

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

DISSERTAÇÃO

***Ehrlichia canis* E *Anaplasma platys* EM CÃES (*Canis familiaris*,
Linnaeus, 1758) TROMBOCITOPÊNICOS DA REGIÃO DOS
LAGOS DO RIO DE JANEIRO**

ÉRICA MATEUS TOLEDO ACCETTA

2008



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

***Ehrlichia canis* E *Anaplasma platys* EM CÃES (*Canis familiaris*,
Linnaeus, 1758) TROMBOCITOPÊNICOS DA REGIÃO DOS
LAGOS DO RIO DE JANEIRO**

ÉRICA MATEUS TOLEDO ACCETTA

Sob a Orientação do Professor
DR. GILBERTO GARCIA BOTELHO

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, Área de
Concentração em Patologia e
Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Agosto de 2008

636.708964

A169e

T

Accetta, Érica Mateus Toledo, 1972-
Ehrlichia canis e Anaplasma
platys em cães (canis familiaris,
linnaeus, 1758) trombocitopênicos da
região dos lagos do Rio de Janeiro /
Érica Mateus Toledo Accetta - 2008.
75. : il.

Orientador: Gilberto Garcia
Botelho.

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

Bibliografia: f. 46-64

1. Cão - Doenças - Teses. 2.
Ehrlichiose - Teses. 3. Infecção -
Brasil- Rio de Janeiro - Teses. 4.
Parasitologia veterinária - Teses.
I. Botelho, Gilberto Garcia, 1946-.
II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária.
III. Título.

Bibliotecário: _____

Data: ___/___/___

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

***Ehrlichia canis* E *Anaplasma platys* EM CÃES (*Canis familiaris*,
Linnaeus, 1758) TROMBOCITOPÊNICOS DA REGIÃO DOS
LAGOS DO RIO DE JANEIRO**

ÉRICA MATEUS TOLEDO ACCETTA

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 Patologia e Ciências Clínicas

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/08/2008.

Gilberto Garcia Botelho Dr, UFRRJ
(Orientador)

Carlos Henrique Machado Dr, UFRRJ

Nádia Regina Pereira Almosny Dr^a, UFF

Ao meu filho Gabriel, que surgiu como um anjo para abrilhantar ainda mais a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter abençoado a minha vida com pessoas tão especiais que contribuíram diretamente na realização de todos os meus ideais.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços na minha criação, me proporcionando sempre uma boa educação.

Ao meu filho, pelo carinho, amor, paciência e por ser este menino tão comportado e compreensivo.

Ao meu irmão, Alan Mateus Toledo e à minha sobrinha Giulia Moraes Mateus Toledo, por tornarem a minha vida mais divertida.

A Juliana Solozabal, pela persistência e incentivo, fundamentais para a realização deste trabalho e por desempenhar tão bem a função de amiga-irmã.

A José Luis Accetta, pelo incentivo e apoio incondicionais a todos os meus projetos e por ser um pai tão dedicado ao nosso filho.

Aos veterinários e amigos, Márcio Pinto de Castro e Mariana Goulart, por abrirem as portas do CEVET Lagos para a execução desta pesquisa.

Ao Prof. Gilberto Garcia Botelho, pela orientação e incentivo à realização deste trabalho.

À Profª. Rita de Cássia Botteon, pela dedicação e atenção.

Aos funcionários, Mônica, Jane, Marilene, Raimundo, Eli, Claudinho, Jhonatan e Arla, por se dedicarem à organização da “Família São Francisco”.

Aos veterinários da Veterinária São Francisco, Fábio Costa de Souza, Janh Carlo de Amorim Ferreira, Marcos André Carrilho Cruz, Guilherme Souza dos Santos, Ana Paula Pereira Guimarães e William Tovar, pela ajuda imprescindível nos momentos em que estava longe da clínica para a realização deste projeto.

À amiga Clarissa Pimentel, pelo apoio e ajuda para que eu ingressasse no mestrado.

Aos professores e amigos, Evandro de Toledo Piza e Marcílio Dias do Nascimento, por despertarem em mim o interesse e admiração pela citologia.

