

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

DISSERTAÇÃO

**ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA
CINOMOSE, EHRLICHIOSE E BORRELIOSE EM CÃES
(*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) NATURALMENTE
INFECTADOS**

VANIA GOMES DOS SANTOS

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**Aspectos Clínicos e Laboratoriais da Cinomose, Ehrlichiose e
Borreliose em Cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) Naturalmente
Infectados**

VANIA GOMES DOS SANTOS

Sob a Orientação da Professora
Rita de Cássia Campbell Machado Botteon
e Co-orientação do professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
curso de pós-graduação em
Medicina Veterinária na área de
concentração de Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ

Julho de 2008

636.08965

S237a

T

Santos, Vania Gomes dos, 1977-

Aspectos clínicos e laboratoriais da cinomose, ehrlichiose e borreliose em cães (*canis familiaris*, *linnaeus*, 1758) naturalmente infectados / Vania Gomes dos Santos - 2008.

45f. : il.

Orientador: Rita de Cássia Campbell Machado Botteon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinária.

Bibliografia f: 31-44.

1. Cão - Doenças - Teses. 2. Ehrlichiose - Teses. 3. Patologia veterinária - Teses. I. Botteon, Rita de Cássia Campbell Machado, 1964-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinária. III. Título.

Bibliotecário: _____

Data: ___/___/_____

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

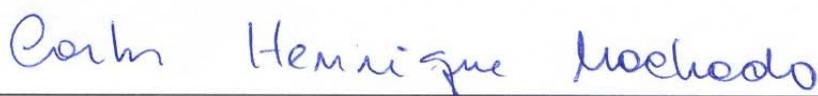
VANIA GOMES DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 10 / 07 / 2008.



Aivaldo Henrique da Fonseca (Dr.), UFRRJ
(Co-orientador)



Carlos Henrique Machado (Dr.), UFRRJ



Nadia Regina Almosny (Dr^a.), UFF

Dedico este trabalho aos meus pais Noé e Divanira, a minha irmã Analice, ao meu irmão Arlei e pai dos meus sobrinhos Natália e Luís Fernando, assim como para meu Anjo da guarda e aos Santos Arcanjos Miguel, Gabriel e Rafael pelo apoio e carinho constantes em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Santíssima Trindade Deus Pai (Javé), Deus Filho (Jesus Cristo) e Deus Espírito Santo (o Santificador e Consolador) e a Nossa Senhora por terem derramado tantas graças em minha vida.

Aos Professores Rita de Cássia Campbell Machado Botteon, Paulo de Tarso Landgraf Botteon, Adivaldo Henrique da Fonseca e Carlos Henrique Machado pelo apoio e imprescindível ajuda na execução deste trabalho.

A Professora Marta Fernanda Albuquerque da Silva e ao professor Ricardo Siqueira da Silva pelo incentivo e amizade.

Aos Profissionais do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho (CCZ) pelo suporte oferecido e solicitude no atendimento.

Aos profissionais do Laboratório de Patologia Clínica do Instituto de Veterinária, do Hospital Veterinário (especialmente as enfermeiras e estagiários da enfermagem) e a tantos outros funcionários e colegas da UFRuralRJ e CTUR que torceram por mim.

Aos colegas de Mestrado por todas as vezes em que nos confraternizamos, sobretudo nas aulas do ótimo professor e psicólogo nato João Telhado Pereira.

Aos colegas do laboratório do Prof. Adivaldo pela colaboração sempre que necessária.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para o sucesso deste trabalho, aos quais só Deus pode, com justiça, avaliar a extensão do quanto me ajudaram (“Nunca diga: não tenho nenhum amigo, pois os amigos de Deus são seus amigos” – Padre Zezinho, citando a Bíblia Sagrada).

Ao CNPq pela concessão de Bolsa de Apoio Técnico, a qual foi decisiva no sentido de viabilizar a coleta de material, bem como no processamento das amostras.

Deus abençoe a todos !

“ E Maria (Nossa Senhora) disse: *Eis aqui a serva do Senhor: faça-se em mim, segundo a Tua Palavra* “

(Bíblia Sagrada – Lucas 1,38)

BIOGRAFIA

Vania Gomes dos Santos, filha de Noé de Jesus Santos e Divanira Gomes dos Santos, nasceu a 05 de janeiro de 1977, na cidade do Rio de Janeiro.

Concluiu o primeiro grau no Instituto de Educação Sarah Kubitscheck, no Rio de Janeiro. Realizou o segundo grau Curso de Técnico em Agropecuária no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CTUR), em Itaguaí – posteriormente Seropédica, após a emancipação deste município - no período de 1991 a 1993.

Em 1995 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), graduando-se em 2000.

Durante a vida acadêmica realizou vários estágios em diversas áreas e foi aprovada em primeiro lugar no concurso de monitoria da disciplina de Doenças Parasitárias, exercendo-a no período de 07/05/1999 a 29/01/2000.

Atuou profissionalmente na área de Clínica Médica, Anestesiologia e Cirurgia de Pequenos Animais, incluindo estágios profissionais não remunerados em Anestesiologia Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (UNESP), em São Paulo, em Clínica Cirúrgica no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IJV), no Rio de Janeiro e em Clínica Médica no Canil do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho (CCZ), também no Rio de Janeiro.

Em 2006 foi selecionada e ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Ciências Clínicas, em nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

SANTOS, V.G. **Aspectos Clínicos e Laboratoriais da Cinomose, Ehrlichiose e Borreliose em Cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) Naturalmente Infectados.** 2008. 45p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A maioria das enfermidades infecciosas e parasitárias em cães apresenta uma fase inicial com sintomas inespecíficos como apatia, anorexia e ocasionalmente febre evoluindo com alterações respiratórias, gastrointestinais e nervosas. Em geral essas alterações são relacionadas com a infecção por viroses como cinomose, bacterioses como *Ehrlichia* sp., além da potencial presença de agentes etiológicos exóticos como *Borrelia* sp. O presente estudo teve como objetivos detectar qualitativamente o antígeno do vírus da cinomose, avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Ehrlichia* sp. e anticorpos homólogos contra *Borrelia burgdorferi* em cães acautelados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) Paulo Dacorso Filho, pertencente ao Município do Rio de Janeiro, Brasil e correlacionar com sintomas clínicos e alterações hematológicas. Para realização da pesquisa, foram coletadas amostras de sangue de 38 animais alojados coletivamente em cinco baias de uma população de 125 cães sem raça definida, machos e fêmeas, de diferentes idades e com histórico de vacinação desconhecido. A presença de um animal positivo para o vírus da cinomose e ausência de casos clínicos indica que os cães estavam naturalmente imunizados ou com infecção subclínica. O número de animais positivos, porém assintomáticos, para *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* à análise morfológica em esfregaços sangüíneos foi elevado, especialmente para *A. platys* indicando uma alta prevalência de infecção sub-clínica. Em contrapartida houve um alto título de anticorpos anti-*Ehrlichia* sp. evidenciando exposição prévia a este agente. A elevada presença de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* indica exposição prévia ou reação cruzada com espiroqueta do gênero *Borrelia* e indica a circulação do agente etiológico na região estudada.

Palavras chave: Cinomose, ehrlichiose, borreliose, cães.

ABSTRACT

SANTOS, V.G. **Laboratory of Clinical Aspects of Canine Distemper, Ehrlichiosis and Borreliosis in Dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) Naturally Infected.** 2008. 45p. Dissertation (Master of Science in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Most infectious and parasitic diseases in dogs, have an initial phase with nonspecific symptoms such as apathy, anorexia and occasionally fever with respiratory, gastrointestinal and nervous abnormalities. Generally these changes are related to infection by canine distemper, *Ehrlichia* sp and the potential presence of exotic etiological agents such as *Borrelia* sp. This study aimed to detect the occurrence of the canine distemper virus, antibodies against *Ehrlichia* sp and homologous antibodies against *Borrelia burgdorferi* in dogs of the Zoonotic Diseases Control Center Paulo Dacorso Filho, of Rio de Janeiro, Brazil correlating with clinical symptoms and haematological disorders. To conduct the research, blood samples were collected from 38 animals collectively housed in five boxes from a population of 125 dogs without defined race, sex, different ages and with an unknown vaccination history. The presence of a positive animal for the canine distemper virus and the absence of clinical cases indicate that the dogs were naturally immunized or have subclinical infection. The number of positive but asymptomatic animals, for *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in the morphological analysis of blood smears was high, especially for *A. platys* indicating a high prevalence of sub-clinical infection. However, there was a high titer of antibodies against *Ehrlichia* sp showing prior exposure to this agent. The high titers of homologous antibodies against *Borrelia burgdorferi*, indicates prior exposure or cross-reaction with the spirochete *Borrelia* sp. and indicates the presence of the causative agent in the region.

Key words: Canine distemper, ehrlichiosis, borreliosis, dogs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média, desvio padrão, amplitude de variação (máximo e mínimo) dos parâmetros hematológicos de 38 cães naturalmente infectados com <i>E. canis</i> e/ou <i>A. platys</i> em relação aos valores de referência (JAIN, 1986).....	28
Tabela 2 - Número e porcentagem de animais com parâmetros leucocitários na faixa da normalidade, diminuídos e aumentados segundo os valores de referência citados por Jain (1986).....	33
Tabela 3 - Número de animais positivos e negativos para pesquisa de anticorpos anti <i>E. canis</i> pelo teste de Imunofluorescência indireta em relação a titulação em 38 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Santa Cruz, RJ, em janeiro e fevereiro de 2008.....	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1—Resultados encontrados na sorologia para *Morbillivirus* (Cinomose), *Ehrlichia canis* e *Borrelia* sp e identificação de estruturas características de *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. em esfregaços sanguíneos de 38 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Santa Cruz, RJ, em janeiro e fevereiro de 2008.....

29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Frequência de amostras positivas e negativas para pesquisa de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em esfregaço de sangue corado em 38 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Santa Cruz, RJ, em janeiro e fevereiro de 2008..... 34
- Figura 2** - Frequência de amostras positivas e negativas quanto a pesquisa de antígenos da cinomose (*Morbillivirus*) e anticorpos anti *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi* em amostras de sangue de 38 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Santa Cruz, RJ, em janeiro e fevereiro de 2008..... 34
- Figura 3** - Amostras positivas e negativas em relação aos títulos de anticorpos anti *Ehrlichia canis* pelo teste de Imunofluorescência indireta de 38 cães do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho em Santa Cruz, Zona Oeste do Rio de Janeiro em janeiro e fevereiro de 2008. 39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Cinomose canina	2
2.1.1 Etiologia	2
2.1.2 Patogenia	2
2.1.3 Diagnóstico Clínico	3
2.1.4 Diagnóstico Laboratorial	5
2.1.5 Prevalência	6
2.2 Ehrlichiose canina	6
2.2.1 Etiologia	6
2.2.2 Patogenia	6
2.2.3 Diagnóstico Clínico	7
2.2.4 Diagnóstico Laboratorial	8
2.2.5 Prevalência	9
2.3 Trombocitopenia cíclica canina	10
2.3.1 Etiologia	10
2.3.2 Patogenia	10
2.3.3 Diagnóstico Clínico	10
2.3.4 Diagnóstico Laboratorial	11
2.3.5 Prevalência	11
2.4 Borreliose canina	11
2.4.1 Etiologia	11
2.4.2 Patogenia	12
2.4.3 Diagnóstico Clínico	13
2.4.4 Diagnóstico Laboratorial	14
2.4.5 Prevalência	14

3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Local e amostragem	15
3.2 Amostras de sangue	15
3.2.1 Hemograma	15
3.2.2 Provas complementares ao hemograma	16
3.2.3 Imunoensaio cromatográfico para pesquisa de antígenos da Cinomose Canina	16
3.2.4 Pesquisa de anticorpos anti <i>Ehrlichia canis</i>	16
3.2.5 Pesquisa de anticorpos anti <i>Borrelia burgdorferi</i>	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Relato de caso	18
4.2 Hemograma	18
4.2.1 Eritrograma e contagem de plaquetas	18
4.2.2 Leucograma	21
4.3 Provas complementares ao hemograma	23
4.4 Imunoensaio cromatográfico para pesquisa de antígenos da cinomose canina	24
4.5 Pesquisa de anticorpos anti <i>Ehrlichia canis</i>	26
4.6 Pesquisa de anticorpos anti <i>Borrelia burgdorferi</i>	27
4.7 Infecções múltiplas	28
5 CONCLUSÕES	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
7 ANEXOS	45

1 INTRODUÇÃO

O estudo das doenças infecciosas e parasitárias adota uma estratégia multidisciplinar incorporando conceitos de microbiologia, parasitologia, patologia, imunologia, epidemiologia, como também aspectos clínicos, terapêuticos e zootécnicos.

Em cães, as enfermidades do sistema nervoso central (SNC) representam um importante grupo de doenças inflamatórias e infecciosas. Sinais neurológicos graves, muitas vezes incompatíveis com a vida, podem ser determinados por diferentes etiologias, sendo comum a ocorrência simultânea de mais de uma enfermidade, sobretudo em cães debilitados.

Embora na rotina clínica o diagnóstico em geral seja fundamentado na evolução e em achados laboratoriais, várias enfermidades que acometem os cães apresentam em uma fase inicial sintomas inespecíficos como apatia, anorexia e ocasionalmente febre evoluindo com alterações respiratórias, gastrointestinais e nervosas. Em geral essas alterações são relacionadas com a infecção por agentes do gênero *Ehrlichia* sp e viroses como cinomose, além da potencial presença de agentes etiológicos pouco conhecidos, como a *Borrelia* sp.

Todas podem iniciar-se com sinais gerais de apatia e anorexia, mas quando estes estão acrescidos de febre e corrimento óculo-nasal muco-purulento podem ser associados às manifestações respiratórias tanto da ehrlichiose quanto da cinomose. Também a forma cutânea da ehrlichiose assemelha-se à forma exantemática da cinomose e tanto a ehrlichiose quanto a cinomose e a borreliose de Lyme podem apresentar um quadro de poliartrite e sintomas neurológicos.

Informações obtidas através de exames laboratoriais associados aos dados de histórico e achados clínicos, são fundamentais para o diagnóstico definitivo e diferencial dessas enfermidades, sobretudo considerando a possibilidade de infecções mistas ou concomitantes por esses e outros agentes. No entanto, mesmo os achados laboratoriais importantes para o diagnóstico dessas enfermidades podem ser semelhantes e não conclusivos.

Ehrlichiose e cinomose geralmente evoluem com um quadro de anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia, leucopenia, linfopenia e monocitose. A trombocitopenia está frequentemente associada à infecção pelo *Anaplasma platys*, e ocorre também na infecção pelo vírus da cinomose e pela *Ehrlichia canis*, além do que todas apresentam ainda, hipoalbuminemia.

O presente estudo teve como objetivos avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, detectar qualitativamente o antígeno do vírus da cinomose e anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em cães acautelados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) Paulo Dacorso Filho, pertencente ao Município do Rio de Janeiro, Brasil e correlacionar com sintomas clínicos e alterações hematológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cinomose canina

2.1.1 Etiologia

A cinomose canina é uma enfermidade altamente contagiosa (TIPOLD, 1995), de distribuição mundial (APPEL *et al.* 1994), causada por um vírus da Família *Paramixoviridae*, gênero *Morbillivirus* (APPEL; SUMMERS, 1995). Acomete principalmente os cães jovens não vacinados e outros carnívoros como raposas, furões, leões, leopardos, guepardos e tigres (NORRIS *et al.* 2006). O cão é o principal reservatório e serve como fonte de infecção para os animais selvagens (GREENE; APPEL, 2006).

O vírus da cinomose canina (*Canine Distemper Virus* - CDV) apresenta replicação citoplasmática, é sensível ao calor (56° C) e a solventes lipídicos, mantendo sua capacidade infectante sob baixas temperaturas.

O CDV é um importante patógeno que determina altas taxas de morbidade e letalidade em todo o mundo (APPEL; SUMMERS, 1995; STETTLER; ZUBRIGGEN, 1995; TIPOLD, 1995).

2.1.2 Patogenia

A transmissão ocorre por contato direto através de aerossóis e alimentos ou objetos contaminados por secreções dos animais infectados, que podem eliminar o vírus através de secreções e excreções: nasais, lacrimais, saliva, urina e fezes por vários meses (CATROXO, 2003).

A cinomose acomete cães de qualquer idade, raça e sexo, com maior predileção por filhotes não-vacinados (CHRISMAN, 1985; FENNER, 2004; GREENE; APPEL, 2006).

A viremia ocorre do 3º ao 10º dia após o contágio. Durante a primeira semana, antes do aparecimento dos sintomas, os vírus associados às células disseminam-se via sanguínea até a medula óssea, baço, timo e gânglios linfáticos, atingindo em torno de sete dias os epitélios do estômago e intestinos, vias respiratórias e urinárias, pele e sistema nervoso central, propagando-se por todo o organismo. Trata-se, portanto de uma infecção generalizada, onde a multiplicação viral inicia-se nos tecidos linfóides orofaríngeos.

Alguns cães desenvolvem resposta imune precoce e se recuperam rapidamente e em outros a infecção dos tratos respiratório, digestivo e urogenital levam à morte. A doença e as infecções subclínicas produzem imunidade ativa e os anticorpos maternos são transmitidos aos filhotes (CATROXO, 2003).

Linfopenia e trombocitopenia são achados consistentes (NELSON; COUTO, 2001a). Embora em Medicina Veterinária a correlação entre trombocitopenia e infecções virais necessite de maiores estudos, naquelas por *Morbillivirus* evidenciou-se aumento de anticorpos anti-plaquetas (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000), além de anemia normocítica normocrômica (MENDONÇA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005) não regenerativa (SILVA *et al.*, 2005), monocitose (MENDONÇA *et al.*, 2000) e leucopenia (MENDONÇA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005). Com a replicação do vírus em tecidos linfóides ocorre conseqüente linfopenia (MEGID *et al.*, 2000). Devido a infecções bacterianas secundárias, pode ocorrer leucocitose por neutrofilia (SILVA *et al.*, 2005).

Os cães jovens (4 a 6 meses) são mais susceptíveis que os adultos. Os animais sobreviventes podem apresentar seqüelas permanentes ou complicações tardias, como desmielinização multifocal no sistema nervoso central (SNC), identificada em grande parte dos cães acometidos (ZUBRIGGEN; GRABER; VANDELVEDE, 1995).

