139, p. 262-266, 2006.

MACIEIRA, D. B. Avaliação da ocorrência de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) com trombocitopenia na região metropolitana do Rio de Janeiro. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal)) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2003.

MAIA, M. G.; COSTA, R. T.; HADDAD, J. P. A.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.79, p. 155-162, 2007.

MARSILIO, F.; DI MARTINO, B.; MERIDIANI, I.; BIANCIARDI, P. Direct identification of *Ehrlichia canis* by a novel polymerase chain reaction method and molecular analyses of the citrate synthase (glTA) gene from various Italian strains. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.18, n.2, p. 215-217, 2006.

MARTIN, A. R.; BROWN, G. K.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, New York, v.109, p. 176-180, 2005.

MATHEW, J. S.; EWING, S. A.; MURPHY, G. L.; KOCAN, K. M.; CORSVET, R. E.; FOX, J. C., Characterization of a new isolate of *Ehrlichia platys* (Order *Rickettsiales*) using electron microscopy and polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 68, 1-10, 1997.

MATOS, L. V. S.; BRAGA, E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; MIRANDA, R. R. C. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006. **Resumos...** p. 317.

MAVROMATIS, K.; DOYLE, C. K.; LYKIDIS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M.; P.; CHAIN, SHIN, M.; Malfatti, S.; LARIMER, F.; COPLELAND, A.; DETTER, J. C.; LAND, M.; RICHARDSON, P. M.; YU, X. J.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; KYRPIDES, N. C. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, p. 4015-4023, 2006.

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

McBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection with Recombinant Proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.1, p. 315-322, 2001.

McBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; BOUDREAUX, C.; GUEDRY, T.; WALKER, D. D. Kinetics of Antibody Response to *Ehrlichia canis* Immunoreactive Proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n.5, p. 2516-2524, 2003.

McBRIDE, J. W.; DOYLE, K. C.; ZHANG, X.; CARDENAS, A.M.; POPOV, V. L.; NEHERY, K. N.; WOODS, M. E. Identification of a glycosylated *Ehrlichia canis* 19-Kilidanton Major Immunoreactive Protein with a Species-Specific Serine-Rich Glycopeptide Epitope. **Infection and Immunity**, Washington, p. 74-82, 2007.

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

MILKEN, V. M. F.; CABRAL, D. D.; FIGUEIREDO, J. F.; GONÇALVES, C. L. Ocorrência de Babesiose canina no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Cascavel, v.7, n.1, p. 19-22, 2004.

MORAIS, H. A.; HOSKINS, J.; ALMOSNY, N. R. P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para o diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia* spp. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.48, p. 28-30, 2004.

MOREIRA, N. S.; ALMOSNY, N. R. EHRLICHIA CANIS, DONATIEN & LESTOQUARD, 1935: Alterações na medula óssea durante a fase aguda de cães (*Canis familiares*) infectados experimentalmente. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006. **Resumos...** p. 373.

MOREIRA, S. M.; MACHADO, R.; PASSOS, L. F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 958-960, 2005.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine Ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.2, p. 141-147, 2003.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, J. C. F.; 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, v.79, p. 325-339, 1998.

MUTANI, A.; KAMINJOLO, J. S. The value of in vitro cell culture of granulocytes in the detection of *Ehrlichia*. Valor da cultura celular de granulócito in vitro na detecção de *Ehrlichia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n.4, p. 377-380, 2001.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, L. S.; PAPADOPOULOS, V.; RALLES, T.; FUTTIANOU, A. Evalution of cytology in the diagnosis of acute canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparasion between five methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.91, p. 197-204, 2003.

MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L.; GONEN, L.; BILLINIS, C.; KOUTINAS, A. F.; BANETH, G. Anti-*Hepatozoon canis* antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.129, p. 229-233, 2005.

NAGAGHI, A. C. H.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRADE, M. R.; BALDANI, C. D.; ANDRADE, G. M. Estudo comparativo entre a PCR baseada no Gene *dsb* e a "Nested-PCR" no diagnóstico da Erliquiose Canina. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária &

I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, 2004a. **Resumos...** p. 359.

NAGAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRE, M. R.; BALDANI, C. D.; FERRO, J. A. Estudo comparativo entre a “Nested-PCR” baseada no Gene 16s rRNA e a PCR baseada no gene *p-28* no diagnóstico da Erliquiose Canina. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006. **Resumos...** p. 376.

NEITZ, W. O.; THOMAS, A. D. Rickettsiosis in the Dog. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, Pretoria, v.9, p. 166-174, 1938.

NYINDO, M. B. A.; M, RISTIC, D. L.; HUXSOLL, A.; SMITH, R. Tropical canine pancytopenia: In vitro cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. **American Journal Veterinary Research**, Gloucestershire, v.32, p.1651-1658, 1971.

ORIÁ, A. P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J. L. Uveíte em cães infectados com *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p. 1289-1295, 2004.

OYAFUSO, M. K.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H. S. A.; Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. Characterization of ticks infecting dogs in a hospital population in North Paraná, Brazil, **Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.1, p. 71-74, 2002.

PANCIERA, R. J.; EWING, S. A.; CONFER, W. Ocular Histopathology of Ehrlichial Infections in the Dog. **Veterinary Pathology**, Basel, v.38, p. 43-46, 2001.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and Flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, Gloucestershire, v.36, p. 469-492, 2005.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, B. M. Febre maculosa: aspectos clínico-epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.12, p. 19-23, 1998.