Aos meus clientes e amigos, pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Aos animais, que me inspiraram na escolha da Medicina Veterinária.

BIOGRAFIA

Érica Mateus Toledo Accetta, filha de João Baptista Soares Toledo e Maria Madalena Mateus de Toledo, nasceu em 28 de agosto de 1972, na cidade de Cabo Frio, Estado do Rio de Janeiro.

Concluiu o primeiro e o segundo graus na Escola Sagrado Coração de Jesus, em Cabo Frio, em 1989.

Em 1991 ingressou no Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Plínio Leite (UNIPLI), colando grau e obtendo o título de Médico Veterinário em março de 1996.

Ainda em 1996 foi aprovada no concurso para plantonista do HCV da UNIPLI, onde trabalhou até 2004.

Durante a vida acadêmica realizou estágios em diversas áreas. Atuou profissionalmente na área de Clínica Médica, e Cirurgia de Pequenos Animais, incluindo estágios profissionais não remunerados em Clínica Médica e Cirúrgica no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IJV), no Rio de Janeiro.

Trabalhou em diversas clínicas no Rio de Janeiro, dentre elas a Veterinária D'Amato na Gávea e CLIVERJ em Copacabana. No ano de 2000 fundou a Veterinária São Francisco, em Cabo Frio, RJ, onde atua até hoje.

Em 2003 concluiu a especialização em Clínica e Cirurgia de pequenos animais na Fundação de Ensino Otávio Bastos (FEOB), em São João da Boa Vista, SP.

Ingressou em 2004 na primeira edição do Curso de especialização em Dermatologia Veterinária, realizado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia Veterinária, na USP, tendo o concluído em 2005.

Ainda em 2005 realizou residência na área de Dermatologia Veterinária no HOVET-USP.

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

ACCETTA, E.M.T. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães (*Canis familiaris*, *Linnaeus, 1758*) trombocitopênicos da Região dos Lagos do Rio de Janeiro. 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A erliquiose canina é uma importante doença infecciosa cuja prevalência tem aumentado significativamente em várias regiões do Brasil. Os sinais clínicos e os achados laboratoriais são variáveis. O presente trabalho teve como objetivo determinar a frequência da infecção por *E. canis* e *A. platys* em cães com trombocitopenia na Região dos Lagos do Estado do Rio de Janeiro. Foram avaliados os exames hematológicos de 1127 cães com trombocitopenia de um total de 3019 exames realizados no período de junho de 2006 a julho de 2007, no laboratório CEVET Lagos, que presta atendimento às diversas clínicas dos municípios de Araruama, Iguaba Grande, São Pedro d'Aldeia, Cabo Frio, Arraial do Cabo e Búzios. A erliquiose foi diagnosticada através da pesquisa de hemoparasitos em esfregaços de sangue total corados com kit panóptico. O diagnóstico baseou-se no achado de mórulas de *Ehrlichia spp.* e *Anaplasma platys*, sendo considerados infectados 84 (7,45%) cães. Anemia normocítica normocrômica e monocitose foram as alterações hematológicas mais frequentes.

Palavras chave: Ehrlichiose, cão, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*.

ABSTRACT

ACCETTA, E.M.T. *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in trombocitopenic dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) of Região dos Lagos, Rio de Janeiro, Brazil. 2008. 64 p. Dissertation (Master of Science in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Canine ehrlichiosis is an important infectious disease whose prevalence has been increased in most areas of Brazil. Clinical signals and the laboratorial findings are variable. The present work had as objective to determine the frequency of the infection for *E. canis* and *Anaplasma platys* in dogs with trombocytopenia at Região dos Lagos - State of Rio de Janeiro. It has been evaluated the CBC of 1127 dogs with trombocytopenia, a total of 3019 laboratorial tests carried through in the period of June 2006 and July 2007, at CEVET Lagos Lab, providing attendance to several clinics of Araruama, Iguaba Grande, São Pedro d'Aldeia, Cabo Frio, Arraial do Cabo and Búzios. Erliquiosis was diagnosed through haemoparasit in smears of total blood's research stained with Panoptic kit. Eighty-four dogs (7.45%) were considered infected by the discovery of morulae of *Ehrlichia spp.* e *Anaplasma platys*. Normocytic normochromic anaemia and monocytosis were the most hematological alterations found.