A idade, no momento da infecção é um fator que influencia a vulnerabilidade do animal à diferentes manifestações clínicas, resposta imunológica e ao desenvolvimento de quadro neuropatológico (KRAKOWKA; KOESTNER, 1976).

2.1.3 Diagnóstico Clínico

A cinomose é uma doença multissistêmica de evolução aguda, subaguda ou crônica que pode evoluir para sinais de envolvimento respiratório, cutâneo, gastroentérico e neurológico. Em cães a infecção é altamente contagiosa e pode ocasionar elevadas taxas de letalidade (TIPOLD, 1995).

Os sinais clínicos podem ou não seguir uma cronologia, porém na maioria trata-se de uma doença aguda febril (ZEE, 2003). As formas de evolução clínica manifestadas são muito menos freqüentes que as infecções latentes ou inaparentes (BAUMANN, 1999).

Os sinais clínicos, a duração e a gravidade da cinomose variam consideravelmente. Em um número importante de casos a infecção é inaparente, ou subclínica, e não se observam sinais externos de enfermidade, enquanto que em outras cepas o curso é curto e fatal. Os cães infectados podem manifestar uma combinação de sinais e/ou lesões respiratórias, gastrintestinais, cutâneas e neurológicas que podem ocorrer em seqüência ou simultaneamente. Vários sinais neurológicos podem ocorrer e a mioclonia geralmente é considerada a manifestação clássica da infecção (GRÖNE; ENGELHARDT; ZUBRIGGEN, 2003; KOUTINAS *et al.*, 2004).

Após um período de incubação de três a sete dias manifestam-se os sinais inespecíficos de prostração, inapetência e elevação bifásica da temperatura (39,5 - 41,0° C), acrescidos de fluxo nasal e lacrimal seromucosos. Ao primeiro pico de febre de 39,5° - 41°C, que dura oito a 48 horas e põe em evidência o estágio virêmico, segue um intervalo afebril de um a dois dias e uma segunda elevação de temperatura, cuja duração e intensidade dependem da gravidade das alterações orgânicas (ZEE, 2003).

As infecções bacterianas secundárias decorrentes dos efeitos imunossupressores do vírus da cinomose, em geral são responsáveis pelos sinais clínicos associados com a forma aguda (HOSKINS, 2004).

Na fase seguinte da doença, é desenvolvido o quadro correspondente à cinomose catarral, exantemática ou nervosa, dependendo da difusão e virulência do vírus, assim como do tipo de infecções bacterianas secundárias complicantes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonellas*, *Bordetella bronchiseptica*, *Nocardia asteroides*) e, mais raramente, micoplasmas, protozoários e outros vírus (ZEE, 2003).

Ao complexo de sintomas catarrais pertencem, além da rinite e conjuntivite, as formas de evolução respiratória (laringite catarral, bronquite ou broncopneumonia) e gastrintestinal caracterizada por vômitos e diarreia. Numa baixa porcentagem dos casos, no fim da doença, pode aparecer um exantema vesículo-pustuloso, localizado predominantemente, na parte posterior do abdome e face interna das coxas, assim como no conduto auditivo externo.

A lesão no SNC é apresentada na forma de três síndromes clínicas conhecidas como encefalomielite dos cães jovens, encefalomielite multifocal dos cães adultos e encefalite dos cães idosos (FENNER, 2004; AMUDE *et al.* 2006).

A forma nervosa, que pode apresentar-se no final da fase aguda ou no instante em que o animal parecia estar curado, apesar de que também pode predominar desde o princípio em alguns surtos epidêmicos, compreende sintomas diversos, mas geralmente graves, tais como: transtornos psíquicos e alterações de comportamento, contrações tônico-clônicas generalizadas e mioclonias locais, ataxias, paraplegias e tetraplegias, sintomas cerebelares (tremores de cabeça e hipermetria) e vestibulares (cabeça pêndula, ataxia e nistagmo),

movimentos de andar em círculo e "pedalar", paralisias da mandíbula, da bexiga urinária e do reto, perda da percepção sensitiva e parestesias com automutilações entre outros.

A letalidade oscila entre 30 e 80 %, e os animais sobreviventes podem apresentar seqüelas permanentes do sistema nervoso central ou complicações tardias, como encefalites desmielinizantes (encefalite do cão velho) ou hiperqueratose das patas, que podem conduzir a morte dos animais (CATROXO, 2003).

As broncopneumonias purulentas, as diarréias intensas e persistentes e os transtornos do SNC conduzem freqüentemente à morte, determinam um estado de debilidade que conduzem à eutanásia ou deixam, atrás de si seqüelas crônicas (BAUMANN, 1999).

Em um surto de cinomose ocorrido na Finlândia em zonas com uma elevada densidade populacional envolvendo cães vacinados, amostras de células epiteliais de 3649 cães foram testadas e 865 casos foram confirmados por testes indiretos de anticorpos fluorescentes. Os sinais clínicos variaram de conjuntivite, febre e anorexia aos sinais de doenças respiratórias e gastrintestinais, com uma estimativa de mortalidade de 30% dos cães acometidos. Dos casos confirmados 631 (73%) tinham entre três e 24 meses de idade; 487 destes tinham sido vacinados, pelo menos uma vez e 351 (41%) tinham uma história completa de vacinação (EK-KOMMONEN *et al.*, 1997).

Em um estudo cujos objetivos foram descrever os aspectos clínico-patológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, os sinais clínicos mais freqüentes foram mioclonia (38,4%), incoordenação motora (25,0%), convulsões (18,5%) e paraplegia (13,4%). Em 98,4% dos cães com alterações histopatológicas no encéfalo, foram observadas desmielinização, encefalite não-supurativa ou uma combinação dessas duas lesões. Corpúsculos de inclusão foram observados em diferentes células de 343 dos 565 cães com alterações histopatológicas no encéfalo. Levando em consideração o tipo de lesões e as faixas etárias, casos com desmielinização e encefalite não-supurativa foram mais freqüentes em cães idosos, enquanto que somente desmielinização ou encefalite não-supurativa foram mais comuns nos filhotes (SILVA *et al.*, 2007).

O diagnóstico clínico, realizado com base no exame físico, anamnese e por exames complementares, às vezes, é inconclusivo (HOSKINS, 2004), pois o mesmo padrão também pode ser encontrado em outras doenças infecciosas e parasitárias de cães (MORITZ; FRISK; BAUMGÄRTNER, 2000; AMUDE; ALFIERI; ALFIERI, 2007). Um agravante é que 25 a 75% dos animais susceptíveis desenvolvem infecção subclínica e eliminam o vírus no ambiente, atuando como fontes de infecção (APPEL; SUMMERS, 1999).

A resposta hematológica varia de um indivíduo para outro, bem como com a fase da infecção (FENNER; GIBBS; MURPHY, 1993). Infecções bacterianas oportunistas no trato alimentar e respiratório podem ser observadas e justificam a leucocitose por neutrofilia e o desvio a esquerda observados em alguns animais.

Em estudo sobre o perfil hematológico de cães com cinomose (SILVA *et al.*, 2005) houve 61% de anemia, na maioria dos casos normocítica normocrômica e sem sinais de regeneração medular, e 69% de trombocitopenia.

A linfopenia é uma característica consistente com a infecção pelo vírus da cinomose, mas pode estar ausente em alguns casos, e a trombocitopenia também é um achado freqüente (NELSON; COUTO, 2001a).

O mecanismo responsável pela trombocitopenia associada a infecções virais na veterinária ainda é pouco conhecido. Em infecções por *Morbillivirus* foi evidenciado um aumento de anticorpos anti-plaquetas, sendo a trombocitopenia provavelmente decorrente da remoção de plaquetas da circulação pelo sistema retículo endotelial (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000).

Lesões no epitélio intestinal causadas pelo vírus, com conseqüente diarreia, além da própria apatia determinada pela doença levam o animal a recusar o alimento. Dessa forma, a diminuição da ingestão protéica bem como o comprometimento intestinal são fatores determinantes na perda de condição corporal e redução dos níveis séricos da albumina em animais com cinomose (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

2.1.4 Diagnóstico Laboratorial

A presença do vírus pode ser confirmada pela identificação de corpúsculos de inclusão em células associadas a exsudato, em células epiteliais e em neutrófilos, porém sua ausência não exclui a infecção pelo CDV (MOTOHASHI; NAKAGAWA; OKADA, 1969; GREENE; APPEL, 1998; JONES *et al.*, 2000).

Para a realização do diagnóstico laboratorial *ante mortem* da cinomose canina vários métodos de diagnóstico foram desenvolvidos, destacando-se a pesquisa de corpúsculo de inclusão em células presentes em secreções e em células sanguíneas, a imunofluorescência direta, a imuno-histoquímica e o isolamento do CDV em cultivo celular. Porém, todos os métodos apresentam desvantagens que podem inviabilizar o uso na rotina laboratorial tais como baixa sensibilidade e/ou especificidade, etapas laboriosas de processamento do material biológico e tempo necessário para a conclusão do resultado (FRISK *et al.*, 1999; APPEL; SUMMERS, 1999; MORITZ; FRISK; BAUMGÄRTNER, 2000).

A inclusão viral é o efeito citopático do vírus sobre células sanguíneas, principalmente linfócitos. Sua visualização confere ao diagnóstico um caráter definitivo (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Entretanto, a presença pouco freqüente de corpúsculos de inclusão em cães com cinomose (BATISTA *et al.*, 2000; ALLEMAN *et al.*, 1992) é um fator limitante.

As técnicas sorológicas de ELISA e imunofluorescência apresentam valor diagnóstico limitado uma vez que animais que morrem por cinomose podem ou não apresentar títulos mensuráveis de anticorpos (APPEL, 1969; APPEL, SUMMERS, 1999; FRISK *et al.*, 1999). A técnica de isolamento viral em cultivo celular é específica, porém demorada e pode resultar em falso-negativo se o animal não estiver na fase aguda da doença (SHIN *et al.*, 1995).

No SNC o vírus causa lesões principalmente no cerebelo e nas colunas brancas da medula espinhal, caracterizadas por áreas de necrose bem delimitadas, desmielinização e inclusões intranucleares principalmente em astrócitos. A observação dessas lesões confirma o diagnóstico da infecção porém este é um método de diagnóstico *post mortem* (GREENE, 1998; JONES *et al.*, 2000).

Atualmente, a técnica da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) vem sendo empregada com sucesso na detecção do CDV em diferentes tipos de amostras biológicas provenientes de cães com sinais clínicos sistêmicos e neurológicos (SHIN *et al.*, 1995; FRISK *et al.*, 1999; SAITO, 2001; GEBARA, 2002; GEBARA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005; NEGRÃO; ALFIERI; ALFIERI, 2007).

Esse método de diagnóstico *ante mortem* apresenta taxas de sensibilidade e de especificidade elevadas. Entretanto, a RT-PCR pode apresentar resultados falso-negativos, destacando-se o método de extração do ácido nucléico e a seleção do material biológico a ser utilizado para o diagnóstico (FRISK *et al.*, 1999; GEBARA *et al.*, 2004; NEGRÃO *et al.*, 2006).

Na dependência da forma de apresentação e da evolução o CDV pode estar presente em uma gama de amostras biológicas. Nos diferentes estádios da infecção, urina, sangue total, leucócitos, fezes, saliva, secreção respiratória e líquido podem apresentar o vírus em títulos variados (FRISK *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 2006a,b; AMUDE; ALFIERI; ALFIERI, 2006).

2.1.5 Prevalência:

Mundialmente a incidência da cinomose canina varia consideravelmente segundo o local e a técnica de diagnóstico. Os índices variam de 1,35% na Índia (ALEX; DHANAPLAN, 1994) e 21,7% na Finlândia (EK-KOMMONEN *et al.*, 1997) a 42% ou 74% na Dinamarca, nos mesmos animais, quando os testes foram feitos respectivamente por imunofluorescência direta ou por ELISA (BLIXENKRONE-MØELLER *et al.*, 1993).

Em vários países, devido à vacinação regular de grande parte da população canina, a frequência da doença clínica tem diminuído substancialmente, sendo relatados apenas focos esporádicos (HAAS *et al.*, 1997; MOSHIZUKI *et al.*, 1999).

No Brasil, a cinomose ainda é endêmica, podendo representar de 2,07% (BORBA *et al.*, 2002) a 6% (HEADLEY; GRAÇA, 2000) de todas as ocorrências clínicas e até 11% das mortes em cães. Contudo não há prevalência definida para o vírus da cinomose no Brasil. A incidência identificada em estudos epidemiológicos baseados em dados obtidos de Hospitais Veterinários foi de 11,7% em Belo Horizonte - MG e Santa Maria – RS e 2,07% em Maringá no Paraná. Contudo como esses dados nem sempre relatam a real situação da população urbana canina (HEADLEY; GRAÇA, 2000), os dados não correspondem exatamente à prevalência da doença.

2.2 Ehrlichiose canina

2.2.1 Etiologia

A Ehrlichiose compreende organismos intracelulares obrigatórios pertencentes a Ordem *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae* e gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* (DUMLER *et al.*, 2001), transmitidos por carrapatos (McDADE, 1990).

Várias espécies do gênero *Ehrlichia* causam infecções clínicas e subclínicas em cães: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. Ewingii*, *E. muris*, *E. ruminantium* (DUMLER *et al.*, 2001). Destas, a *Ehrlichia canis*, responsável pela erliquiose monocítica canina, doença considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas, onde abundam populações do carrapato vetor, (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

Outras espécies podem infectar cães (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998) e humanos (NEER *et al.*, 2002), com patogenicidade e virulência variáveis.

2.2.2 Patogenia

O principal vetor e reservatório de *E. canis* é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, no qual as formas parasitárias se multiplicam assexuadamente. Esta espécie é de grande importância por ser cosmopolita, tendo como hospedeiro principal o cão (GROVES *et al.*, 1975).

E. canis pode ser transmitida pelas ninfas e adultos dos carrapatos que se infectam sugando sangue de um cão contaminado. No carrapato, os parasitos se multiplicam nos hemócitos e células da glândula salivar de onde migram para o trato digestivo. A infecção dos hospedeiros vertebrados ocorre quando o carrapato infectado se alimenta e sua secreção salivar é inoculada (GROVES *et al.*, 1975; McDADE, 1990).

Nos cães os corpos elementares que são as formas individuais do parasito penetram nos monócitos por fagocitose. O ciclo de desenvolvimento no monócito tem início quando há adesão à membrana plasmática da célula hospedeira, que se invagina, determinando o aparecimento de inclusões pleomórficas denominadas corpúsculos iniciais (0,5 a 2,5 micra).

A replicação dentro dos fagossomos ocorre por divisão binária. Em três a cinco dias

após a infecção a *E. canis* usualmente se apresenta como um compacto de inclusões contendo microrganismos individuais em número variado, podendo haver mais de uma inclusão por célula (ZORNOFF *et al.*, 1995).

Na fase seguinte (7 a 12 dias após a infecção) ocorrem crescimento e replicação originando mórulas. As células infectadas contêm várias mórulas, com vários corpos elementares (GREENE *et al.*, 1984). Estes podem atingir células saudáveis a partir da ruptura da membrana da célula hospedeira, com liberação dos agentes ao meio externo ou por exocitose, e entrada na nova célula hospedeira por endocitose e fusão com as membranas de novas células, dando origem a um novo ciclo infeccioso (McDADE, 1990; RIKIHISA, 1991).

Cada *Ehrlichia* spp. parece ter tropismo por um determinado tecido. Os organismos invadem tecidos especialmente ricos em células mononucleares como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (VARELA, 2003).

Depois de um período de incubação de 8 a 20 dias o cão infectado começa a manifestar sinais sistêmicos, iniciando a fase aguda que dura de duas a quatro semanas (HARRUS; BARK; WANER, 1997). Nesta fase os organismos se multiplicam nas células mononucleares circulantes e nos tecidos do sistema mononuclear fagocitário levando à linfadenomegalia e à hiperplasia linforreticular. As células infectadas atingem outros órgãos e tecidos como pulmões, rins, meninges e olhos onde interagem com as células endoteliais induzindo vasculite e infecção subendotelial (HARRUS; BARK; WANER, 1997).

2.2.3 Diagnóstico clínico

Os sinais clínicos associados à fase aguda são inespecíficos e incluem anorexia e depressão, acrescidas de febre e descarga ocular e nasal serosa ou purulenta – os quais se assemelham à fase respiratória da Cinomose. Devido ao animal não alimentar-se há conseqüente perda de peso. Entre outros sinais que podem ocorrer estão edema de membros e de escroto, além de linfadenopatia e esplenomegalia.

Há um progressivo desenvolvimento de anemia tanto por destruição de hemácias quanto por supressão na sua produção. Em geral não ocorrem hemorragias, embora nessa fase possa ocorrer trombocitopenia que pode variar de moderada a grave e também pode ocorrer leucopenia. Devido à possibilidade de indução de vasculite nas células endoteliais dos vasos da microvascularização das meninges pode haver sangramento no interior das mesmas levando ao aparecimento de alterações no sistema nervoso tais como ataxia, hiperestesia, e déficits dos nervos cranianos (HARRUS; BARK; WANER, 1997; BREITSCHWERDT, 2004).

Sinais oculares como uveíte e hemorragias da córnea não são incomuns. Outros sinais incluem vômitos, claudicação e dispnéia (WANER; HARRUS, 2000).

A fase subclínica pode instalar-se de seis a nove semanas após a inoculação e ocorre quando o animal não recebe um tratamento curativo eficaz na fase aguda. Trombocitopenia, leucopenia e anemia persistem em níveis variados. O animal pode conseguir debelar a infecção nessa fase ou não, progredindo para uma fase crônica (BREITSCHWERDT, 2004).

Na fase crônica é esperado o desenvolvimento de pancitopenia, embora qualquer combinação de neutropenia, anemia e trombocitopenia possa ocorrer (NELSON; COUTO, 2001b).

Os sinais clínicos associados com a fase crônica são discretos ou ausentes em alguns cães e graves em outros. Cães que desenvolvem sintomas clínicos podem apresentar tendências para o sangramento, palidez devido à anemia, perda de peso acentuada, uveíte anterior, hemorragias retiniais e sinais neurológicos compatíveis com meningoencefalite. Pode-se observar petéquias e equimoses na pele e membranas mucosas e quando as células da

microvascularização dos pulmões e mucosa nasal estão envolvidas podem ocorrer hemorragias que se exteriorizam como epistaxe (RIKIHISA, 1991).