PEREIRA, D. P.; SILVA, R.; ANDRADE, L. V.; RESENDE FILHO, N. J.; FIGUEIRA, B. D.; AVELAR, M. L.; BORGES, G. L. F. N.; MAITIN, R. E. C. Principais casos clínicos acometidos no Hospital Veterinário da UFU no mês de Fevereiro de 2002. XVI Semana Científica de Medicina Veterinária e Mostra da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 9, suplemento 1, p. 66, 2003.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.9, p. 2133-2139, 1996.

POPOV, L. V.; CHEN, S. M.; FENG, H. M.; WALKER, D. H. Ultrastructural variation of cultured *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.43, p. 411-421, 1995.

POPOV, L. V.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. 1998. Ultraestrutural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.47, p. 235-251, 1998.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, New York, v.18, p. 208-213, 1963.

RIBEIRO, S. C. A.; LEITE, R. F. B.; MARRA, P. O. Prevalência da Erliquiose canina em Uberlândia - MG. XVI Semana Científica de Medicina Veterinária e

Mostra da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.9, suplemento 1, p. 29, 2003.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and Ehrlichial Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington , v.4, n.3, p. 286-308, 1991.

RIKIHISA, Y.; YAMAMOTO, S.; KWAK, I.; IQBAL, Z.; KOCIBA, G.; JASON MOTT, J.; YA, W. C. C-Reactive Protein and I-Acid Glycoprotein Levels in Dogs Infected with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.4, p. 912-917, 1994.

RIKIHISA, Y. Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis*, **Microbes and Infection**, Paris, v.1, p. 367-376, 1999.

RIKIHISA, Y. Mechanisms to Create a Safe Haven by Members of the family *Anaplasmataceae*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.990, p. 548-555, 2003.

RIKIHISA, Y. *Ehrlichia* subversion of host innate responses. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.9, p. 95-101, 2006.

RISTIC, M.; and C. J. HOLLAND. 1993. Canine ehrlichiosis. In: Z. WOLDEHIWET AND M. RISTIC. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom, cap. 8, p. 169-186.

SANTARÉM, V. A. Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*. 2003. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SANTOS, J. P.; SANTOS, M. P.; SILVA, T. K.; MUNDIM, E. D.; CABRAL, A. D.; CABRAL, D. D. Frequência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) no município de Uberlândia, MG, Brasil: Avaliação por esfregaço sanguíneo.

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, São Paulo, v.13, 2004a.
Resumos... p. 372.

SANTOS, J. P.; SANTOS, M. P.; SILVA, T. K.; SILVA, G. S. L.; MUNDIM, E. D.; CABRAL, A. D.; CABRAL, D. D. Observação simultânea de parasitismo por *Ehrlichia sp.*, *Hepatozoon sp.*, e *Haemobartonella canis* no mesmo cão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, 2004b.
Resumos... p. 367.

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

SIRIGIREDDY, K. R.; GANTA, R. R. Multiplex Detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* Species Pathogens in Peripheral Blood by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v.7, n.2, p. 308-316, 2005.

SIMPSON, C. F. Structure of *Ehrlichia canis* in Blood Monocytes of a Dog. **American Journal Veterinary Research**, hington, v.10, n.3, p. 590-596, 1974. **American Journal Veterinary Research**, Gloucestershire, v.33, c.12, 1972.

SIMPSON, C. F. Relationship of *Ehrlichia canis*-Infected Mononuclear Cells to Blood Vessels of Lungs. **Infection and Immunity**, Washington, v.10, n.3, p. 590-596, 1974.

SOUZA, E. S.; GAZETA, G. S.; BARBOSA, P. R. A.; GONÇALVES, P. C. Detecção de riquetsias e erliquias através de PCR em animais domésticos do Município de Valença/RJ. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre. **Revista de Patologia Tropical**, v.34. 2005.

SWANGO, L. J.; BANKENIPER, K.W.; KONG, L. I. Infecções Bacterianas, Riquetsiais, Protozoais e outras. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1992. p.276-311.

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (*Acari: Ixodidae*) in South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.130, p. 131-140, 2005.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 473-81.

TORRES, H. M.; MASSARD, C. L.; FIGUEIREDO, M. J.; FERREIRA, T.; ALMOSNY, N. R. P. Isolamento e propagação de *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Goiânia, v.9, n.2, p.77-82, 2002.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.8, p. 2788-2793, 2001.

SANTOS, C. G. V.; ANDRADE, M. G.; CALIC, S. B.; MAFRA, C. L.; LILAGRES, B. S.; GALVÃO, M. A. M. Relato de um possível dono caso clínico de Erliquiose Monocítica Humana em Minas Gerais. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006. **Resumos...** p. 369.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia**, Suplemento 1. São Paulo, v.13,suplemento 1, p. 58-61, 2004.

WALDEMARIN, K. C. A.; MUNDIM, A. V.; BASTOS, J. E. D.; CUNHA, G. N. Alterações hematológicas em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.9, n.2, p. 23-29, 2003.

WALKER, H. D. Molecular Phylogeny of Ehrlichiae and Clinical, Epidemiologic, and Immunopathologic Aspects of Human Ehrlichioses. In: XIV Congresso

Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006a. **Plenárias...** p. 161.

WALKER, H. D. RICKETTSIOSES IN THE AMÉRICAS. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ribeirão Preto, 2006b. **Mesas redondas...**p. 105.

WANER, T.; ROSNER, M.; HARRUS, S.; NAVEH, A.; ZASS, R.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies en experimental acute ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.48, n.1, p. 177-182, 1997.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Review: 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, v.95, p. 1-15, 2001.

WATSON, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **The Journal of Biophysical and biochemical cytology**, Baltimore, v.4, p. 475-478, 1958.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H.; 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 Doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.7, p. 1852-1855, 1997.