Keywords: Ehrlichiosis, dog, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Média, Desvio Padrão, Amplitude de variação dos valores hematológicos de 84 cães domésticos, naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e/ou *Anaplasma platys*. 42
- Tabela 2.** Achados hematológicos em 84 cães domésticos, naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e/ou *Anaplasma platys*. 43
- Tabela 3.** Frequência dos tipos morfológicos de anemia em 84 cães domésticos, naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e/ou *Anaplasma platys*. 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Petéquias abdominais em cadela com <i>Anaplasma platys</i>	17
Figura 2. Sufusão abdominal em cão com <i>Ehrlichia canis</i>	17
Figura 3. Hifema em cão.	18
Figura 4. Vista aérea da Região dos Lagos no Estado do Rio de Janeiro	35
Figura 5. Vet auto analisador hematológico	36
Figura 6. Contador de células e microscópio Nikon	37
Figura 7. Mórula de <i>Ehrlichia</i> spp. em agranulócito de cão. 1000x.	40
Figura 8. Mórulas de <i>Anaplasma platys</i> em plaqueta de cão. 1000x	40

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Introdução	1
Revisão de literatura	3
Erliquiose canina	3
Sinonímia	3
Agente etiológico	3
<i>Anaplasma platys</i>	5
<i>Ehrlichia canis</i>	6
Histórico	6
Ciclo biológico e morfologia	7
Distribuição geográfica	9
Transmissão	10
Patogenia	11
Sinais clínicos	15
Erliquiose monocítica canina	15
Erliquiose granulocítica canina	21
Erliquiose trombocítica canina	21
Diagnóstico	22
Identificação direta do parasito	28
Reação em cadeia de polimerase (PCR)	29
Cultivo celular	30
Diagnóstico indireto	31
Tratamento	32
Profilaxia	34
Material e métodos	35
Período e local	35
Hemograma e pesquisa de hemocitozoários	36
Seleção dos animais	37
Análise estatística	37
Resultados e discussão	38
Contagem de plaquetas	38
Frequência de infecção	39
Alterações hematológicas	41
Conclusão	45
Referências bibliográficas	46

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose canina é uma doença infecciosa, causada por microrganismos cocóides e elipsoidais gram-negativos, estritamente intracelulares, transmitida por carrapatos, pertencentes à Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae, aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Tem despontado como uma importante enfermidade infecciosa devido à sua alta prevalência.

A classificação taxonômica destes parasitos, com o advento de técnicas moleculares, vem passando por modificações nas últimas duas décadas. As espécies do gênero *Ehrlichia* podem determinar um amplo espectro de manifestações clínicas, em diversas espécies de animais e seres humanos.

Em caninos, a *Ehrlichia canis* e o *Anaplasma platys* são os organismos rickettsiais mais importantes. A *E. canis* comumente parasita leucócitos e o *A. platys*, plaquetas, existindo a possibilidade de infecções concomitantes tendo inclusive o mesmo vetor, o carrapato ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* que é o principal responsável pela transmissão da erliquiose canina.

A erliquiose é uma infecção que se caracteriza por diferentes alterações clínicas, distribuindo-se nas fases aguda, subclínica e crônica. Dados divergentes sobre a sintomatologia apresentada pelos animais infectados, bem como as alterações laboratoriais observadas em relação às diversas áreas do país, reforçam a necessidade de maiores estudos quanto à possibilidade de existirem diferentes cepas no Brasil.

Geralmente, esfregaços sanguíneos podem demonstrar mórula da *Ehrlichia spp.* no citoplasma dos leucócitos na fase aguda da infecção, já a mórula de *A. plays*, em plaquetas. Achados laboratoriais, como trombocitopenia e anemia, podem sugerir o diagnóstico. Provas sorológicas na detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis* têm sido utilizadas no Brasil. A reação de imunofluorescência indireta tem sido mais amplamente utilizada no diagnóstico desta infecção. O diagnóstico molecular das doenças erliquiais tem auxiliado na classificação taxonômica destes agentes infecciosos, detectando novas cepas ou variantes de espécies permitindo também a detecção precoce da infecção.