Devido à imunossupressão, infecções bacterianas secundárias podem ocorrer (BREITSCHWERDT, 2004).

A principal característica desta fase é a hipoplasia de medula óssea resultando em anemia normocítica normocrômica sem resposta da medula óssea (arregenerativa) devido à supressão da atividade medular (MEINKOTH *et al.*, 1989; NELSON; COUTO, 2001 b), assim como monocitose, linfocitose e leucopenia (TROY; FORRESTER, 1990; ANDEREG; PASSOS, 1999; STILES, 2000). Linfocitose intensa, acompanhada por linfócitos atípicos ou reativos, foi associada com a fase crônica da ehrlichiose (BREITSCHWERDT, 2004).

A trombocitopenia pode ser detectada tanto na fase aguda como na fase crônica da ehrlichiose (NELSON; COUTO, 2001b). No entanto, embora tenham aspectos clínicos e sorológicos típicos de erliquiose, aproximadamente um terço dos cães não apresentam trombocitopenia. Além disso, a redução do número de plaquetas circulantes pode decorrer de muitas causas, incluindo erros na amostragem e na colheita de sangue e no transporte das amostras, assim como há a existência de raças que possuem normalmente um número menor de plaquetas circulantes como a Greyhound (ALMOSNY, 2006). Pode ainda, a trombocitopenia ser um achado associado à infecções virais, como a cinomose (FELDMAN *et al.*, 2000). Dessa forma a trombocitopenia não pode ser considerada um achado patognomônico de Erliquiose, mas segundo Bulla *et al.* (2004), deverá ser incluída habitualmente como diagnóstico diferencial em uma área endêmica.

2.2.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é normalmente efetuado pela demonstração microscópica direta de inclusões intra-citoplasmáticas, conhecidas como mórulas, em células mononucleares sangüíneas, a partir de preparações coradas de esfregaço sangüíneo ou da camada leucocitária (WOODY; HOSKINS, 1991).

A observação da mórula em esfregaços sanguíneos é uma forma especialmente adequada em Medicina Veterinária, pela economia, praticidade do exame e pouca disponibilidade de exames sofisticados. Apesar da rapidez de execução e baixo custo, trata-se de técnica nem sempre eficaz, pela constante flutuação da parasitemia durante o curso da enfermidade (ELIAS, 1992). Apesar de conclusiva para o diagnóstico de ehrlichiose monocítica canina a observação de mórulas em leucócitos circulantes é rara, exceto durante a fase aguda da infecção, que se inicia entre 14 e 20 dias após a infecção e termina em aproximadamente um mês (HOSKINS *et al.*, 1991).

Técnicas moleculares de diagnóstico, reconhecidamente mais sensíveis, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido recentemente desenvolvidas para o diagnóstico de *E. canis* (McBRIDE *et al.*, 1996; BREITSCHWERDT *et al.*, 1998; GOLDMAN *et al.*, 1998; HARRUS *et al.*, 1998; MURPHY *et al.*, 1998; HUA *et al.*, 1999). Esses autores desenvolveram protocolos para realização da técnica de PCR em duas etapas de reação, uma variação da técnica designada *nested-PCR*, ou ainda, com a aplicação complementar de sondas moleculares ou caracterização de polimorfismo de fragmentos amplificados. Apesar da maior sensibilidade, esta técnica é de emprego limitado à pesquisas devido a complexidade e custo elevado apresentando sempre um bom resultado como método de diagnóstico (BULLA *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2005; BRANDÃO, 2005; DAGNONE, 2006; SOUSA, 2006; CARDOZO *et al.*, 2007).

Nas fases subaguda e crônica os métodos sorológicos que visam a detecção de anticorpos contra *E. canis* podem ser efetuados através da reação de Imunofluorescência Indireta (IFI ou RIFI) ou pelo teste de ELISA. A desvantagem dessas técnicas é que não são

praticadas facilmente na clínica de pequenos animais e especialmente porque os títulos não aparecem na fase aguda (ELIAS, 1992; HARRUS; BARK; WANER, 1997). Entretanto a IFI é útil na fase crônica com excelente especificidade e grande sensibilidade (HUXSOLL, 1976; TROY; FORRESTER, 1990; EGENVALL; HEDHAMMAR; BJOERSDORFF, 1997; HARRUS; BARK; WANER, 1997).

A reação de IFI vem sendo largamente utilizada no diagnóstico da ehrlichiose desde 1972, sendo aplicável tanto para estudos de infecções experimentais, como para estudos epidemiológicos de infecção natural por *E. canis* (SILVA, 2001; ANDRÉ *et al.*, 2003; TAKAHIRA *et al.*, 2003; NAKAGHI, 2004) e *E. platys* (TAKAHIRA *et al.*, 2003). Os antígenos utilizados geralmente são procedentes do cultivo de células infectadas com *E. canis*, havendo mínima reação cruzada entre as espécies, exceto entre *E. canis* e *E. equi* (WOODY; HOSKINS, 1991).

Mais recentemente, outros testes, como “Dot Elisa”, Immunocomb (Biogal, Israel) e o “Snap 3D+ assay” (IDEXX Laboratories Inc., USA), têm sido referidos pelos pesquisadores brasileiros (CASTRO, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2000; SILVA, 2001; FRANÇOIS *et al.*, 2002; ANDRÉ *et al.*, 2003; DAGNONE *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004; NAKAGHI, 2004).

Pela IFI a frequência de ocorrência de ehrlichiose canina obtida situa-se entre 63,3% e 66,7% (ORÍÁ, 2001; NAKAGHI, 2004), enquanto no Dot-Elisa detectou-se positividade de 70% a 92,31% dos cães com suspeita da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2000; ORÍÁ, 2001; NAKAGHI, 2004).

O Dot-Elisa é considerado uma técnica mais sensível, ainda que a análise estatística não mostre diferença significativa (MACHADO, 2004), mas não deixa de ser uma técnica rápida, de baixo custo e fácil de ser empregada para o diagnóstico da ehrlichiose canina na rotina clínica.

Em cães infectados experimentalmente, o período para a detecção de anticorpos se inicia entre oito e 24 dias, embora devido à variação da resposta individual alguns cães não se apresentem soropositivos até 28 dias após a infecção. A soropositividade chega a níveis máximos após 80 dias, persistindo em casos não tratados. Contudo, às vezes os títulos aumentam com o início do tratamento e declinam após três a seis meses. A persistência do título de anticorpos por períodos maiores que seis meses após tratamento adequado, pode indicar que o agente não foi totalmente eliminado do organismo, havendo também a possibilidade de infecção subclínica ou reinfeção (WOODY; HOSKINS, 1991). O título pode variar de acordo com o estágio da infecção, com o envolvimento imunológico e a raça do cão. Assim, títulos de anticorpos de alta magnitude geralmente refletem uma infecção crônica (SWANGO; BANKEMPE; KONG, 1989).

Um título positivo pela IFI indica somente que o animal foi exposto, entretanto um título positivo associado a uma história clínica compatível, a achados físicos e a testes laboratoriais adicionais, ajudam substantivamente no diagnóstico (WOLDEHIWET; RISTIC, 1993). Apesar da grande sensibilidade e especificidade do teste de imunofluorescência indireta a ocorrência de reação cruzada entre *A. platys* e *E. canis* foi relatada por Rikihisa (1991).

A *E. canis* pode ser cultivada *in vitro* em células DH82 (*dog histiocytosis*), linhagem originária de monócitos caninos, que foi adaptada em cultivo celular a partir de células obtidas de um caso de histiocitoma (WELLMAN *et al.*, 1988).

2.2.5 Prevalência

Devido à ampla distribuição do seu principal vetor (*Rhipicephalus sanguineus*), a erlichiose é considerada uma das mais importantes doenças infecciosas de cães no Brasil. Dados regionais demonstram que a maioria dos cães atendidos em hospitais e clínicas

veterinárias reagem com antígenos de *E. canis* e/ou foram positivos para o *E. canis* quando avaliados pela reação em cadeia da polimerase (TRAPP *et al.*, 2002, DAGNONE *et al.*, 2003, LABARTHE *et al.*, 2003, BULLA *et al.*, 2004; SOUSA, 2006).

Em um estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto (nested PCR) e indireto (Dot-ELISA e RIFI), a frequência de ocorrência de *Ehrlichia canis* obtida pela RIFI situa-se entre 63,3 % (NAKAGHI, 2004) e 66,7 % (ORIÁ, 2001), enquanto que no Dot-ELISA variou de 70% (NAKAGHI, 2004) a 92,3% (OLIVEIRA *et al.*, 2000; ORIÁ, 2001). Essas diferenças não foram consideradas significativas.

Apesar dos diversos relatos sobre erlichiose em cães, a prevalência da doença ainda não foi determinada, sobretudo porque a maioria dos estudos com *E. canis* em cães refere-se a populações atendidas em hospitais veterinários ou infecções experimentais.

2.3 Trombocitopenia cíclica canina (TCC)

2.3.1 Etiologia

O agente etiológico da Ehrlichiose Trombocítica Canina (ETC) ou Trombocitopenia Cíclica Canina (TCC) é a *Anaplasma platys* anteriormente denominada *Ehrlichia platys* (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978; FRENCH; HARVEY, 1983), uma bactéria que infecta as plaquetas do cão, podendo eventualmente infectar também leucócitos. Em esfregaços corados com Giemsa é visualizada como inclusões basofílicas no interior de plaquetas.

Embora o envolvimento do carrapato *R. sanguineus* na transmissão do *A. platys* tenha sido sugerida e a presença de *A. platys* neste carrapato tenha sido verificada através da técnica de PCR (INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000), ainda não foi possível comprovar experimentalmente a transmissão (BREITSCHWERDT, 2004).

2.3.2 Patogenia

A maioria dos relatos de TTC refere-se a uma enfermidade benigna ou de gravidade moderada, com poucos sinais clínicos evidentes. Conseqüentemente *A. platys* não é considerado um organismo muito patogênico. No entanto outras investigações apontam para quadros clínicos mais graves, semelhantes àqueles descritos para *E. canis* (CHANG; PAN, 1996; HARVEY, 1998; INOKUMA *et al.*, 2002).

A infecção por *A. platys* no cão é caracterizada por trombocitopenia cíclica com um grande número de plaquetas parasitadas na fase inicial. Alguns dias após a infecção há uma diminuição brusca no número de plaquetas e a *A. platys* desaparece da circulação. A contagem plaquetária retorna a valores próximos aos de referência em aproximadamente quatro dias. A parasitemia e a trombocitopenia subseqüentes tendem a ocorrer periodicamente em intervalos de uma a duas semanas. Por este motivo, a doença também é conhecida como trombocitopenia cíclica canina. Com a diminuição do número de plaquetas infectadas a trombocitopenia pode continuar severa ou diminuir de intensidade (BREITSCHWERDT, 2004). Os sinais clínicos geralmente não são muito evidentes e começam após um período de incubação de oito a 15 dias (BEAUFILS, 1999).

A co-infecção por *A. platys* e *E. canis* é comum (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978; HOSKINS, 1991a; HARRUS *et al.*, 1997a,b; BREITSCHWERDT, 2004).

2.3.3 Diagnóstico Clínico:

Os sinais incluem febre, depressão e anorexia (RIKIHISA, 1991) com possibilidade de alterações digestivas e hemostáticas, porém menos freqüentes (BEAUFILS, 1999).

Observa-se trombocitopenia cíclica em intervalos de 10 a 14 dias, discreta anemia normocítica normocrômica arregenerativa, leucopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia em cães infectados experimentalmente (BREITSCHWERDT, 2004).

Glaze; Stephen (1986) descreveram um caso de uveíte bilateral, anemia arregenerativa e trombocitopenia associada a *E. platys* em cão da raça *Chow-chow* que apresentava título para *E. platys* e não para *E. canis*.

2.3.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é feito utilizando-se os mesmos métodos utilizados para *E. canis*. Devido a parasitemia ser cíclica e geralmente baixa, a infecção é dificilmente detectada em esfregaço hematológico, sendo as mórulas encontradas incidentalmente (INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2001; BREITSCHWERDT, 1995).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é o método mais confiável para confirmação do diagnóstico porque a sorologia apresenta reações cruzadas com outras espécies (CHANG; PAN, 1996).

2.4.4 Prevalência

A incidência de *A. platys* no Brasil é descrita como sendo baixa (MACIEIRA *et al.*, 2005), no entanto não há estudos epidemiológicos para caracterização da prevalência em todas as regiões. Alguns estudos apontam para infecções concomitantes com *E. canis* (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978; HOSKINS, 1991a; HARRUS *et al.*, 1997a,b; BREITSCHWERDT, 2004).

2.4 Borreliose canina

2.4.1 Etiologia

Causada por uma bactéria patogênica ainda não isolada de nenhum caso suspeito de borreliose canina no Brasil, a espiroqueta *Borrelia burgdorferi* spp. (e talvez também outros espiroquetídeos) pode acometer mamíferos silvestres, domésticos e seres humanos, além de aves (HOOGSTRAAL, 1979; STEERE, 1989). O que é comumente descrito como borreliose canina pode tratar-se, na realidade, tanto da borreliose de Lyme - em sua forma clínica clássica - como de borreliose de Lyme *simile*. A borreliose canina é considerada uma zoonose e uma antropozoonose nos Estados Unidos, Europa e Ásia. Quando em humanos é denominada borreliose de Lyme ou Doença de Lyme, além de outras sinonímias (como Artrite de Lyme etc.). Ao complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato* pertencem as espécies *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (que reproduz a síndrome clínica borreliose de Lyme em sua forma clássica), *B. garinii* e *B. afzelli*, além de outras espécies de *Borrelia* spp.. Outros espiroquetídeos e a *Borrelia* spp. podem estar envolvidos no desenvolvimento da síndrome clínica similar, a borreliose de Lyme *simile*. A distribuição geográfica dessas bactérias é confirmada somente no Hemisfério Norte (América do Norte, Europa e Ásia). Não há registro de manifestação clínica de borreliose de Lyme *simile* em animais no Brasil, embora se esteja atento a possibilidade de sua ocorrência (FONSECA, 2005).

Há possivelmente o envolvimento de outros espiroquetídeos no desenvolvimento de borreliose de Lyme *similar*.

Membro da ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae* distingue-se morfológicamente de *Leptospira* e *Treponema*, por serem maiores, com maior número de flagelos periplasmáticos e menor quantidade de espiras (PFISTER *et al.* 1994, QUINN *et al.* 1994).

As espiroquetas do gênero *Borrelia* são microaerófilas (AUSTIN, 1993), o que as distingue dos demais gêneros, pois a maioria é aeróbica e se reproduzem por fissão binária transversal. Coram-se facilmente pelos corantes derivados da anilina e do Romanovski, são gram negativas, crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais e podem ser visualizadas através de microscopia de campo escuro, de contraste de fase ou ainda em tecidos, quando por colorações à base de prata (BARBOUR; HAYES, 1986, QUINN *et al.* 1994).

Considerando as diferenças etiológicas e os aspectos clínicos e laboratoriais, quando comparada com a borreliose de Lyme norte-americana ou européia, a infecção no Brasil deve ser referida como borreliose de Lyme *similar* (YOSHINARI *et al.*, 2003).

Até o momento o agente etiológico no Brasil não foi isolado (SOARES *et al.*, 2000) e os prováveis carrapatos responsáveis pelo ciclo silvestre pertencem aos gêneros *Ixodes*, enquanto que o gênero *Amblyomma* estaria implicado na transmissão a animais domésticos e seres humanos (SOARES *et al.*, 2000; YOSHINARI *et al.*, 2003).

A presença de anticorpos contra *B. burgdorferi lato sensu* em cães de áreas rurais do Rio de Janeiro foi inicialmente relatada por O'Dwyer *et al.* (2004). Os resultados sugerem a presença do agente na região e a possibilidade da ocorrência de borreliose de Lyme *similar* tanto em animais quanto em humanos. É possível que nessas áreas os carrapatos do gênero *Amblyomma*, até mesmo por não apresentarem especificidade de hospedeiro e estarem bem dispersos no ambiente, sejam transmissores (O'DWYER *et al.*, 2004).

2.4.2 Patogenia

Como não há registro de manifestação clínica de borreliose de Lyme *similar* em animais no Brasil (FONSECA, 2005), o estudo de sua patogenia baseia-se na doença em seres humanos, que inicia-se com a inoculação de espiroquetas pelo carrapato vetor através de mordedura, sendo necessário um tempo de fixação no hospedeiro superior a 48 horas para que o carrapato vetor possa transmitir *Borrelia* spp (PIESMAN *et al.*, 1987; FALCO; FISH, 1988,1989; FALCO; DANIELS; FISH, 1995).

Após penetrarem a pele, estes espiroquetídeos, embora sendo bactérias predominantemente extra-celulares, invadem as células endoteliais e daí penetram os tecidos (BARBOUR; FISH, 1993). No momento da transmissão, a saliva do carrapato exerce ainda ações farmacológicas, como o bloqueio de células fagocitárias e inflamatórias, facilitando a penetração e disseminação do patógeno (RIBEIRO *et al.*, 1987; URIOSTE *et al.*, 1994).

Embora o principal modo de transmissão seja por carrapatos, há relatos de transmissão pela urina entre roedores, por transfusão sanguínea, transplante de tecidos, por contato ou congenitamente em cães (SOARES *et al.*, 2000).

Na progressão clínica da borreliose de Lyme consideram-se habitualmente três fases (HANEFELD *et al.*, 1989; ÅSBRINK; HOVMARK, 1991; GUSTAVSON, 1994): primária ou de infecção localizada; secundária ou de infecção disseminada recente; e terciária, de doença crônica. Com base neste estadiamento e a partir de um inquérito distribuído a clínicos de diversas especialidades, foi proposta na "4ª Conferência Internacional sobre Borreliose de

Lyme”, realizada em 1990 em Estocolmo (ÅSBRINK; HOVMARK, 1991), uma classificação em que se incluem as fases primária e secundária na borreliose de Lyme recente, sendo a fase terciária a de infecção tardia.

A fase primária ou de infecção localizada corresponde ao desenvolvimento de eritema crônico migrante (EMC) ou eritema migratório recidivante (EMR) que surge no local da inoculação após um período médio de incubação de 1-5 semanas como manifestação predominante (KANTOR, 1994) e patognomônica (STEERE *et al.*, 1977). Evolui para a cura espontânea e a sua duração transitória e normalmente assintomática torna-o imperceptível por grande número de doentes. Pode acompanhar-se de debilidade no estado geral, febre, cefaléias, outros sintomas inespecíficos ou ainda linfadenopatia regional sem qualquer repercussão sistêmica (BOURÉE, 1990 apud FRANCA, 2000).

O quadro reumatológico representado por cerca de metade dos indivíduos não tratados é comumente designado “artrite de Lyme” e engloba desde queixas subjetivas de dores articulares e periarticulares à artropatia crônica erosiva, passando por crises intermitentes ou persistentes de artrite propriamente dita (HERZER, 1991; STEERE; SCHOEN; TAYLOR, 1987). Outros quadros reumatológicos desta fase incluem queixas associadas a fibromialgia que podem prolongar-se depois da cura bacteriológica da infecção, dando origem à chamada síndrome pós-Lyme (FRANCA, 2000).

A identificação de *B. burgdorferi lato sensu* foi já efetuada a partir de lesões cutâneas, bem como de líquido sinovial, líquido e miocárdio. O seu isolamento em diversos outros tecidos orgânicos entre os quais fígado, baço, músculos e ossos evidencia o envolvimento de outros órgãos e, conseqüentemente, o vasto espectro clínico da borreliose de Lyme (ÅSBRINK; HOVMARK, 1990; GUSTAVSON, 1994).

A fase terciária inclui as manifestações clínicas que se mantêm, de forma persistente ou recorrente, por 6 a 12 meses do início da infecção. Após um período de latência mais ou menos prolongado (de meses ou anos), a doença evolui para uma fase tardia, caracterizada por manifestações crônicas, persistentes, graves, de prognóstico reservado (HANEFELD *et al.*, 1989). A acrodermatite crônica atrófica (ACA) é o sinal patognomônico desta fase (ÅSBRINK; HOVMARK, 1990; GUSTAVSON, 1994).

A síndrome pós-Lyme consiste na persistência de queixas, após antibioticoterapia adequada para a qual evoluem cerca de 15% dos doentes norte-americanos. Fadiga crônica, déficits cognitivos, cefaléias, artrite e parestesias ou disestesias das extremidades são algumas dessas queixas (FRANCA, 2000).

2.4.3 Diagnóstico clínico

As borrelias patogênicas conhecidas determinam cinco grupos de enfermidades distintas: (a) febre recorrente epidêmica humana, causada pela *B. recurrentis*, e febre recorrente endêmica, com mais de 20 espécies, até recentemente nominadas de acordo com o carrapato transmissor; (b) borreliose aviária, a qual é determinada por uma única espécie, a *B. anserina*, e causa processo anemiante febril, apatia e altas taxas de morbidade nas aves; (c) borreliose bovina, causada pela *B. theileri*; (d) aborto enzoótico bovino, enfermidade que acomete bovinos e cervídeos, determinada pela *B. coriaceae*; (e) borreliose de Lyme (ou doença de Lyme) e borreliose de Lyme *simile*, as quais são causadas pelo grupo da *B. burgdorferi lato sensu* (SOARES et al., 2000).

O espectro de apresentação clínica desta enfermidade difere conforme as regiões geográficas, associando-se às características antigênicas da *Borrelia* spp. encontradas no local, assim como da interação destas com o ecossistema e o vetor presente nesta região. Na América do Norte há predomínio de manifestações cutâneas e articulares; no continente Europeu predominam as manifestações cutâneas e neurológicas; e na Ásia a sintomatologia é,

basicamente cutânea (YOSHINARI *et al.*, 1995; SOARES *et al.*, 2000). Em qualquer situação o eritema migratório recidivante (EMR) é o mais relevante achado, permitindo a suspeita clínica em seres humanos (BERGER *et al.*, 1983).

Os principais sintomas clínicos associados a Borreliose em cães no hemisfério norte, além da apatia e anorexia, são a poliartrite aguda (mais comum), incapacidade locomotora, febre e linfadenopatia (NELSON; COUTO, 2001d), podendo haver o comprometimento das articulações com um quadro de artrite progressiva (LISSMAN *et al.*, 1984; LEVY; DRESSEN, 1992;).

2.4.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da borreliose de Lyme e Lyme *símile* tem sido realizado através de testes sorológicos como o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto, embora outras técnicas como a imunofluorescência, *immunoblotting* e o PCR também sejam utilizadas (GRODZICKI; STEERE 1988, LIENBLING *et al.* 1993) em associação com sintomas clínicos e fatores epidemiológicos, uma vez que o isolamento através de líquidos orgânicos e secreções é difícil em decorrência das exigências nutricionais da espiroqueta (STEERE, 1989; YOSHINARI *et al.*, 2003).

2.4.5 Prevalência

No Brasil, estudos soroepidemiológicos de borrelioses foram realizados em humanos (YOSHINARI *et al.*, 1993,1995) em cães (JOPPERT, 1995; SOARES *et al.*, 1999; JOPPERT; HAGIWARA; YOSHINARI, 2001; O'DWYER *et al.*,2004) e em bovinos (ISHIKAWA, 1996, FONSECA *et al.*, 1996), e a soroprevalência em todos os estudos apresentam valores próximos aos reportados em áreas endêmicas na América do Norte (GREENE, 1990).

Estudos conduzidos por Joppert; Hagiwara; Yoshinari (2001) na cidade de São Paulo, revelaram que 9,7% dos animais foram sororeagentes pelo teste ELISA indireto. Em cães de áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro, O'Dwyer *et al.* (2004) encontraram 15,85% de animais soropositivos também pelo teste de ELISA indireto. Valores próximos (20%) foram obtidos por Soares *et al.* (1999) em 150 cães procedentes de área urbana de municípios da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro. Prevalência superior (48,25%) foi encontrada por ALVES *et al.* (2004) em cães da região metropolitana do Rio de Janeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e amostragem

A partir de um cão, fêmea, SRD, adulto jovem, alojado em uma baia coletiva do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho (CCZ) em Santa Cruz, Zona Oeste da Cidade do Rio de Janeiro, apresentando apatia, anorexia, febre e corrimento óculo-nasal, sinais estes inespecíficos, mas sugestivos da infecção pelo vírus da Cinomose (*Canine Distemper Virus* - CDV), determinou-se a população total e procedeu-se ao cálculo da amostragem representativa a ser estudada.

A amostragem foi calculada a partir do resultado encontrado para prevalência de 2,07% para cinomose em Maringá – Paraná (BORBA *et al.*, 2002) considerando uma população de 125 cães com precisão de 95% utilizando-se a fórmula $1/n = 1/n_j + 1/N$ (PEREIRA, 2001).

Em que:

n = tamanho da amostra

N= tamanho da população amostrada

n_j (tamanho da amostra em uma população infinita) = $Z^2 \times PQ/L^2$ (Q=1-P)

P = Prevalência

L=Precisão desejada

Z= 1,96 (para 95% de precisão).

Assim em uma população de 125 cães sem raça definida (SRD), acautelados no CCZ e alojados em baias coletivas, foram selecionados aleatoriamente 38 animais, machos e fêmeas de diferentes idades e histórico de vacinação desconhecido, como amostragem para posterior colheita de sangue e investigação da presença ou ausência de aspectos clínicos e laboratoriais de cinomose, ehrlichiose e borreliose.

3.2 Amostras de sangue:

Amostras pareadas de sangue foram obtidas por punção da veia jugular ou cefálica em frascos a vácuo com e sem anticoagulante (ácido etileno-diamino-tetra-acético 11% - EDTA). O sangue colhido sem anticoagulante foi colocado em suporte inclinado e deixado em repouso a temperatura ambiente para coagular espontaneamente.

A seguir foi obtido o soro mediante centrifugação a 2.621 x g, sendo posteriormente dividido em alíquotas e estocado em freezer a temperatura de 20°C negativos. No momento do uso, os soros foram descongelados em temperatura ambiente e analisados para detecção de anticorpos específicos anti *Ehrlichia canis*, anti *Borrelia burgdorferi lato sensu* e para detecção qualitativa do antígeno do vírus da Cinomose.

3.2.1 Hemograma:

A partir do sangue colhido com EDTA foram determinados o Volume Globular (VG), a concentração de Hemoglobina (Hb), a Hematimetria (Hm), a Leucometria global, a Plaquetometria e os índices hematimétricos Volume Globular Médio (VGM) e Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) através de método eletrônico pelo aparelho Coulter T - 890.

Do plasma obtido por centrifugação foram determinadas as concentrações de proteínas plasmáticas totais (PPT) por refratometria.

A leucometria específica foi determinada por extensão do sangue total em superfície de lâmina, corada por coloração pancrômica e analisada em microscopia óptica objetiva de imersão segundo Jain (1986).

3.2.2 Provas complementares ao hemograma:

Como provas complementares foi realizada a pesquisa de hematozoários e corpúsculos de inclusão de Lentz em extensão sangüínea de capa leucocitária em todos os animais.

Mediante avaliação do hematócrito, ao ser detectada a presença de anemia, realizou-se pesquisa de reticulócitos através de esfregaço sangüíneo em superfície de lâmina corado com azul de cresil brilhante.

3.2.3 Imunoensaio cromatográfico para pesquisa de antígenos da Cinomose:

Para detecção de antígenos do vírus causador da Cinomose utilizou-se o teste “Anigen Rapid CDV Ag Test Kit”, um imunoensaio cromatográfico para a detecção qualitativa do antígeno do vírus da Cinomose conforme recomendação do fabricante¹.

As amostras congeladas a 20°C negativos foram descongeladas à temperatura ambiente. À seguir adicionou-se duas gotas de soro num tubo de amostra contendo 300 µL de diluente (tampão de extração), homogeneizando-se em seguida. Removeu-se o dispositivo de teste da embalagem, colocando-o numa superfície plana, seca e limpa e, utilizando-se a pipeta que acompanhava o teste, quatro gotas da solução amostra acrescida do diluente foram adicionadas vagarosamente no orifício do dispositivo. Quando o teste começou a reagir (após um minuto), uma linha controle colorida foi visualizada na parte esquerda da janela (C) de resultado mostrando que o teste estava funcionando devidamente. O resultado do teste foi interpretado entre cinco e doze minutos, sendo considerados positivos aqueles testes em que foi observada na parte direita da janela de resultado uma outra linha colorida, indicando o resultado do teste (T); em caso negativo, esta última linha não era visualizada.

3.2.4 Pesquisa de anticorpos anti *Ehrlichia canis*

Para o diagnóstico sorológico de Ehrlichiose Canina (*Ehrlichia canis*) realizou-se o teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) segundo Aguiar *et al.* (2007), utilizando-se o antígeno brasileiro de *E. canis* amostra São Paulo (AGUIAR; HAGIWARA; LABRUNA, 2008).

Utilizou-se 5 microlitros da amostra de soro em teste, realizando-se uma diluição inicial de 1:40 em solução de tampão fosfato (*Phosphate buffered saline* –PBS) acrescido de 1% de soroalbumina bovina. A seguir, depositou-se 10 microlitros dessa solução em cada poço da lâmina contendo o antígeno de *E. canis* e levou-se para uma estufa a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. Após esse intervalo de tempo, realizaram-se três lavagens de cinco minutos cada nas lâminas com o mesmo PBS, porém desta vez sem soroalbumina. Procedeu-se a secagem em temperatura ambiente. Preparou-se o conjugado anti-IgG de cão na diluição 1:600 em PBS acrescido de 1% de soroalbumina bovina. Novamente colocou-se 10 microlitros em cada poço e levou-se para a estufa, nas mesmas condições anteriormente descritas, porém em câmara escura, por 30 minutos, e em seguida repetiu-se o processo de lavagem e secagem. Após a secagem adicionou-se glicerina tamponada pH 8,0 e procedeu-se à leitura em microscópio de imunofluorescência.

¹ Anigen Rapid CDV Ag Test Kit - Bioeasy

3.2.5 Pesquisa de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi*

A detecção de anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi* foi efetuado através de teste sorológico ELISA indireto, segundo metodologia desenvolvida por Soares et al. (1999), descrita a seguir.

Para a sensibilização das microplacas de poliestireno, com 96 orifícios, foi utilizado antígeno de *B.burgdorferi* cepa G39/40 diluído a 15 µg/ml em tampão carbonato pH 9,6. As placas foram incubadas em câmara úmida a 4°C *overnight*.

Após sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS *Tween* 20 a 0,05%, pH 7,4 (PBS T20), e bloqueadas com gelatina a 1% em PBS T 20 , por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Ao final do bloqueio foram realizadas novas lavagens das placas, como descrito anteriormente.

Foram utilizados 12 soros controles negativos e um soro controle positivo de animal inoculado experimentalmente. Todos os soros, incluindo os controles positivos e negativos, foram diluídos a 1:800 em PBS T20, em duplicata. Após a adição dos soros, as placas foram novamente incubadas, por uma hora e meia e lavadas. Em seguida, foi adicionado conjugado anti IgG de cão ligado a fosfatase alcalina, na diluição de 1:5.000 em PBS T20, com posterior incubação por uma hora e lavagem. Em todas as fases descritas foram utilizadas 200 µL de solução por orifício.

A revelação das reações foi feita com a adição de solução reveladora constituída de para-nitro-fenil-fosfato de sódio diluída em tampão glicina, pH 10,5 na concentração de 1 mg/ml. A leitura foi feita em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (*Microplate Reader model 450, Bio-Rad Laboratories*), utilizando filtro para comprimento de onda de 405 nm.

Os pontos de corte (*cutoff* ou “cut off”) para os dois ensaios foram determinados segundo metodologia descrita por Frey; Canzio; Zurakowski (1998), utilizando a distribuição t-Student, sendo a fórmula matemática expressa como o desvio-padrão multiplicado por um fator que é baseado no número de controles negativos e no intervalo de confiança:

$$\text{Cutoff} = \bar{X} + \text{SD} \sqrt{1 + (1/n)}$$

Em que:

\bar{X} = Média das leituras dos soros controles negativos

SD= Desvio-padrão

t : valor para a distribuição t, baseado em n e no nível de confiança desejado

n : número de controles negativos

Para cada placa, o ponto de corte foi calculado com 12 soros controle negativos, sendo o nível de confiança de 99,0% e valor de t igual a 2,829, segundo tabela com valores para t - distribuição para cálculo de ponto de corte (FREY; CANZIO; ZURAKOWSKI, 1998).

Para corrigir o efeito da variação das densidades ópticas (D.Os) entre ensaios, os resultados foram expressos como o índice da DO de cada soro teste sobre a linha de corte (“cut off”) da respectiva placa (D.O. soro teste x 100/”cut-off”), segundo Araújo *et al.* (2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Relato de caso

Um cão, fêmea, SRD, adulto jovem, alojado em uma baía coletiva do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho (CCZ) – Santa Cruz (Zona Oeste da Cidade do Rio de Janeiro), apresentando apatia, anorexia, febre e corrimento óculo-nasal, foi o único animal com resultado positivo na pesquisa de antígenos contra CDV em material obtido através de *swab* da conjuntiva ocular e soro sanguíneo.

O hemograma revelou a ocorrência de anemia (VG 29%, hematimetria $4,5 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hemoglobina 9,5g/dL) do tipo normocítica (VCM 64,2) normocrômica (CHCM 32,8) e trombocitopenia (64×10^3 plaquetas / μL).

Em esfregaço de sangue em superfície de lâmina observou-se em plaquetas, a presença de estruturas com morfologia compatível com *Anaplasma platys*.

Ainda que ao esfregaço de sangue não tenham sido identificadas estruturas com morfologia sugestiva de *Ehrlichia canis*, a pesquisa de anticorpos contra *Ehrlichia* spp. pela reação de Imunofluorescência Indireta (IFI ou RIFI), foi positiva indicando a presença de anticorpos contra *Ehrlichia canis* cepa São Paulo, utilizado no teste.

Em outro animal que co-habitava com este primeiro identificou-se que os parâmetros do eritrograma estavam dentro da normalidade, mas a contagem de plaquetas estava baixa ($34 \times 10^3/\mu\text{L}$).

No esfregaço de sangue identificou-se igualmente, a presença de estruturas com morfologia compatível com *A. platys* em plaquetas e reação positiva na pesquisa de anticorpos contra *E. canis* pela RIFI. A pesquisa de antígenos pelo teste de cinomose, foi negativa e não foram observados corpúsculos de inclusão.

O teste de IFI apresenta grande sensibilidade e especificidade contudo a ocorrência de reação cruzada entre *E. canis* e *A. platys* é possível (RIKIHISA, 1991) e ainda, reações inespecíficas podem ocorrer com *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. muris*, *E. ewingii* e uma cepa de *Ehrlichia* isolada de um carrapato *Ixodes ovatus* no Japão (INOKUMA et al., 2001).

Ainda que não se possa excluir a possibilidade do animal ter entrado em contato com estas outras espécies, o resultado indicou que houve infecção por *E. canis* cepa São Paulo.

4.2 Hemograma

4.2.1 Eritrograma e contagem de plaquetas

O eritrograma de acordo com JAIN (1993) pode ser dividido em contagem do número de hemácias (hematimetria), determinação da concentração de hemoglobina, porcentagem de hemácias por volume de sangue (hematócrito ou volume globular), determinação dos índices hematimétricos (volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média). Em conjunto ou isoladamente, a diminuição desses parâmetros indica anemia (COLES, 1984; JAIN, 1993; LATIMER et al., 2003).

No exame hematológico dos 38 animais avaliados, os valores médios de VG (36,4%) e Hemoglobina (11,9g/dL) ficaram ligeiramente abaixo dos índices considerados normais para a espécie (COLES, 1984; JAIN, 1993; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997; GARCIA NAVARRO; PACHALY, 1994; LATIMER et al., 2003), enquanto que a Hematimetria em média ($5,6 \times 10^6/\mu\text{L}$) se manteve no limite mínimo da normalidade para a espécie ($5,5 \times 10^6/\mu\text{L}$). Por outro lado, a contagem de plaquetas ficou em média abaixo da normalidade ($105 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Os valores médios, o desvio padrão, a amplitude de variação (valores máximos e mínimos) dos parâmetros hematológicos estão representados na Tabela 01.