Diversos tratamentos já foram propostos para a doença, sendo o cloridrato de doxiciclina a droga de eleição com adequada resposta terapêutica.

Este trabalho tem como objetivo realizar uma atualização bibliográfica dos aspectos mais importantes da erliquiose canina e desenvolver uma pesquisa abordando o levantamento de infecções por *Ehrlichia spp.* e *Anaplasma platys* em cães trombocitopênicos da Região dos Lagos do Rio de Janeiro, através da detecção de mórulas em leucócitos e plaquetas,

respectivamente, em esfregaços sanguíneos, fornecendo uma análise do cruzamento destes dados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erliquiose canina

2.1.1 Sinonímia

A erliquiose canina recebeu vários nomes, como rickettsiose canina, tifo canino, febre hemorrágica canina e síndrome hemorrágica idiopática (PRICE; SAYER, 1983).

2.1.2 Agente etiológico

As erliquioses clínicas em caninos podem ser causadas por infecção de uma variedade de agentes erliquiais. *Ehrlichia spp.* são riquetsias que formam colônias chamadas de mórulas. As espécies em caninos infectados naturalmente compreendem a *E. canis*, *Neorickettsia risticii*, *E. chaffeensis*, *E. Ewingii*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* (LAPPIN, 2006). Segundo Dumler et al. (2001), o gênero *Ehrlichia* atualmente compreende cinco espécies válidas: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. Ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*. São bactérias pleomórficas gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórias, que infectam primariamente leucócitos (monócitos, macrófagos e granulócitos) que parasitam células brancas circulantes de várias espécies de animais domésticos e silvestres inclusive o homem (COHN, 2003).

Estes microrganismos são encontrados em áreas temperadas quentes e tropicais mundialmente, e são transmitidos entre cães susceptíveis através de vetores artrópodos, geralmente carrapatos (WOODY; HOSKINS, 1991).

Uma classificação mais objetiva tem utilizado a sequência homóloga do RNA ribossômico (RNAr) em genes, para determinar o parentesco genético de vários organismos, que têm sido reclassificados e dirigidos para outros grupos genéricos e distribuídos dentro das famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae (DUMLER et al., 2001).

Naquela época, a única espécie conhecida da tribo *Ehrlichieae* que infectava humanos era a *Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu*, agente causal da febre do Sennetsu, doença descrita pela primeira vez no Japão em 1954. Inicialmente denominada de *Rickettsia sennetsu*, foi renomeada para *E. sennetsu*, pois apresentava inúmeras semelhanças com a *E. canis* (RISTIC; HUXSOLL, 1984). Atualmente está incluída no gênero *Neorickettsia* (DUMLER et al., 2001).

Anteriormente, a infecção por espécies do gênero *Ehrlichia* era considerada hospedeiro-específica, de forma que se acreditava que *E. canis* infectava apenas cães e *E. chaffeensis* infectava humanos e veados (BREITSCHWERDT, 1995). Porém, recentemente foi isolado um microrganismo genético e antigenicamente semelhante à *E. canis* em um homem na Venezuela (PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996). Da mesma forma, microrganismos geneticamente idênticos à *N. risticii*, agente causal da Febre do Potomac em cavalos, foram encontrados em cães (KAKOMA et al., 1994). Na Venezuela há um relato recente de pelo menos seis casos clínicos de erliquiose humana causada por *Ehrlichia canis*, indicando que este agente pode causar infecções zoonóticas (PEREZ et al., 2005 apud AGUIAR et al., 2007).

Foi proposta por Dumler et al. (2001) a reorganização de todos os gêneros nas famílias *Rickettsiaceae* e *Anaplasmataceae* e todos os membros das tribos *Ehrlichieae* e *Wolbachieae* foram transferidos para a família *Anaplasmataceae*, na qual constam os três gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia* (RIKIHISA, 1991; DUMLER et al., 2001).