Tabela 1. Média, desvio padrão, amplitude de variação (máximo e mínimo) dos parâmetros hematológicos de 38 cães naturalmente infectados com *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* em relação aos valores de referência (MEINKOTH; CLINKENBEARD, 2000).

PARÂMETROS AVALIADOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	VALORES DE REFERÊNCIA
Volume globular %	36,4	6,59	25,5	51,5	37 - 55
Hemácias x 10 ⁶ / μL	5,6	1	3,9	7,6	5,5 – 8,5
Hemoglobina g/Dl	11,9	2,16	8,4	16,8	12 – 18
VCM fL	64,3	3,4	57,9	71,9	60-77
CHCM %	32,7	1,18	29,5	35,9	31-36
Plaquetas x 10 ³ /μL	105	75,6	13	364	200- 500
Leucócitos /μL	14.915	6.784	5.300	40.100	6.000 – 17.000
Neutrófilos jovens / μL	142	219	0	107	0 – 300
Neutrófilos totais /μL	10.580	5.401	4.187	32.882	3.000 – 11.800
Neutrófilos segmentados /μL	10.438	5.336	4.081	32.882	3000 – 11.500
Linfócitos /μL	3.035	2.585	441	10.912	1.000 – 4.800
Monócitos /μL	577	442	63	2.170	150 – 1.350
Eosinófilos /μL	715	791	0	3374	100 – 1250
Basófilos /μL	3	21	0	127	Raros

Individualmente, as principais alterações identificadas no hemograma dos 38 animais foram anemia (57,9%) e trombocitopenia (86,8%).

Devido aos valores baixos do hematócrito (19/38), hematimetria (16/38) e/ou hemoglobina (16/38), indicativos de anemia (COLES, 1984; JAIN, 1986), confirmou-se anemia em 19 (57,9%) cães confirmando achados de Moreira et al. (2003) e Albernaz et al. (2007) cujos índices foram respectivamente 70,3% e 60,73% nos cães pesquisados.

Houve predominância de anemia normocítica normocrômica em 78,95% dos animais (15/19). Anemia microcítica normocrômica (3/19) e normocítica hipocrômica (1/19) foram também identificadas.

Segundo Nelson; Couto (2001) a contagem de reticulócitos permite classificar as anemias quanto à resposta da medula óssea em regenerativas (com resposta) e não regenerativas (arregenerativas ou aplásicas - sem resposta). A resposta medular, pode ser avaliada através do cálculo do índice de reticulócitos (IR) ou ainda em relação a seus valores absolutos. Em um cão, se o IR for superior a 2,5%, a anemia é regenerativa; se for inferior a 2,5%, a anemia é arregenerativa. Quanto aos valores absolutos, se a contagem for maior que 60.000 a 100.000/μL e a anemia não for grave, a anemia provavelmente é regenerativa.

Dos 19 animais com VG abaixo da normalidade, foi realizada a contagem de reticulócitos em números absolutos e porcentagem em relação ao número e hemácias. A presença de reticulócitos em porcentagem menor (11/19) ou igual a 1% (2/19) foi verificada na maioria (68,4%) dos animais, indicando anemia sem resposta da medula óssea. Pelo mesmo princípio, se fosse utilizado um índice superior a 2%, 78,5% dos animais (15/19) apresentariam um quadro de anemia não regenerativa.

Utilizando-se os valores absolutos de reticulócitos para avaliação da resposta medular, repetiu-se o resultado obtido quando a porcentagem foi menor ou igual a 1% (13/19), correspondente a 68,4% de animais portadores de anemia sem resposta da medula óssea ou

não regenerativa, caracterizada morfológicamente como normocítica normocrômica (GARCIA NAVARRO; PACHALY, 1994).

Por outro lado, o cálculo do Índice de Produção de Reticulócitos (IR), obtido a partir da contagem de reticulócitos em função do VG do paciente e do VG normal {contagem de reticulócitos X (VG do paciente / VG normal)}, implicaria em um número maior de animais com anemia sem resposta (89,5%), já que esse índice foi menor que 2,5%. Nesse cálculo, o valor médio de 45% é geralmente usado como hematócrito normal para o cão. Esse valor médio de VG é baseado em dados internacionais, e pode não corresponder à realidade brasileira, cabendo ao clínico a partir de suas observações quanto a evolução clínica do caso, decidir quanto ao critério a ser utilizado para avaliação da resposta medular.

Anemia normocítica normocrômica e a insuficiente resposta medular ao processo anêmico, identificados na maioria dos casos são consistentes com os achados comuns em casos naturais e experimentais de erlichiose (CASTRO, 1997; ALMOSNY, 1998; CASTRO *et al.*, 2004; ALMOSNY *et al.*, 2000; PAGANI *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2000; SILVA, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003; MACHADO, 2004; CASTRO *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2005; SOUSA, 2006; ALBERNAZ *et al.* 2007), cujos índices de anemia não regenerativa nos cães pesquisados variaram de 60,7% (ALBERNAZ *et al.*, 2007) a 77,9% (MENDONÇA *et al.*, 2005). Em oposição, Codner; Farris-Smith (1986) relataram a não observação de anemia em dez cães com infecção subclínica de erlichiose (Citado por Sousa, 2006).

Em estudos experimentais com *E. canis* trombocitopenia e anemia normocítica normocrômica foram observadas em cães inoculados a partir da segunda semana pós-inoculação (CASTRO, 1997; MOREIRA *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004; NAKAGHI, 2004; HASEGAWA, 2005; ALBERNAZ *et al.*, 2007). Também Almosny (1998) identificou redução significativa dos valores eritrocitários de cães infectados experimentalmente com *E. canis*, a partir da primeira semana e com menores valores entre a quinta e sétima semanas. No entanto, plaquetopenias não acentuadas foram observadas na fase aguda da doença.

As anemias não regenerativas podem ser decorrentes de uma produção eritróide insuficiente associada a doenças medulares idiopáticas, hipoplasia ou aplasia medular causada por exposição a toxinas ou medicamentos, e na deficiência de eritropoetina nos casos de insuficiência renal crônica. Ocorre ainda nas inflamações e infecções crônicas e nas infecções virais (GARCIA NAVARRO; PACHALY, 1994).

Segundo Nelson; Couto (2001c) a anemia normocítica normocrômica arregenerativa origina-se de supressão da medula óssea ou como reação orgânica na doença crônica. Quadros hemolíticos não regenerativos foram observados em cães com crises agudas nos quais ainda não houvera tempo para a liberação de hemácias jovens na circulação (o que pode levar até 3 dias), casos de doença medular primária com conseqüente supressão da mielopoese, doença medular infiltrativa, deficiência nutricional (hipoferremia) ou destruição imune dos precursores eritróides na medula óssea (STOKOL *et al.*, 2000). Assim, embora seja comum em casos de erlichiose a anemia normocítica normocrômica arregenerativa pode estar relacionada a outras enfermidades não identificada por ocasião do exame físico.

A utilização da contagem de plaquetas como teste de triagem para a infecção por *E. canis* foi proposta por Troy; Forrester (1990) devido a alta prevalência de trombocitopenia em cães infectados naturalmente.

A contagem de plaquetas ficou abaixo de $200 \times 10^3 / \mu\text{L}$ em 34 animais (89,5%), confirmando a relevância da trombocitopenia nas diferentes fases da infecção por *E. canis* relatada por Bulla *et al.* (2004), cujos resultados indicam uma relação inversa entre o grau de trombocitopenia e a fase da infecção natural por *E. canis*. Trombocitopenia foi também o achado laboratorial mais freqüente na fase subclínica da infecção experimental, associada com altos títulos de anticorpos contra *E. canis* em cães (WANER *et al.*, 1997). No entanto estudos realizados por MACIEIRA *et al.* (2005) reforçam a idéia de que a trombocitopenia não deve

ser utilizada como critério único para estabelecer um diagnóstico de ehrlichiose, mesmo em uma área geográfica alta prevalência da doença.

Anemia não regenerativa e trombocitopenia foram as principais alterações de patologia clínica observadas em cães adultos, livres de infecção, inoculados com *E. canis* (BRANDÃO, 2005).

A trombocitopenia na fase aguda pode ocorrer por aumento no consumo de plaquetas pelo endotélio vascular inflamado, aumento no seqüestro esplênico e destruição imunomediada ou por diminuição da vida média das plaquetas (HARRUS *et al.*, 1999). Foi proposto que a infecção por *E. canis* em cães altera o sistema imunológico, resultando em um excesso de anticorpos anti-plaquetas, o que seria uma das principais causas de trombocitopenia embora outros mecanismos não mediados imunologicamente também possam estar envolvidos (HARRUS *et al.*, 1996). Ocorre também alteração na função das plaquetas, com muitos animais apresentando sangramento superficial, mesmo com o número de plaquetas e perfil de coagulação normais (HARRUS *et al.*, 1999). Após a fase aguda o animal pode se curar, ou entrar na fase subclínica, onde os sinais clínicos desaparecem, mas a riquétsia se mantém no organismo. Cães com resposta imunológica insuficiente tem maior predisposição a desenvolver a forma crônica da doença (HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986).

Na média os índices hematimétricos VCM (64,3 fL) e CHCM (32,7%) que caracterizam respectivamente o diâmetro (VCM) e a quantidade de hemoglobina (CHCM) das hemácias foram normais solidificando a anemia normocítica normocrômica como um importante achado deste trabalho.

A infecção por *Anaplasma platys* caracteriza-se por trombocitopenia cíclica com um grande número de plaquetas parasitadas na fase inicial. Alguns dias após a infecção há uma diminuição brusca no número de plaquetas e os parasitos desaparecem da circulação. A contagem plaquetária retorna a valores próximos aos de referência em aproximadamente quatro dias. A parasitemia e a trombocitopenia subseqüentes tendem a ocorrer periodicamente em intervalos de uma a duas semanas. Com a diminuição do número de plaquetas infectadas a trombocitopenia pode continuar severa ou diminuir de intensidade (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Um estudo recente (FERREIRA *et al.*, 2007) em que se buscou confirmar através de técnicas moleculares o diagnóstico de *A. platys* demonstrou que a análise morfológica do esfregaço sanguíneo é uma boa alternativa para o diagnóstico de *A. platys*.

4.2.2 Leucograma

Conforme demonstrado na Tabela 1, ocorreu uma grande amplitude de variação nos valores dos constituintes hematológicos, tanto do eritrograma quanto do leucograma nos animais estudados.

Com relação ao leucograma, os valores médios do número de leucócitos, embora na faixa de normalidade (14.915), apresentaram uma amplitude de variação muito grande (mínimo 5.300 e máximo 40.100). Esta variação provavelmente se deve a fatores individuais como raça, idade, sexo, gestação, lactação, nutrição ou medicamentos (FENNER; GIBBS; MURPHY, 1993), a fatores inerentes a patogenicidade do agente infeccioso, ao estágio da infecção ou à presença de co-infecções (COLES, 1984; JAIN, 1993; LATIMER *et al.*, 2003; GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2003; SWANSON *et al.*, 2004).

Embora a leucopenia seja referida como uma alteração hematológica característica da infecção por *E. canis* (BUHLES Jr.; HUXSOLL; HILDEBRANDT, 1975; KUEHN; GAUNT, 1985; WANER *et al.*, 1997; ANDEREG; PASSOS, 1999; STILES, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; TROY; SILVA *et al.*, 2005), no presente estudo, foi observada

em apenas um animal (2,63%), que apresentava os valores eritrocitários normais, mas com trombocitopenia, e foi positivo para *A. platys*.

Os valores de leucograma dos animais estudados no presente estudo estão de acordo com os relatos de Mendonça *et al.* (2005) que observaram valores leucométricos médios dentro da normalidade com considerável amplitude de variação, a exemplo do que havia sido observado anteriormente por Waddle; Littman (1987) e Meinkoth; Clinkenbeard (2000). E ainda os resultados obtidos neste estudo podem ser justificados pelos resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2000) e Castro *et al.* (2004) que demonstram que a leucopenia pode não ser bem evidenciada até a quarta semana de infecção quando a supressão medular é marcante.

Por outro lado, leucocitose ocorreu em 23,7% (9/38) dos cães avaliados (Tabela 2), todos positivos para *E. canis* pela RIFI, sendo três com infecção por *A. platys* diagnosticada pelo esfregaço e dois com infecção concomitante por *A. platys* e *E. canis*.

A elevação dos leucócitos nestes casos pode estar relacionada a infecções secundárias ou co-infecção com outros agentes não estudados conforme sugerido por Latimer *et al.* (2003); González; Scheffer (2003) e Swanson *et al.* (2004).

Tabela 2. Número e porcentagem de animais com parâmetros leucocitários normais, diminuídos e aumentados segundo os valores de referência (JAIN, 1986).

	Normal		Aumentado		Diminuído	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Leucócitos / μ L	28	73,7	9	23,7	1	2,6
Neutrófilos jovens / μ L	33	86,8	5	13,2	0	0
Neutrófilos totais / μ L	26	68,4	13	34,2	0	0
Neutrófilos segmentados / μ L	27	71,1	11	28,9	0	0
Linfócitos / μ L	26	68,4	6	15,8	6	15,8
Monócitos / μ L	30	78,9	1	2,6	7	18,4
Eosinófilos / μ L	23	60,5	8	21,1	7	18,4
Basófilos / μ L	37	97,4	1	2,6	0	0

Destaca-se que à exceção dos primeiros animais avaliados e de outros oito que apresentavam ligeira elevação da temperatura, não necessariamente febre de causa infecciosa (FEITOSA, 2004), os demais, embora convivendo no mesmo ambiente, eram assintomáticos. Este fato remete ao número de animais que reagiram ao teste sorológico para *E. canis* e ao elevado número de animais positivos tanto para *E. canis* quanto para *A. platys* ao esfregaço. Embora o achado de apenas um animal com leucopenia e a maioria (73,7%) com contagem leucocitária normal (Tabela 2) seja diferente da maioria dos autores que apontam entre 25% (KUEHN; GAUNT, 1985) e 78% (WANER *et al.*, 1997) de leucopenia em cães com infecção por *E. canis*, consideramos normal estes resultados, por tratar-se de animais em diferentes fases da infecção e nenhum com evidência clínica da fase terminal.

Em cães com *E. canis* e/ou *A. platys* diagnosticadas a partir de mórulas em esfregaços sanguíneos não foi demonstrada diferença significativa nos achados hematológicos que foram inespecíficos ocorrendo tanto anemia, leucopenia e trombocitopenia, quanto normalidade ou aumento das células, a exemplo do que foi relatado por Sousa (2006).

Esses dados são ainda justificados em estudos que indicam que as alterações no leucograma são discretas ou inexistentes na fase aguda da infecção por *E. canis* (CASTRO, 1997; ALMOSNY, 1998; ANDEREG; PASSOS, 1999; STILES, 2000), evoluindo para profunda leucopenia na fase crônica e terminal (BUHLES Jr. *et al.*, 1975; ANDEREG; PASSOS, 1999; STILES, 2000; TROY; FORRESTER, 1990; SILVA *et al.*, 2005).

Usando modelos estatísticos Harrus *et al.* (1997a) concluíram que anemia grave, leucopenia severa, pancitopenia, tendência para sangrar foram importantes indicadores de sobrevivência em casos ehrlichiose monocítica em cães.

4.3. Provas complementares ao hemograma

Baseou-se o diagnóstico dos hemoparasitos no achado de mórulas em leucócitos, em sua maioria monócitos e em plaquetas (SMITH *et al.*, 1975; LABRUNA; PEREIRA, 2001; INOKUMA *et al.*, 2001).

Embora sejam descritas dificuldades no diagnóstico de *A. platys* através da observação de mórulas em esfregaço sanguíneo devido ao caráter cíclico da parasitemia (BREITSCHWERDT, 1995; INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000), neste estudo foi identificado, através do esfregaço de sangue cinco cães positivos para *E. canis* (13,2%) e 23 para *A. platys* (60,5%), sendo quatro (10,5%) com infecções por ambos os agentes.

A co-infecção por *A. platys* e *E. canis* é considerada comum e foi relatada em diferentes países (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978; HOSKINS, 1991a; HARRUS *et al.*, 1997a,b; BREITSCHWERDT, 2004) incluindo o Brasil (BULLA *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2003; DAGNONE *et al.*, 2003; SOUSA, 2006).

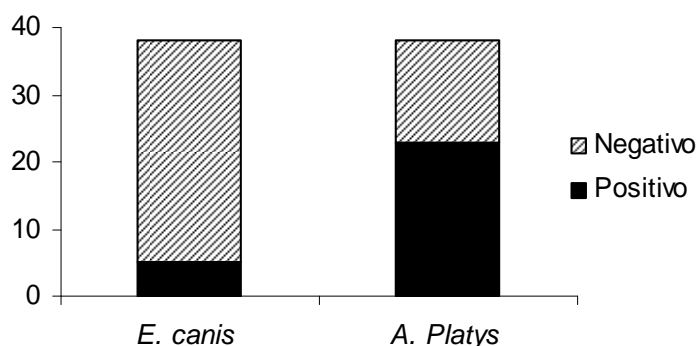


Figura 1. Frequência de amostras positivas e negativas para pesquisa de *Ehrlichia canis* e *A. platys* em esfregaço de sangue corado em 38 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Santa Cruz, RJ, em janeiro e fevereiro de 2008.

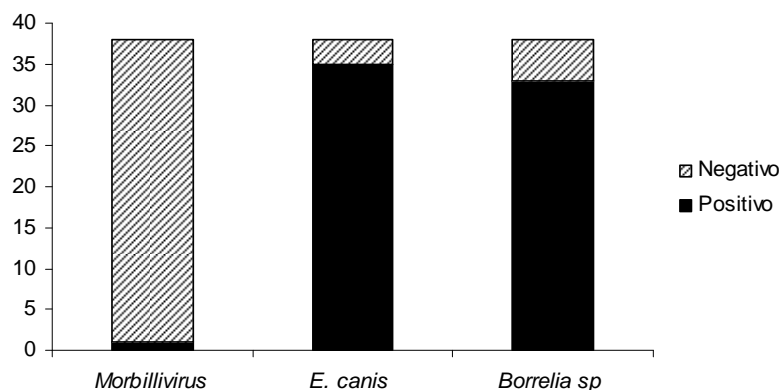


Figura 2: Frequência de amostras positivas e negativas quanto a pesquisa de antígenos da cinomose (*Morbillivirus*) e anticorpos anti *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi* em

amostras de sangue de 38 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Santa Cruz, RJ, em janeiro e fevereiro de 2008.

O número de animais positivos para *A. platys* e *E. canis* no esfregaço foi elevada, especialmente para *A. platys* e indica uma alta prevalência de infecção subclínica entre os cães avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Número de animais positivos e negativos para pesquisa de anticorpos anti *E. canis* pelo teste de Imunofluorescência indireta em relação a titulação em 38 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Santa Cruz, RJ, em janeiro e fevereiro de 2008.

Títulos de anticorpos	Número de animais
Negativos	3
40	1
80	1
160	1
320	1
1.280	8
10.240	10
20.480	8
40.960	5

A infecção por agentes da erlichiose em cães foi relatada inicialmente em Belo Horizonte (COSTA *et al.*, 1973) e posteriormente, acometendo aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias de Estados das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste (LABARTHE *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003).

Os cinco cães com resultados positivos para *E. canis* ao esfregaço sanguíneo foram também positivos para o mesmo agente pela reação de imunofluorescência indireta (IFI), que detectou a presença de anticorpos contra *E. canis* em 35 dos 38 (92,1%) animais avaliados. Destes, 22 apresentaram ao esfregaço sanguíneo a presença de estruturas com morfologia compatível com *A. platys* em plaquetas.

Neste estudo, animais com estado nutricional variando de bom a ruim, mas com boa disposição e ativos, apresentaram titulações de anticorpos para mais de uma enfermidade além da presença de estruturas compatíveis com *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* em esfregaços sanguíneos. Como é provável reação cruzada com *A. platys* ao teste IFI, é possível que nestes casos os animais apresentassem resposta imunológica devido contato prévio com ambos os agentes etiológicos.

Animais acautelados em canis dividindo baias coletivas estão expostos a uma situação de “stress” pela própria condição de co-habitação. Mesmo dispendo de um bom manejo, disputas por água e alimento podem ocorrer. Além disso, uma situação de histórico de vacinação desconhecido predispõe que os animais suscetíveis contraíam doenças e as desenvolvam de forma clínica, subclínica ou crônica. Essas condições favorecem um estado de imunossupressão que possibilita co-infecções.

4.4 Imunoensaio cromatográfico para pesquisa de antígenos da cinomose:

Do total de cães avaliados apenas um – o que deu origem a este estudo - foi positivo para a presença de antígenos da cinomose tanto em amostra de conjuntiva ocular quanto em amostra de soro.

O diagnóstico da infecção pelo vírus da cinomose é de difícil realização e geralmente é fundamentado nos sinais clínicos. O diagnóstico pode ser confirmado pela identificação de corpúsculos de inclusão em células associadas a exsudatos, em células epiteliais e em células sangüíneas, porém sua ausência não exclui a infecção por este vírus (GREENE; APPEL, 1998; JONES *et al.*, 2000). Apesar das inclusões de Lentz já terem sido descritas em outras células (HEADLEY; GRAÇA, 2000) além das sangüíneas, Batista *et al.* (2000) e Alleman *et al.* (1992) relataram a presença pouco freqüente de corpúsculos de inclusão em cães com cinomose.

Considerando-se os resultados encontrados por Hartmann *et al.* (2007) em estudo também realizado com cães de canis municipais, sem raça definida, de diferentes faixas etárias e com histórico de vacinação desconhecido, porém utilizando-se a pesquisa de anticorpos neutralizantes através do teste de soroneutralização, a maioria não apresentou anticorpos, indicando assim não ter havido contato com o antígeno do vírus da cinomose por infecção natural e nem por imunização prévia, segundo conclusão dos autores.

Dezengrini *et al.* (2007) em estudo utilizando teste de soroneutralização, porém com cães sabidamente não vacinados contra cinomose, também observou que a maioria não apresentava anticorpos neutralizantes. Segundo estes autores essa ausência os deixava expostos a infecção pelo vírus da cinomose.

Nos cães do presente estudo, o vírus estava presente no ambiente através do animal positivo, contudo como os demais foram negativos considera-se a hipótese de que, ao contrário dos estudos anteriormente citados, estes cães estivessem naturalmente imunizados com titulação suficiente de anticorpos neutralizantes impedindo que desenvolvessem a infecção ou que estivessem com infecção subclínica, uma vez que 25 a 75% dos animais susceptíveis desenvolvem e eliminam o vírus no ambiente (APPEL; SUMMERS, 1999).

Um estudo epidemiológico realizado no Brasil (BORBA *et al.*, 2002), aponta para uma baixa taxa de infecção (2,07%) entre animais atendidos em clínicas veterinárias de Maringá no Paraná entre 1998 e 2001 e para a maior frequência de casos no inverno. Índices superiores (11,7%) também foram relatados no Brasil e as diferenças decorrem da especificidade do método investigatório utilizado, da fase da doença, do estado imunológico dos animais avaliados e das condições locais (HEADLEY; GRAÇA, 2000).

Neste estudo o percentual de animais positivos (2,63% - 1/38) embora próximo do obtido por Borba *et al.* (2002), contrariaram as expectativas em função do tipo das condições da população estudada.

Os sinais clínicos da cinomose canina podem variar de acordo com a virulência da estirpe viral infectante, com o estado imunológico e com a idade do animal. Com maior frequência são observadas alterações oculares, respiratórias, gastrointestinais e neurológicas. Esses sinais podem, isoladamente ou em associação, ser encontrados em outras doenças infecciosas, dificultando o diagnóstico clínico (GEBARA *et al.*, 2004).

Neste caso, o mesmo animal positivo para cinomose foi também positivo para *A. platys* em esfregaço de sangue e para *E. canis* obteve-se um título de 1:40 na pesquisa de anticorpos para este agente, confirmando a similaridade das manifestações clínicas das enfermidades aqui estudadas e a possibilidade de co-infecções. Tanto erlichiose, quanto cinomose evoluem com sintomas inespecíficos como apatia, febre, corrimento nasal e ocular.

Neste estudo, as principais alterações de patologia clínica encontradas foram anemia normocítica normocrômica sem resposta medular e trombocitopenia, em semelhança ao estudo sobre o perfil hematológico de cães com cinomose desenvolvido por Silva *et al.* (2005). No entanto pela pesquisa de antígenos no soro, somente um animal foi positivo, sendo

pouco provável que essas alterações sejam decorrentes da Cinomose. Porém não se pode excluir a possibilidade de infecção pelo vírus, considerando que o antígeno somente pode ser detectado em animais com viremia, que ocorre do 3º ao 10º dia após o contágio (CATROXO, 2003) e se manifesta clinicamente por febre e apatia, entre outros sinais de comprometimento sistêmico, o que não foi comum entre os animais deste estudo, embora co-habitassem com o único animal positivo e sintomático.

Procedimentos normais de limpeza e desinfecção são geralmente eficazes contra o vírus da cinomose, que apresenta alta sensibilidade a desinfetantes comuns como hipoclorito e formalina (HOSKINS, 2004). Apesar disso a presença de um animal infectado já representa risco para os demais que convivem com ele no mesmo ambiente, especialmente por tratar-se de uma doença crônica pouco imunogênica, com comprometimento de diversos órgãos e sistemas. É importante atentar que o paciente com cinomose pode manifestar diversos quadros clínicos isolados ou em conjunto, independentes, múltiplos ou únicos e que não é rara a prevalência de quadros de cinomose não diagnosticados.

4.5 Pesquisa de anticorpos anti *Ehrlichia canis*

Trinta e cinco animais (92,1%) apresentaram pelo teste de IFI, a presença de anticorpos contra o antígeno brasileiro de *E. canis* amostra São Paulo.

O diagnóstico laboratorial da infecção por *E. canis* tem sido rotineiramente realizado pela identificação direta de mórulas de *E. canis* em amostras de sangue periférico, porém mais facilmente encontradas em cães experimentalmente infectados e em períodos de pico febril, na fase aguda da doença (CASTRO, 1997; ALMOSNY, 1998; SILVA, 2001; CASTRO *et al.*, 2004). Na fase crônica dificilmente as mórulas são encontradas em esfregaços sangüíneos (WOODY; HOSKINS, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2000; KRYM *et al.*, 2002; OLICHESKI *et al.*, 2002; LEITE; RIBEIRO, 2003; NAKAGHI, 2004), sendo necessários testes sorológicos ou moleculares para confirmação da suspeita clínica.

Cinco cães positivos para *E. canis* no esfregaço de sangue foram também positivos pela reação de imunofluorescência indireta, que detectou a presença de anticorpos contra *E. canis* em 35 (92,1%) dos 38 animais avaliados, sendo 22 identificados como positivos para *A. platys* devido a presença de estruturas com morfologia compatível em plaquetas.

O grande número de animais assintomáticos positivos para *A. platys* e *E. canis* no esfregaço, especialmente *A. platys* indica uma alta prevalência de infecção subclínica entre os animais avaliados, em semelhança com dados obtidos por French; Harvey (1983) e Huang *et al.* (2005), com amostras de sangue de cães clinicamente sadios, pelas técnicas de PCR e pesquisa indireta de anticorpos fluorescentes respectivamente.

A frequência de animais positivos ao esfregaço foi maior que a encontrada por Moreira *et al.* (2003) em estudo retrospectivo da casuística clínica de erliquiose em cães atendidos em Belo Horizonte, onde 16% dos animais com suspeita de hemoparasitoses foram diagnosticados com *E. canis* e 10,8% com *A. platys* por meio de exame parasitológico direto de esfregaços sangüíneos.

Quanto a presença de anticorpos para o antígeno de *E. canis* os dados obtidos estão dentro das perspectivas apontadas para a América do Norte (BRADFIELD *et al.*, 1996) e Brasil (AGUIAR *et al.*, 2007).

Dos 38 soros avaliados, 33 foram positivos (87%) com títulos de 1:40 (1/38), 1:80 (1/38), 1:160 (1/38), 1:320 (1/38), 1:1.280 (8), 1:10.240 (10/38), 1:20.480 (8/38) e 1:40.960 (5/38), evidenciando um nível elevado de anticorpos contra *E. canis* (Figura 03).

Apesar de ser confirmatória, a pesquisa de hemoparasitos em esfregaços de sangue apresenta limitações importantes pela baixa sensibilidade, já que nas fases subclínica e crônica a visualização de corpúsculos e mórulas pode ficar dificultada, em virtude de baixa

parasitemia (MOREIRA et al., 2005). Nestes casos pode-se usar como método diagnóstico os testes para detecção de anticorpos para *E. canis* a RIFI que apresentam excelente especificidade e grande sensibilidade na fase crônica (TROY; FORRESTER, 1990; ELIAS, 1992; EGENVALL; HEDHAMMAR; BJOERSDORFF, 1997; HARRUS; BARK; WANER, 1997).

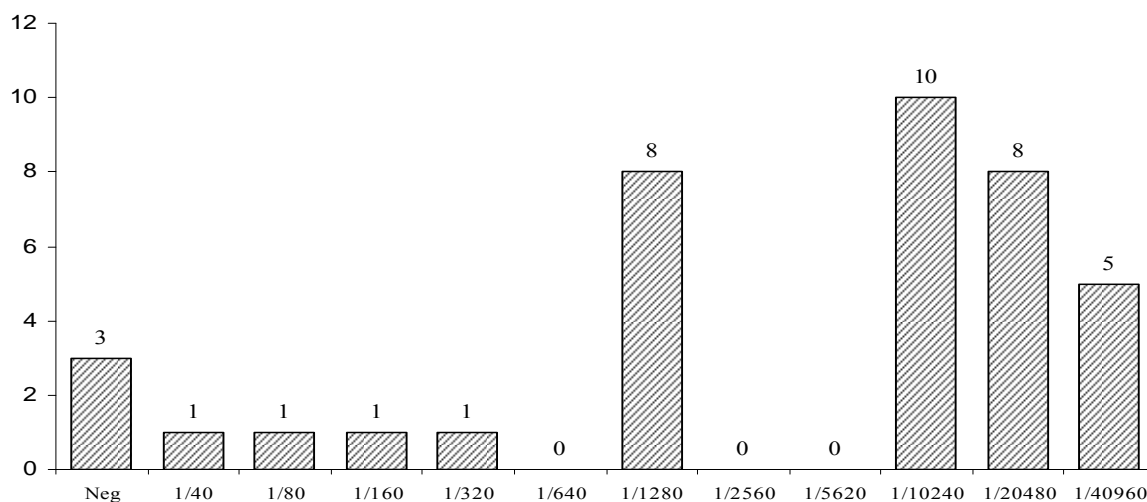


Figura 03: Amostras positivas e negativas em relação aos títulos de anticorpos anti *E. canis* pelo teste de Imunofluorescência indireta de 38 cães do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho em Santa Cruz, Zona Oeste do Rio de Janeiro, em janeiro e fevereiro de 2008.

4.6. Pesquisa de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi*

Dos 38 soros avaliados, 33 foram positivos (86,8%) (Figura 2 e Apêndice) para anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi* superiores aos já relatados no Brasil, tanto pelo método de ELISA indireto utilizado neste estudo (JOPPERT; HAGIWARA; YOSHINARI, 2001; O'DWYER *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2004) quanto pela técnica de ELISA em que se utiliza o “kit” diagnóstico Snap 3 Dx® - IDEXX Laboratories. (CARLOS *et al.*, 2007).

Enquanto que pelo teste ELISA indireto Joppert; Hagiwara; Yoshinari (2001) encontraram 9,7% de sororeagentes na cidade de São Paulo, Carlos et al. (2007) utilizando o “kit” ELISA, observaram positividade de apenas 1% dos animais estudados.

Em áreas rurais de sete municípios do Estado Rio de Janeiro, O'Dwyer *et al.* (2004) encontraram 15,85% de cães soropositivos. Entre cães de área urbana procedentes de municípios da Baixada Fluminense, também no Rio de Janeiro, Soares *et al.* (1999) encontraram positividade de 20%. Prevalência superior foi encontrada por ALVES *et al.* (2004) em cães domiciliados na região metropolitana do Rio de Janeiro, sendo 48,25% dos animais positivos.

Embora a ocorrência clínica de borreliose de Lyme não tenha sido relatada no Brasil, deve-se considerar que a presença de anticorpos indica exposição prévia ao agente e que o animal infectado pode representar um risco para a disseminação da enfermidade, especialmente considerando a ampla distribuição do carrapato vetor.

A existência de reação cruzada entre *Borrelia* sp. e *Leptospira* sp. tem sido relatada, porém não sendo significativa (WELLS *et al.*, 1993).

Neste estudo, os animais estavam acautelados em um centro de controle de zoonoses. Contudo, a origem dos mesmos era desconhecida e na maioria os animais foram apreendidos em áreas urbanas, o que reforça a possibilidade de funcionarem como disseminadores da espiroqueta tanto para outros animais da espécie quanto para o homem.

Na borreliose de Lyme, o cão pode atuar como sentinela epidemiológica, albergando a espiroqueta, comportando-se como reservatório no ambiente domiciliar, favorecendo, assim, ao carrapato veicular o patógeno até o homem e outros animais (APPEL, 1990; BOSLER; 1993; MATHER *et al.*, 1994). Assim, como os sintomas se assemelham aos de outras enfermidades e não há um amplo esclarecimento sobre a borreliose entre médicos e veterinários a presença de animais sororeagentes deve ser considerada como um fator relevante.

4.7. Infecções múltiplas:

Nos últimos anos, relatos de casos de co-infecção com múltiplos organismos causadores da “doença do carrapato” em cães e humanos foram publicados. No entanto, as consequências de co-infecção não foram bem estabelecidas, em comparação com a infecção com um único organismo.

Infecção simultânea com múltiplos agentes pode apresentar maior diversidade de sinais clínicos do que quando apenas um patógeno transmissível por carrapato é considerado (KORDICK *et al.*, 1999).

Em estudo realizado por Kordick *et al.* (1999) com 27 cães, 26 foram sororeativos para *Ehrlichia* sp., 16 para *Babesia canis*, 25 para *Bartonella vinsonii*, e 22 para *Rickettsia rickettsii*.

Um estudo com provas de PCR em amostras de sangue de cães enfermos encaminhados ao hospital do sudeste da Virginia (EUA) identificou que cães sororeativos para *E. canis* estavam infectadas com quatro espécies de *Ehrlichia* spp.: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi*, e *E. ewingii* e a infecção simultânea com *E. canis*, *E. ewingii*, e *E. equi* foi documentada em um cão (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998).

A co-infecção tripla pelos agentes da cinomose, erliquiose e toxoplasmose em um cão com acentuado quadro clínico neuropático foi relatada por Moretti *et al.* (2006). Os autores discutem a cinomose como doença primária e a associação com erliquiose baseando-se em dados clínicos, epidemiológicos, no protocolo imunoprofilático inadequado e no papel daquelas doenças na imunossupressão. A cinomose e a erliquiose foram diagnosticadas mediante a situação epidemiológica da região e sinais clínicos compatíveis, aliados aos achados de hemograma e citologia.

A ocorrência de toxoplasmose, neosporose, coccidiose, enterite viral, criptosporidiose e giardíase pode ser intensificada pelos efeitos imunossupressores da infecção concomitante pelo vírus da cinomose (HOSKINS, 2004). O mesmo parece acontecer com relação à bactéria causadora da ehrlichiose canina.

Segundo Harrus *et al.* (1996) a infecção combinada entre *A. platys* e *E. canis* é comum, o que também sugere que a infecção por *E. canis* contribui para a patogenia de *A. platys*. Neste estudo somente um animal foi negativo para todas as enfermidades, sendo a maioria (23/38) positivos para mais de dois agentes.

Quadro 1. Resultados encontrados na sorologia para *Morbillivirus* (cinomose), *Ehrlichia canis* e *Borrelia* sp e identificação de estruturas características de *Ehrlichia* sp e *Anaplasma* sp em esfregaços sanguíneos de 38 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Santa Cruz, RJ, em janeiro e fevereiro de 2008.