Três grupos distintos do gênero *Ehrlichia* foram identificados com base na semelhança entre as seqüências do RNA ribossômico 16S. São eles: a) genogrupo *Ehrlichia canis*, incluindo o patógeno humano *Ehrlichia chaffeensis*, os patógenos caninos *E. canis* e *E. ewingii*, esta última que também infecta humanos; o patógeno murino *Ehrlichia muris*, e *Ehrlichia* (*Cowdria*) *ruminantium*, espécie causadora de hidropericárdio em ruminantes; b) genogrupo *Ehrlichia phagocytophilum*, que foi denominada *Anaplasma*, incluindo *A. phagocytophilum*, *A. platys*, e também *A. marginale*; c) genogrupo *Ehrlichia sennetsu*, que foi denominada *Neorickettsia*, incluindo *N. sennetsu*, *N. risticii* e *N. helminthoteca* (ALLSOPP; ALLSOPP, 2001; COHN, 2003).

A espécie *E. chaffeensis*, originariamente isolada e caracterizada como agente da doença humana, também foi isolada em cães, causando doença grave. *E. canis* e *E. chaffeensis* causam duas formas distintas de erliquiose canina, infectando diferentes tipos de leucócitos: monócitos e granulócitos, respectivamente (DAWSON; WARNER; EWING, 1997, BREITSCHWERDT, 1995).

Aguiar (2006) conseguiu isolar uma nova cepa designada como isolado São Paulo, apresentando-se idêntica às seqüências do gene *dsb* e similares às sequências dos genes 16S rRNA e P28, de outros isolados de *Ehrlichia canis* disponíveis no GenBank.

2.1.2.1 *Anaplasma platys*

O agente etiológico da erliquiose trombocítica canina é a *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) uma bactéria Gram-negativa que infecta as plaquetas do cão (HARRUS; BARK; WANER, 1997; HUANG et al., 2005). É visualizada como inclusões basofílicas no interior de plaquetas em esfregaços corados com corante de Giemsa (HARVEY et al., 1998 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Dumler et al. (2001) sugeriram a mudança na nomenclatura de *Ehrlichia platys* para *Anaplasma platys*.

Harvey; Simpson; Gaskin (1978) descreveram um micorganismo semelhante à *Ehrlichia sp.* como agente causal de trombocitopenia cíclica induzida. Em caninos infectados experimentalmente puderam ser observados os organismos (uma, duas ou três inclusões) infectando plaquetas após sete a 12 dias pós-infecção.

French; Harvey (1983) observaram um parasito específico de plaquetas de cães, de coloração basofílica, medindo entre 0,4 a 1,2 µm, podendo ser arredondado, oval ou achatado, rodeado por membrana dupla, se reproduzindo por fissão binária (RISTIC; HUXSOLL, 1984).

Segundo Hoskins (1991), este parasito infecta apenas plaquetas e não leucócitos circulantes de cães. Multiplica-se apenas em plaquetas de cães, podendo ser transmitido por inoculação intravenosa de sangue oriundo de cães doentes. Seu vetor permanece desconhecido embora suspeite-se do *Rhipicephalus sanguineus* já que infecções concomitantes por *E. canis* e *A. platys* são comumente relatadas

Cardozo et al. (2007) compararam a sequência gênica do *A. platys* e determinaram a prevalência desta doença em cães da cidade de Ribeirão Preto, Brasil, indicando que existam pelo menos três linhagens de *A. platys* circulando na América do Sul. Já HUANG et al. (2005) verificaram a prevalência e análise molecular de *A. platys* em cães da Venezuela e de seus treinadores detectando 16% de positividade nos cães, enquanto todas as amostras humanas foram negativas. Alguns carrapatos coletados também foram testados e negativos para *A. platys* pelo teste de PCR de transcrição reversa. As seqüências genéticas quase inteiras de *A. platys* isoladas de um cão foram determinadas, revelando que ambas as seqüências (16S rRNA e operon *groESL*) estão estreitamente relacionadas às seqüências detectadas em carrapatos estudados na República Democrática do Congo. No Rio de Janeiro, Ferreira et al. (2007) verificaram a ocorrência de *A. platys* e concluíram que não existe diferença significativa entre a análise do esfregaço sanguíneo e o teste molecular (PCR) para o diagnóstico de *A. platys*.