Cães	<i>Morbillivirus</i>	<i>Ehrlichia</i> sp (RIFI)	<i>Borrelia</i> sp (ELISA)	<i>Ehrlichia</i> sp (Esfregaço)	<i>Anaplasma</i> sp (Esfregaço)
1	+	+	-	-	+
2	-	+	-	-	+
3	-	+	+	-	+
4	-	+	+	-	+
5	-	+	+	-	+
6	-	+	+	-	+
7	-	-	+	-	+
8	-	+	+	-	-
9	-	+	+	-	+
10	-	+	-	-	+
11	-	+	+	+	+
12	-	+	+	-	+
13	-	+	+	-	+
14	-	+	+	-	+
15	-	+	+	-	-
16	-	+	+	-	+
17	-	+	+	-	-
18	-	+	+	-	-
19	-	+	+	-	-
20	-	-	+	-	-
21	-	+	+	-	-
22	-	+	+	-	+
23	-	+	+	-	-
24	-	+	+	-	+
25	-	+	+	-	+
26	-	+	+	-	-
27	-	+	+	+	+
28	-	+	+	-	+
29	-	+	+	-	+
30	-	+	+	+	-
31	-	+	+	-	-
32	-	+	+	-	-
33	-	+	+	-	-
34	-	+	+	+	+
35	-	+	-	-	+
36	-	+	+	+	+
37	-	+	+	-	-
38	-	-	-	-	-

5 CONCLUSÕES

O número elevado de animais positivos para *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* à análise morfológica em esfregaço sanguíneo, porém assintomáticos, indica uma alta prevalência de infecção subclínica entre os cães acutelados no Centro de Controle de Zoonoses Paulo Dacorso Filho.

A presença de um animal positivo para o vírus da cinomose e a ausência de outros casos clínicos indica a possibilidade de os cães estarem naturalmente imunizados ou doentes em uma fase em que não fosse possível detectar antígenos no soro sanguíneo.

A presença de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi*, indica a possibilidade de exposição prévia ao agente – que ainda não foi observado no Brasil – ou de reação cruzada com espiroqueta do gênero *Borrelia*.

Cães mantidos nas condições do presente estudo estão predispostos a múltiplas infecções, exigindo esforço e atenção redobrados dos clínicos para efetivação de diagnóstico e controle de enfermidades.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D.M.; SAITO, B.E.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.37, n.3, p. 796-802, 2007.
- AGUIAR, D.M.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. No prelo 2008.
- ALBERNAZ, A.P., MIRANDA, F.J.B.; MELO Jr., O.A.; MACHADO, J.A.; FAJARDO, H.V. Erliquiose Canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v.8, n.4, p. 799-806. 2007.
- ALEX, P.C.; DHANAPALAN, P. Distemper encephalitis in dogs: incidence, symptomatology and electroencephalographic findings. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*. v.25, p. 127-131, 1994.
- ALLEMAN, A.R.; CHRISTOPHER, M.M.; STEINER, D.A. et al., Identification of intracytoplasmic inclusion bodies in mononuclear cells from the cerebrospinal fluid of dog with canine distemper. *Veterinary Pathology*, v.29, p. 84-85, 1992.
- ALMOSNY, N.R.P. Trombocitopenias. *Boletim Anclivepa – RJ*, n.9. 2006.
- ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis (DONATIEN E LESTOQUARD, 1935): avaliação parasitológica, hematológica, bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados*. Seropédica, 1998. 115 p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária, UFRRJ.
- ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L.; SILVA, G.V.O.; RODRIGUES, L.M.; XAVIER, M.S. Avaliação hematológica de cães infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 7, n. suplemento, p.111-111, 2000.
- ALVES, A.L.; MADUREIRA, R.C.; SILVA, R.A.; CORRÊA, F.N.; BOTTEON, R.C.C.M. Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, n.4, p.203-206, 2004.
- ALVES, L.; LINHARES, G. F. C., CHAVES, N.S.T.; MONTEIRO, L.C.; LINHARES, D.C.L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. *Ciência Animal Brasileira*, v. 6, n.1, p.49-54, 2005.
- AMUDE, A.M.; CARVALHO, G.A.; BALARIN, A.R.S.; ARIAS, M.V.B.; REIS, A.C.F.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Encefalomielite pelo vírus da cinomose canina em cães sem sinais sistêmicos da doença - estudos preliminares em três casos. *Clínica Veterinária*, São Paulo, v.60, p.60-66, 2006.
- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Ante mortem Diagnosis of CDV Infection by RT-PCR in Distemper Dogs with Neurological Deficits without the Typical Clinical Presentation. *Veterinary Research Communications*, v.30, p.679-687, 2006.
- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Clinicopathological findings of distemper encephalomyelitis in dogs presented without usual signs of the disease. *Research in Veterinary Science*, v.82, no prelo, 2007.
- ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose canina: revisão. *Clínica Veterinária*, São Paulo, v.4, n.18, p.31-38. 1999.

ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z.; HIGA, A.C.; PEREIRA, G.T. Detecção de anticorpos anti-Ehrlichia canis pelas técnicas de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Dot-ELISA correlacionando-as aos achados clínicos e hematológicos em cães naturalmente infectados. In: *Congresso de Iniciação Científica, 15º, Marília. Anais do 15º Congresso de Iniciação Científica de Marília*: Universidade Estadual Paulista, 2003. 1 CD-Rom.

APPEL, M.J.G. Pathogenesis of canine distemper. *American Journal of Veterinary Research*, v.30, p.1167-1182, 1969.

APPEL, J.G. Lyme disease in dogs and cats. *Compendium*, v.12, n.5, p.617.1990.

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, A. Patogenicity of morbilliviroses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 187-191, 1995.

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine distemper: current status. In: CARMICHAEL, L.E. Recent advances in canine infectious diseases. Ithaca, NY: *International Veterinary Information Service*, 1999. p.6

APPEL, M.J.G.; YATES, R.A.; FOLEY, G.L. BERNSTEIN, J.J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L.H.; MILLER, L.D.; ARP, L.H.; ANDERSON, M.; BARR, M.; PEARCE-KELLING, S.; SUMMERS, B.A. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.6, p.277-288, 1994.

ARAÚJO, F.R.; MELO, V.S.P.; RAMOS, C.A.N.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; KESSLER, R.H.; ALMEIDA, N.F.; ARAÚJO, G.S.; ALVES, L.C.; JÚNIOR, R.A.A.T.; FRAGOSO, S.P.; ARAUCO, P.R.C.; BACANELLI, G.; OLIVEIRA, M.B.; SANTOS, L.R. Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.100, n.7, p. 765-769, 2005.

ÅSBRINK, E.; HOVMARK, A. Comments on the Course and Classification of Lyme Borreliosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v.77, p. 41-43. 1991.

ÅSBRINK, E.; HOVMARK, A. Lyme Borreliosis: Aspects of Tick-Borne *Borrelia burgdorferi* Infection From a Dermatologic Viewpoint. *Seminar Dermatology*, v.9, p. 277-291. 1990.

AUSTIN, F.E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4 % oxygen – 5% carbon dioxide *in vitro*. *Canadian Journal of Microbiology*. V. 39, p. 1103-1110. 1993.

BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, v.50, n.4, p.381-400, 1986.

BATISTA, V.S.; MOURA, M.A; REIS, R.R.R. et al. Ocorrência de corpúsculos de Sinegaglia-Lentz em esfregaços sangüíneos de 70 cães com suspeita clínica de cinomose. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.7, p.115, 2000. Suplemento.

BAUMANN, G. Cinomose Canina. In: BEER, J. *Doenças Infeciosas em Animais Domésticos*. São Paulo: Editora Roca, 1999. p. 158-164.

BEAUFILS, J.P. Ehrlichiosis – *Ehrlichia Platys* and other *Ehrlichia* in cats and dogs. *Mondialvet99*.1999. Disponível em: <<http://www.mondialvet99.com>>. Acesso em: 08/10/2000.

BERGER, B.W.; CLEMMENSON, O.J.; ACKERMANN, A.B. Lyme disease is a spirochetosis: a review of the disease and evidence of its cause. *American Journal of Dermatopathology*. v. 5, p.111. 1983.

BLIXENKRONE-MØELLER, M. et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Veterinary Microbiology*, v.37, p.163-73, 1993.

- BORBA, T.R.; MANNIGEL; R.N.; FRAPORTI, C.K.; HEADLEY, S.A.; SAITO, T.B. Cinomose: dados epidemiológicos Maringá – PR (1998-2001). *Iniciação científica* Centro Universitário de Maringá – Cesumar, v.4, n.1, p.53-56, 2002.
- BOSLER, E.M. Tick vectors and hosts, p.18-26. In: Coyle, P.K. (ed.) *Lyme Disease*. Mosby Year Book, Boston. 1993.
- BRADFIELD, J. F.; VORE, S. J.; PRYOR, W. H. *Ehrlichia platys* infection in dogs. *Laboratory Animal Science*.v.46, p.565–568. 1996.
- BRANDÃO, L.P. *Envolvimento da resposta imune humoral no desenvolvimento da anemia e das alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas na erliquiose canina experimental*. 2005. 77 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BREITSCHWERDT, E.B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 5ª ed., v.1, p. 423-427.
- BREITSCHWERDT, E.B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C., eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 1995, p.376-383.
- BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998.
- BUHLES JR., W.C.; HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K. Tropical canine Pancytopenia: Role of Aplastic Anaemia in The Pathogenesis of Severe Disease. *Journal of Comparative Pathology*. v. 85, p.511-521. 1975.
- BULLA,C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO JR., J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.;WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*, v.35, p.141-146. 2004.
- CARDOZO, G.P.; OLIVEIRA, L.P.; ZISSOU, V.G.; DONINI, I.A.N.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M. analysis of the 16s rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.478-479, 2007.
- CARLOS, R.S.A.; MUNIZ NETA, E.S.; SPAGNOL, F.H.; OLIVEIRA, L.S.; BRITO, R.L.L.; ALBUQUERQUE, G.R.; ALMOSNY, N.R.P. Frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.16, n.3, p.117-120, 2007.
- CASTRO, M. B. *Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães por Ehrlichia canis* (DONATIEN;LESTOQUARD, 1935) ou MOSHKOVKI, 1945. 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração: Patologia Animal) – FCAV – UNESP, Jaboticabal –SP.
- 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.
- CATROXO, M.H.B . Cinomose Canina- Divulgação Técnica. *Biológico*, São Paulo, v.65, n.1/2, p.1-2, 2003.

- CHANG, W.L.; PAN, M.J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimen by two-step PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.4, p. 3142-3146, 1996.
- CHRISMAN, C.L. Neurologia dos pequenos animais. São Paulo: ed. Roca, 1985. 432 p.
- CODNER, E. C.; FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association (JAVMA)*, Schaumburg, v. 189, n.1, p. 47-50, 1986.
- COLES, E.H. *Patologia Clínica Veterinária*. São Paulo: Manole, 1984, 566 p.
- COSTA, J.O.; SILVA, M.; BATISTA JÚNIOR, J.A. *et al.* Ehrlichia canis infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. *Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG*, v.25, p.199-200, 1973.
- 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) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.22, n.2, p. 191-201, 2001.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. *Veterinary Parasitology*, Estados Unidos, v. 117, p. 285-290, 2003.
- DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil”. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.37, n.1, p.183-189. 2007.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, description of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 51, p. 2145-2165. 2001.
- EGENVALL, A.E; HEDHAMMAR, A.A; BJOERSDORFF, A.I. Clinical features and serologic of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *The Veterinary Record* v.140, n.9, p.222-226. 1997.
- EK-KOMMONEN, C.; SIHVONEN, L.; PEKKANEN, K.; RIKULA, U.; NUOTIO, L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *The Veterinary Record*, v.141, n.15, p.380-383, 1997.
- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *The Journal of Small Animal Practice*, v.33, p.540-543, 1992.
- FALCO C.R.; FISH D. Ticks parasitizing humans in a Lyme disease endemic area of southern New York State. *American Journal of Epidemiology*, v.128, p.1146-1152. 1988.
- FALCO C.R., FISH D. Potential for exposure to tick bites in recreational parks in a Lyme disease endemic area. *American Journal Public Health* . v.79, p.12-15. 1989.
- FALCO, C.R., DANIELS, T.J., FISH, D. Increase in abundance of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in an emergent Lyme disease endemic area. *Journal of Medical Entomology* .v.32, n.4, p. 522-526. 1995.

- FEITOSA, F.L.F. *Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico – Cães, Gatos, Equinos, Ruminantes e Silvestres*. Ed. Roca Ltda., 2004. São Paulo. p.76-103.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 5ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 787 p.
- FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A. *Veterinary virology*. 2.ed. California: Academic, 1993.
- FENNER, W.R. Doenças do cérebro. In: ETTINGER S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato*. 5ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. , p.586-638. 2156p.
- FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F. ; PEREIRA, A. M.; GUIMARÃES, C. M.; SÁ, A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N. R. P. *Anaplasma platys* Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. *Internal Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 5, n.3, 2007.
- FONSECA, A.H.; SALLES, R.S.; SALLES, S.A.N.; MADUREIRA, R.C.; YOSHINARI, N.H. Borreliose de Lyme *simile*: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* , v. 80, n.2, p. 1-8. 2005.
- FONSECA, A.H.; ISHIKAWA, M.M.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; YOSHINARI, N.H. Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. *Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, v. 18, n.1/2, p. 85-89,1996.
- FRANCA, I. Borreliose de Lyme: uma introdução à doença. *Trabalhos da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia*, v. 58, Suplemento, p.11-39, 2000.
- FRANÇOIS, E.P.; ARAUJO, F.A.P.; BREITSAMETER, I.; SCHERER, E.A. Avaliação do perfil sorológico de cães receptores de transfusão de sangue de doadores positivos para *Ehrlichia canis* (resultados parciais). In: *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 29º, Gramado. Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária de Gramado*, 2002. 1 CD-ROM.
- FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Serologic Diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *American Journal of Veterinary Research* , v.44, n.12, p.2407-2411, 1983.
- FREY, A.; CANZIO, J.D.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, v. 221, p. 35-41, 1998.
- FRISK, A.L.; KONIG, M.; MORITZ, A. et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper., *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.3634-3643, 1999.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J.R. *Manual de Hematologia Veterinária*. São Paulo: Varela, 1994. 169p.
- GEBARA, C.M.S. *Achados clínicos e histopatológicos em cães com diagnóstico molecular do vírus da cinomose canina*. 2002. 94f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J. et al. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos

de cinomose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.56, p.480-487, 2004.

GLASE, M.B., STEPHEN, D.G. Uveítis associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)* . v.9, p.1096-1097. 1986.

GOLDMAN, E. E.; BREITSCHWERDT, E. B.; GRINDEM, C. B.; HEGARTY, B. C.; WALLS, J. J.; DUMLER, J. S. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 12, n. 2, p. 61-70, 1998.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, 2003, Porto Alegre. *Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil*. Porto Alegre:UFRGS, 73-87, 2003.

GREENE, R.T. An update on the serodiagnosis of canine lyme borreliosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. V. 4, p.167-171, 1990.

GREENE, G.E.; APPEL, M.J. Canine distemper. In: GREENE, G.E. *Infectious diseases of the dog and the cat*. Philadelphia: W.B.Saunders, 1998. p.9-22.

GREENE, C.E.; HARVEY, J.W. Canine ehrlichiosis. *Clinical, microbiology and infectious diseases of the dog and cat*. Saunders, 1984, p. 545-557.

GREENE C.E.; APPEL M.J. Canine Distemper. In: GREENE C.E. (ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3th ed. Elsevier, St Louis. 2006. p.25-41, 1387 p.

GRODZICKI R.L.; STEERE, A.C. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *The Journal of Infectious Diseases*. v.157, n.4, p.790-797. 1988.

GRÖNE, A.; ENGELHARDT, P.; ZUBRIGGEN, A. Canine distemper virus infection: proliferation on canine footpad keratinocytes. *Veterinary Pathology*, v.40, p.574-578. 2003.

GROVES, M.G.; DENNIS,G.L.; AMYX,H.L.; HUXSOLL,D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*, v.36, n.7, p.937- 941. 1975.

GUSTAVSON, R. Epidemiological studies on Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. Oslo - Copenhagen - Stockholm, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplementum*, Scandinavian University Press, 1994;92:1-63v.

HAAS, L.; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I. et al. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany., *Virus Research*, n.48, p.165-171, 1997.

HANEFELD, F.; CHRISTEN, H.J.; BARTLAU, N; WASSMANN, K.; THOMSEN, R. Neurological Manifestations: Lyme Borreliosis in Children. In: *Stanek (ed.). Lyme Borreliosis II*. Stuttgart - New York, Gustav Fischer 1989. p. 192-202.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E., BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *The Veterinary Record*, v. 141, 1997 a.

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLIMENT, E.; WANER, T. Canine Monocytic Ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Veterinary Record*, v. 141, 1997b.

- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A.C.W. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.9, p.2745–2749, 1999.
- HARRUS, S.; WARNER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998.
- HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T.E. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update. *The Compendium Continuing Education*, v.19, n.4. p. 431-444, 1997.
- HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T.; ELDOR, A., ZWANG, E. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *The Veterinary Record*, v. 139, 1996.
- HARTMANN, T.L.S.; BATISTA, H.B.C.R.; DEZEN, D.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e da parainfluenza em cães de canis dos municípios de Novo Hamburgo e Porto Alegre, RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1178-1181, 2007.
- HARVEY, J.W. Canine Thrombocytic Ehrlichiosis. In: Greene, C.E; Harvey, J.W. (Ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Philadelphia, W.B.Saunders, p.147-149, 1998.
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic Thrombocytopenia Induced by a Rickettsia-Like Agent in Dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, v.137, n.2, p.182-188, 1978.
- HASEGAWA, M.Y. *Dinâmica da Infecção Experimental de Cães por Ehrlichia canis: Aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular*. 2005. 134 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, p.136-140, 2000.
- HERZER, P. Joint Manifestations of Lyme Borreliosis in Europe. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 77, p. 55-63. 1991.
- HIBLER, S.C.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial Infections in Dogs . Part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thombocytopenia. *Compendium on Continuing Education for The Practicing Veterinarian*, v.08, n.02, p.106-114, 1986.
- HOOGSTRAAL, H. Ticks and spirochetes. *Acta Tropica*. V.36, p.133-136, 1979.
- HOSKINS, J.D. Ehrlichial Diseases of Dogs: Diagnosis and Treatment. *Canine Practice*. v.16, n.3, p.13- 21, 1991a.
- HOSKINS, J.D.. Tick-Borne Zoonoses: Lyme Disease, Ehrlichiosis, and Rocky Mountain Spotted Fever. *The Journal of Small Animal Practice* , v.6, n.3, p.236-243,1991b.
- HOSKINS, J.D., BARTA,O.; ROTHSCMIT, T.J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*, v.183, n. 9, p. 1011-1013, 1983.
- HOSKINS, J.D. Doenças virais caninas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 5ª ed., v.1. p. 440-441.

- HUA, P.; YANG, S.; SHIDE, T.; YUHAI, M.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Isolation and identification of the causative agent of canine ehrlichiosis found in China. *Chinese Journal of Veterinary Science*, v. 19, n. 5, p. 467-470, 1999.
- 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*, v.36, n.3, p. 211-216. 2005.
- HUXSOLL, D.L. Canine Ehrlichiosis (Tropical canine Pancytopenia): A Review. *Veterinary Parasitology*, v. 2, p. 49-60, 1976.
- INOKUMA, H.; FUJII, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; BEAUFILS, J.P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon groESL and the Citrate Synthase Gene (gltA) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* , v.9, n.5, p.1132-1136. 2002.
- INOKUMA, H.; PAROLA, P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamagushi prefecture, Japan., *Veterinary Parasitology*, v. 99, p.335-339, 2001.
- INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *Journal of Clinical Microbiology* , v.38, p. 4219-4221, 2000.
- ISHIKAWA, M.M. *Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 51 p., 1996.
- JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 4 ed., Lea & Febiger, 1986, 1221 p.
- JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea and Febiger.1993. 417p.
- JONES, C.T.; HUNT, D. H.; KING, N.W. *Patologia veterinária*. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.
- JOPPERT, A.M. *Estudo soropidemiológico da infecção por Borrelia burgdorferi em cães da região de Cotia, São Paulo*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo. 83 p, 1995.
- JOPPERT, A.M.; HAGIWARA, M.K.; YOSHINARI, N.H. Antibodies in dogs from Cotia country, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v.43, n.5, p.251-255. 2001.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 1997. 5.ed. California: Academic.
- KANTOR, F.S. Disarming Lyme Disease. *Scientific American*. September, p. 20-25. 1994.
- 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*, v.37,n.8, p. 2631–2638. 1999.
- KOUTINAS, A.F.; BAUMGARTNER, W.; TONTIS, D.; POLIZOPOULOU, Z.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; LEKKAS, S. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (Hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. *Veterinary Pathology*, v.41, p.2-9. 2004.

- KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *Journal of Infectious Diseases*, v.134, n.6, p. 629-632, 1976.
- KRYM, C. M.; SALGADO, D.; FARIA, A. C.; SANTOS, F. V. Incidência da presença de mórula de *Ehrlichia* sp em células sanguíneas de sangue periférico de caninos no Distrito Federal, no período entre janeiro/ 1999 a dezembro/2001. In: *Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 23º, Brasília, 2002. Anais Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. Brasília: ANCLIVEPA-DF, 2002. 1 CD-ROM.*
- KUEHN, N.F.; GAUNT, S.D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.186, p.355–358. 1985.
- LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M., BALBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. *Veterinary Therapeutics*, Yardley, v.4, n.1, p. 67-75, 2003.
- LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; PRASSE, K. W. *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology*. 4.ed. Iowa: Iowa State Press. 2003. 448p.
- LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, n. 30, p. 24-32, 2001.
- LEITE, R.F.B.; RIBEIRO, S.C.A. Prevalência da erliquiose canina em Uberlândia MG. In: *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 30º, Manaus, 2003. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Manaus, 2003. 1 CD-ROM.*
- LEVY, S.A., DRESSEN, D.W. Lyme borreliosis in dogs. *Canine Practice*, v.17, p. 5-14, 1992.
- LIENBLING, M.R.; NISHIO, M.J.; RODRIGUEZ, A.; SIGAL, L.H.; JIN, T.; LOUIE, J.S. The polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. *Arthritis & Rheumatism*. v. 36, n.5, p.665-675. 1993.
- LISSMAN, B.A.; BOSLER, E.M.; CAMAY, H.; ORMISTON, B.G.; BENACH, J.L. Spirochetes associated with arthritis (*Lyme disease*) in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*, v.185, p. 219-220,1984.
- MACHADO, R.Z. Erliquiose canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Belo Horizonte, v. 13, n. suplemento, p. 53-57, 2004.
- MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA, A.M.; FREIRE, I.M.; LINHARES, G.F.; ALMEIDA, N.K.; ALMOSNY, N.R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology Journal*, v.34, n.1, p. 44-8. 2005.
- McBRIDE, J. W.; CORSTEVET, R. E.; GAUNT, S. D.; JRASVEC, C.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, n. 8, v. 4, p. 441-447, 1996.
- McDADE, J.E. Ehrlichiosis – a disease of Animals and Humans. *Journal Infectious Disease*, v.161, p.609-617, 1990.
- MEGID, J.; NOZAKI, C.N.; FILHO, O.A.; LIMA, C.K.; SILVA, W.B. Positividade à imunofluorescência direta (IFD) em diferentes tecidos de cães clinicamente suspeitos de Cinomose. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.7, p.114, 2000. Suplemento.

- MEINKOTH, J. H.; HOOVER, J. P.; COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; LINK, J. Ehrlichiosis in a dog with seizures and nonregenerative anemia. *Journal American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 195, n. 12, p.1754-1755, 1989.
- MEINKOTH, J.H.; CLINKENBEARD, K.D. Normal hematology of the dog. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 5^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 787 p.
- 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.
- MENDONÇA, R.B.; PAGANI, F.F.; MOREIRA DE SOUZA, A.; GRAÇA, R.F. da S.; BOMPET, A.P.; DE AMORIM, B.B.; ALMOSNY, N.R.P., SOUZA PINTO, A.R.; RODRIGUES, L.M. Respostas hematológicas em cães naturalmente infectados pelo vírus da Cinomose: estudo retrospectivo de casos. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.7, p.114, 2000. Suplemento.
- MATHER, T.N.; FISH, D.; COUGHLIN, R.T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme Disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*, v.205, p.186-188, 1994.
- MOTOHASHI, T.; NAKAGAWA, H.; OKADA, T. Fluorescent antibody technique in diagnosis of canine distemper. *Veterinary Medicine: Small Animal Clinician*, v.65, p.1057-1059, 1969.
- 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, Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.55, n.2, p.141-147, 2003.
- MOREIRA, S.M.; MACHADO, R.; PASSOS, L.F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Ciência Rural*, Santa Rural, Santa Maria, v. 35, n.4, p.958-960, 2005.
- MORETTI, L.D.; DA SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.48, n.6, p. 359-363, 2006.
- MORITZ, A.; FRISK, A.L.; BAUMGÄRTNER, W. The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection. *European Journal of companion Animal Practice*, v.10, p.37-45, 2000.
- MOSHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S. et al. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.2936-2942, 1999.
- MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology*, v. 79, p. 325-339, 1998.
- NAKAGHI, A.C.H. *Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de Ehrlichia canis em cães com suspeita clínica de erliquiose*. 2004. 63 F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração: Patologia Animal) – FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP.

- NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the infectious Disease Study Group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Lawrence, v.16, p.309-315, 2002.
- NEGRÃO, F.J.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. vol.59, no.1, Belo Horizonte, 2007.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Doenças virais polissistêmicas. In: *Medicina Interna de pequenos animais*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001 a. cap.102, p.1012-1014.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Doenças riquetsianas polissistêmicas. In: *Medicina Interna de pequenos animais*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001 b, cap.101, p.1006-1011.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Anemia. In: *Medicina Interna de pequenos animais*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001c . cap.85, p.910-920.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Distúrbios articulares. In: *Medicina Interna de pequenos animais*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001 d. cap.76, p.843-855.
- NORRIS, J.M.; KROCKENBERGER, M.B.; BAIRD, A.A. ; KNUDSEN G. Canine distemper: re-emergence of an old enemy. *Australian Veterinary Journal*.v.84, p.362-363, 2006.
- O'DWYER, L.H.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; SOUZA, J.C.P.; FLAUSINO, W.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi latu sensu* associada à presença de carrapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Rural*, v.34, n.1, p.204, 2004.
- OLICHESKI, A. T.; ARAUJO, F. A. P.; BECK, C.; RODRIGUES, R. J. D. Frequência de protozoários do gênero *Babesia* Starcovici, 1983, e de riquetsias do gênero *Ehrlichia* Ehrlich, 1888, em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil (resultados parciais). In: *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 29º, Gramado, 2002. Anais do 29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado, 2002*. 1 CD-ROM.
- OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C.T.; COSTA,M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO,M.B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by "DOT ELISA" in naturally infected dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 9, n.1, p.1-6, 2000.
- ORÍÁ, A. P. *Correlação entre uveítes, achados de patologia clinica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta e Dot-blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela Ehrlichia canis*. 2001. 82 F. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária – Área de concentração: Cirurgia Veterinária) – FCAV –UNESP, Jaboticabal –SP.
- PAGANI, F.F.; MENDONÇA, R.B.; GOMES, F.A.; BELCHIOR, C.; ALMOSNY, N.R.P.; SOUZA PINTO, A.R.; RODRIGUES, L.M. Alterações hematológicas observadas em casos de ehrlichiose canina: estudo retrospectivo. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.7, p.108, 2000. Suplemento.
- PEREIRA, R.A. *Introdução à Epidemiologia Veterinária*, 2001. Disponível em: <<http://www.teledata.mz/vevdinal/epidem.html//>> Acesso em: 23 de janeiro de 2008.
- PFISTER, H.W.; WILSKÉ, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet*, v. 343, p. 1013-1016. 1994.

- PIESMAN, J.; MATHER, T.N.; SINSKY, R.J.; SPIELMAN, A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *Journal of Clinical Microbiology*. v.25, n. 8, p. 557-558. 1987.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. First Edition. Wolfe Publishing, London. 1994. p. 292-303.
- RIBEIRO, J.M.C.; MATHER, T.N.; PEISMAN, J.; SPIELMAN, A. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v.24, n.2, p. 201-205. 1987.
- RIKIHISA, Y. The Tribe Ehrlichiae and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v.4; p.286-308, 1991.
- SAITO, T.B. Padronização da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para o diagnóstico ante e post mortem do vírus da cinomose canina. Londrina, 2001. 100f. *Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)*- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; NEGRÃO, F.J. *et al.* Optimization and Evaluation of the RT-PCR Assay for Ante and Post Mortem Detection of Canine Distemper Virus Infection. *Veterinária e Zootecnia*, v.13, p.63-72, 2006a.
- SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; WOSIACKI, S.R. *et al.* Detection of canine distemper virus by RT-PCR in urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in Veterinary Science*, v.80, p.116-119, 2006b.
- SHIN, Y.; MORI, T.; OKITA, M. *et al.* Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheal blood mononuclear cells by RT-PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.57, p.439-45, 1995.
- SILVA, I.N.G.; GUEDES, M.I.F.; ROCHA, M.F.G.; MEDEIROS, C.M.O., OLIVEIRA, L.C.; MOREIRA, O.C.; TEIXEIRA, M.F.S. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.1, p. 136-139, 2005.
- SILVA, M.C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS; C.S.L. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.5, p.215-220, 2007.
- SILVA, V. L. D. Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental. 2001. 102 F. (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SOARES, C.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, C. M. M.; YOSHINARI, N. H. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000.
- SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; MANERA, G. B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.21, n.3, p. 111-114. 1999.
- SOUSA, V.R.F. “Avaliação Clínica, Morfológica, Hematológica, Bioquímica e Biomolecular de Cães Naturalmente Infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*.” 2006. 46 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.
- STEERE, A.C. Lyme disease. *New England Journal of Medicine*, v.31, p. 586-597, 1989.

- STEERE, A.C.; SCHOEN, R.T.; TAYLOR, E. The Clinical Evolution of Lyme Arthritis. *Annals of Internal Medicine*, v. 107, p. 725-731. 1987.
- STEERE, A.C.; MALAWISTA, S.E.; HARDIN, J.A.; RUDDY, S.; ASKENASE, P.W.; ANDIMAN, W.A. Erythema Chronicum Migrans and Lyme Arthritis: the Enlarging Clinical Spectrum. *Annals of Internal Medicine*, v.86, p. 685-698. 1977.
- STETTLER, M.; ZUBRIGGEN, A. Nucleotide and deduced aminoacid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus, *Veterinary Microbiology*, v.44, p.211-217, 1995.
- STILES, J. Canine rickettsial infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, St. Louis, v. 30, n.5, p.1135-1150, 2000.
- STOKOL, T.; BLUE, J.T.; FRENCH, T.W. Idiopathic pure red cell aplasia and nonregenerative immune-mediated anemia in dogs: 43 cases (1988–1999) - *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*. v. 216, n. 9, p. 1429-1436 . 2000.
- SWANGO, L.J.; BANKEMPE, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, Rickettsial, Protozoal and Miscellaneous infections. In: ETTINGER, S.J. (ed): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, W.B. Saunders Co, p.265-297. 1989.
- SWANSON, K.S.; KUZMUK, K.N.; SCHOOK, L.B.; FAHEY Jr., G.C. Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. *Journal of Animal Science*. v. 82, p. 1713-1724. 2004.
- TAKAHIRA, R.K.; LOPES, R.S.; COSTA, C.L.; GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; LOURENÇO, M.L.G. Detecção de anticorpos contra *Ehrlichia platys* e *Ehrlichia canis* em cães. *Revista Nosso Clínico*, ano 6 , n. 32. p. 34-38, 2003.
- TIPOLD, A. Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.9, p.304-314, 1995.
- TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; MORAIS, H. S. A.. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population in south Brazil. *Journal of Veterinary Internal Medicine* . v.16, p.365. 2002.
- TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine erlichiosis. In: GREENE, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: Saunders, 1990. cap.37, p.404-417.
- URIOSTE, S.; HALL, L.R.; TELFORD, S.R.; TITUS, R.G. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*, v.180, p.1077-1085. 1994.
- VARELA, A.S. Tick-borne Ehrlichiae and Rickettsiae of dogs. In: BOWMAN, D.D. *Companion and Exotic Animal Parasitology*. 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org>> Acesso em: 6 abril 2004.
- WADDLE, J.R.; LITTMAN, M.P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 24, n.6, p.615-620, 1987.
- WANER, T. et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, v.69, p.307-317, 1997.
- WANER, T.; HARRUS, S. Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In: Recent advances in canine infectious diseases. 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org>> Acesso em: 08 jan 2005.

- WELLMAN, M.L. et al. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, v.24, p.223-229, 1988.
- WELLS, S.J.; TRENT, A.M.; ROBINSON, R.A.; KNUTSON, K.S.; BEY, R.F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, n. 3, p. 398-405, 1993.
- WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*. Oxford : Pergamon, 1993. 427p.
- WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial disease of dogs. In: HOSKINS, J.D. *Veterinary clinics of North America*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991. p. 75-98.
- YOSHINARI, N. H; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L. N.; SOARES, C. O; MADRUGA, C. R; SCOFIELD, A; MASSARD, C. L.; FONSECA, A H.. Coexistence of antibodies of tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia County, State of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, RJ, v. 98, n. 1, 2003.
- YOSHINARI, N. H; BARROS, P.J.L.; FONSECA, A.H.; BONOLDI, V. L. N.; BATTESTI, D.M.; SCHUMAKER, T.T.; COSSERMELLI, W. Borreliose de Lyme – zoonose emergente de interesse multidisciplinar. *News Lab*, v.3, n.12, p. 90-104, 1995.
- ZEE, Y.C. Paramyxoviridae. In: *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. p.374-382.
- ZORNOFF, D.C.M.; OLIVEIRA, B.G.V.; MEIRA, D.A.; CORREA, C.N.M. Ehrlichiose Humana. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 68, n. 1-2, p. 72-80, 1995.
- ZUBRIGGEN, A.; GRABER, H.U.; VANDELVEDE, M. Selective spread and reduced virus release leads to canine distemper virus persistence in the nervous system. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 281-288, 1995.

7 ANEXOS

Anexo 1. Cálculo para obtenção dos valores das densidades ópticas, em percentual, dos soros teste em relação ao “cut-off” de cada placa para *Borrelia burgdorferi* de cães acautelados no Centro de Controle de Zoonoses de Santa Cruz, RJ n=38. A numeração desses cães não corresponde à numeração do quadro 1.

C	D.O. das amostras em duplicata		Média das D.O. (M.D.O.)	"Cut-off" da placa	M.D.O. x 100/"cut-off"
1	0,685	0,637	0,661	0,339	195,0
2	0,550	0,554	0,552	0,339	162,8
3	0,603	0,607	0,605	0,339	178,5
4	0,687	0,663	0,675	0,339	199,1
5	0,445	0,448	0,447	0,339	131,7
6	0,429	0,426	0,428	0,339	126,1
7	0,417	0,418	0,418	0,339	123,2
8	0,509	0,528	0,519	0,339	152,9
9	0,550	0,535	0,543	0,339	160,0
10	0,616	0,597	0,607	0,339	178,9
11	0,375	0,383	0,379	0,339	111,8
12	0,407	0,401	0,404	0,339	119,2
13	0,496	0,508	0,502	0,339	148,1
14	0,209	0,208	0,209	0,339	61,5
15	0,439	0,426	0,433	0,339	127,6
16	0,938	0,918	0,928	0,339	273,7
17	0,505	0,509	0,507	0,339	149,6
18	0,373	0,377	0,375	0,339	110,6
19	0,319	0,323	0,321	0,339	94,7
20	0,578	0,578	0,578	0,339	170,5
21	0,461	0,454	0,458	0,339	135,0
22	0,689	0,697	0,693	0,339	204,4
23	0,496	0,495	0,496	0,339	146,2
24	0,309	0,301	0,305	0,339	90,0
25	0,431	0,438	0,435	0,339	128,2
26	0,431	0,442	0,437	0,339	128,8
27	0,242	0,247	0,245	0,339	72,1
28	0,375	0,372	0,374	0,339	110,2
29	0,543	0,532	0,538	0,339	158,6
30	0,324	0,327	0,326	0,339	96,0
31	0,382	0,381	0,382	0,339	112,5
32	0,368	0,368	0,368	0,339	108,6
33	0,421	0,430	0,426	0,347	122,6
34	0,550	0,556	0,553	0,347	159,4
35	0,570	0,598	0,584	0,347	168,3
36	0,756	0,713	0,735	0,347	211,7
37	0,413	0,403	0,408	0,347	117,6
38	0,384	0,383	0,384	0,347	110,5