2.1.2.2 *Ehrlichia canis*

O parasito *E. canis* recebeu inicialmente o nome de *Rickettsia canis* (HUXSOLL, 1976). Em 1945, a nomenclatura foi retificada para *E. canis*, em homenagem a Paul Ehrlich, bacteriologista alemão (McDADE, 1990).

No Brasil, a única espécie descrita em cães até o momento é *Ehrlichia canis*, responsável pela erliquiose monocítica canina, doença considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas, onde abundam populações do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

Em Belo Horizonte, Costa et al. (1973) apud Aguiar et al. (2007) relataram a doença no Brasil pela primeira vez e posteriormente foi relatado por Carrillo; Resende; Massard (1976) no Rio de Janeiro. Desde então, passou a ser diagnosticada com bastante frequência em todas as regiões do Brasil, principalmente nas regiões sudeste e centro-oeste, embora com diferentes manifestações clínicas e laboratoriais (ALMOSNY, 1998).

Atualmente foi relatada acometendo aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste (LABARTHE et al., 2003; MOREIRA et al., 2003).

Apesar da inexistência de dados oficiais sobre sua ocorrência no Brasil, alguns estudos de soroprevalência demonstram elevadas taxas de anticorpos anti-*E. canis*, como, por exemplo, no estado do Mato Grosso do Sul, onde um estudo demonstrou que 35,7% de cães se apresentaram soro-reativos (LABARTHE et al., 2003).

2.1.3 Histórico

A primeira espécie *Rickettsia canis* foi descrita em 1935, na Argélia, por Donatien & Lestoquard, que observaram organismos nas células mononucleares circulantes, em um cão Pastor Alemão. Porém, esta espécie foi reclassificada em 1945 como *Ehrlichia canis* por Mashkovsky (HUXSOLL et al., 1970 apud MACHADO, 2004). Posteriormente foram descritos novos casos, durante as décadas de 40 e 50, em países da África do Sul e na Índia (EWING, 1969), mas somente na década de 60, após a descrição de uma doença fatal, a pancitopenia hemorrágica causada por *Ehrlichia canis*, que acometeu 300 cães do exército americano durante a guerra do Vietnã, a doença passou a ser reconhecida, com a identificação da infecção em diversas outras espécies de animais, como em equinos e ruminantes

(HARRUS; BARK; WANER, 1997).

O primeiro caso de erliquiose canina nas Américas foi descrito em 1957, na região das Antilhas Holandesas, em infecção associada à *Babesia canis* (EWING; PHILIP, 1966 apud ALMOSNY; MASSARD, 2002).

No primeiro relato de *Anaplasma platys* em cães nativos de Israel observou-se, além das manifestações clínicas conhecidas como trombocitopenia, a presença de megaloplaquetas e afirmaram que a cepa encontrada era mais virulenta que a americana (HARRUS; BARK; WANER, 1997).

Segundo Hoskins; Barta; Rothschmit (1983) e Hoskins (1991), existem dificuldades para observação destas mórulas devido ao caráter cíclico da trombocitopenia. Este também foi relatado por Almosny (1998).

2.1.4 Ciclo Biológico e Morfologia

Aguiar (2006) descreveu pela primeira vez no Brasil a infecção natural por *E. canis* em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, tido como principal vetor no país. Esse artrópode habita ambientes urbanos e tem hábitos nidícolas, vivendo em tocas, ninhos e até mesmo em esconderijo nos canis. Preferem se fixar nas regiões do pescoço, orelhas, espaços interdigitais e dorso de seus hospedeiros (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

O microrganismo é adquirido pelo carrapato durante repasto sanguíneo em um cão infectado podendo transmitir a um outro cão em novo repasto sanguíneo; felizmente, não ocorre uma transmissão transovariana para uma nova geração de carrapatos, mas sim transtadial (SMITH et al., 1976 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). Estes agentes são inoculados através das secreções salivares contaminadas durante picada do carrapato e são absorvidos por células mononucleares, nas quais eles se replicam através de uma fissão binária (TROY; FORRESTER, 1990).

As larvas e ninfas se infectam quando se alimentam em um cão na fase aguda da doença, através da ingestão de leucócitos infectados (SMITH et al., 1976 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). No carrapato, as erliquias se disseminam por hemócitos do intestino para a glândula salivar. Durante a alimentação, os carrapatos inoculam a secreção salivar contaminada no interior do sítio de alimentação no hospedeiro (SMITH et al., 1976 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Os hospedeiros vertebrados mais comuns são os da família Canidae (cães, coiotes, raposa e chacal). Cães em áreas endêmicas e aqueles que são transportados para estas regiões

são susceptíveis à doença (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Segundo Swango; Bankempe; Kong (1989), a espécie *R. sanguineus*, o carrapato marrom do cão, é considerada único vetor conhecido para *E. canis*, transmitindo a *E. canis* transestadialmente. A infecção transovariana não é aceita (HOSKINS, 1991).

Todo o ciclo da infecção, desde a invasão da *Ehrlichia* na célula hospedeira até a sua eliminação, leva um período de, aproximadamente, 12 e 18 dias (WEISS; DASCH, 1981). Estudos confirmam que a invasão de outras células por *Ehrlichia*, nem sempre é precedida de lise das células previamente infectadas, podendo ocorrer após exocitose (GREENE; HARVEY, 1984; RIKIHISA, 1991).

Seu desenvolvimento inclui três estágios: corpúsculo elementar, corpúsculo inicial e mórula. O parasita pode ser observado nestas três diferentes formas, que representam estágios de desenvolvimento do ciclo de vida do parasito (LOSOS, 1986). Assim sendo, são caracterizadas três formas para *Ehrlichia canis*, que representam estágios de desenvolvimento de vida do parasito: a) mórulas, estruturas circundadas por uma membrana que contém quantidade variável de corpúsculos elementares (até 40) (DAVOUST, 1993), descrita como colônia arredondada, com grânulos que se apresentam como corpúsculos elementares corados em azul escuro nos preparados corados pelo Giemsa; b) os corpúsculos elementares, organismos únicos que se apresentam aderidos à membrana plasmática da célula, a qual se invagina para dentro da célula (GREENE; HARVEY, 1984), através de endocitose, um processo mediado por receptores protéicos sobre a superfície da célula (MESSICK; RIKIHISA, 1993); c) a forma granular, corpúsculos iniciais, é composta de múltiplos grânulos. Estes grânulos precisam ser diferenciados das granulações azurófilas, que podem ocorrer no citoplasma de mononucleares sanguíneos de cães saudáveis. Os corpúsculos iniciais, inclusões pleomórficas, são formados a partir do crescimento e multiplicação dos corpúsculos elementares dentro do fagossoma, através da divisão binária, entre o 3º e 5º dia de infecção (NYINDO et al., 1971); Estes autores consideraram a presença destas inclusões como suficientes para um diagnóstico positivo da doença.

A forma de mórula é uma característica de todas as espécies de *Ehrlichia*. Os corpúsculos elementares são circundados por duas membranas, enquanto as mórulas são descritas como estruturas intracitoplasmáticas, arredondadas, ovóides ou alongadas, circundadas por dupla membrana limitada por membrana trilaminar, que envolve numerosos corpúsculos elementares.

Os corpos iniciais podem ser mensurados e, segundo alguns autores, podem medir de 0,4 a 2 µm ou até 5 µm de diâmetro. Os corpos elementares medem 0,2 a 0,6 µm x 1,2 a 1,5

µm de diâmetro e, na fase de mórula, podem medir de 2,5 a 3 µm x 3 a 6 µm de diâmetro.

Os membros da Tribo Ehrlichiae são caracterizados como pequenos cocos gram-negativos e adquirem a coloração azul-escuro a roxo com uso de corantes tipo Romanowsky. São geralmente redondos, mas algumas vezes podem ser pleomórficos e são encontrados em vacúolos dentro do citoplasma das células infectadas, principalmente leucócitos (RIKIHISA, 1991).

2.1.5 Distribuição Geográfica

A distribuição da erliquiose canina está relacionada com a distribuição do carrapato vetor, ocorrendo mundialmente (KEEF et al., 1982 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). Carrapatos da espécie *R. sanguineus*, que predominam nas regiões temperadas, tropicais e subtropicais são os principais hospedeiros intermediários (GROVES; DENNIS; AMYX, 1975; LOSOS, 1986; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999). A erliquiose é considerada uma doença cosmopolita, com relatos de casos nas Américas do Norte e do Sul, na África, em todo o Oriente e na Europa (LOSOS, 1986; SWANGO; BANKEMPE; KONG, 1989). Embora *E. canis* não tenha sido isolada na Austrália (PRICE; SAYER, 1983), existe evidência de sua presença naquele país, onde um inquérito sorológico realizado demonstrou que 2,2% dos cães de uma população analisada apresentavam anticorpos anti-*E. canis* (MASON et al., 2001).

A erliquiose canina apresenta altas taxas de prevalência mundiais, conforme demonstram inquéritos sorológicos internacionais conduzidos em diferentes populações de cães, nas quais 78% em Senegal (PARZY et al., 1991), 68% na Tunísia (BROUQUI et al., 1991), 66,7% na Espanha (SÁINZ et al., 1995), 41% no Egito (BOTROS et al., 1995), 30% em Israel (BANETH et al., 1996), 10,8% no estado americano de Oklahoma (MURPHY et al., 1998) e 2,2% na Suíça (PUSTERLA et al., 1998), apresentaram anticorpos anti-*E. canis*.

No Brasil, existem relatos da ocorrência de *E. bovis*, *E. platys* e *E. equi* (ALMOSNY, 1998), além da *E. canis*, responsável pela erliquiose monocítica canina, doença considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas (ALMOSNY, 1998; LABRUNA; PEREIRA, 2001).

Ainda existem poucos estudos sorológicos que demonstrem a prevalência nacional e regional. Trapp et al. (2002) encontraram anticorpos contra *Ehrlichia canis* em 23% dos cães atendidos em um Hospital Veterinário da Região Sul do Brasil. Labarthe et al. (2003) encontraram anticorpos contra *E. canis* em 19,8% dos cães estudados em todo o Brasil, sendo

que 35,7% dos cães avaliados no Estado do Mato Grosso do Sul apresentaram anticorpos contra *E. canis*. Aguiar (2006) estudou a prevalência de *E. canis* na cidade de Monte Negro, Estado de Rondônia, determinando 31,2% de cães acometidos, sendo 37,9% em cães urbanos e 24,8% em cães rurais.

2.1.6 Transmissão

O ciclo biológico da *E. canis* ainda não foi completamente caracterizado. Sabe-se que o organismo passa pelos mesmos estágios de desenvolvimento nas células dos carrapatos e no citoplasma das células infectadas dos hospedeiros vertebrados (GREENE; HARVEY, 1984). Nos carrapatos infectados, que podem permanecer assim por mais de cinco meses, *E. canis* se multiplica dentro dos hemócitos e principalmente nas glândulas salivares, cuja secreção contendo grande concentração de bactérias é eliminada durante a fase parasitária do artrópode, com conseqüente infecção de um cão susceptível (LEWIS et al., 1977 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

O principal transmissor é o carrapato ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001; MACHADO, 2004), que transmite a erliquiose através da sua secreção salivar (SMITH et al., 1975). Foi mostrado experimentalmente que o *Dermacentor variabilis* também pode transmitir a *Ehrlichia canis* (HARRUS, 2000 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Como o *R. sanguineus* também é transmissor de outros hemoparasitas, é relativamente comum encontrar infecções mistas, com a *Babesia canis*, *Bartonella vinsonii*, *Hepatozoon canis* e outras espécies diferentes de erliquias (MEINKOTH et al., 2001 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Todos os três estágios (larva, ninfa e adulto) podem transmitir o parasita (RISTIC; HOLLAND, 1993) e geralmente as larvas e ninfas se tornam infectadas quando se alimentam em um cão doente, na fase aguda (SMITH et al., 1976 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Pode também ocorrer a transmissão da *Ehrlichia canis* através de transfusões de sangue de um cão infectado para um cão susceptível, sendo este um importante mecanismo de infecção acidental, uma vez que não há hospedeiros intermediários envolvidos (EWING, 1969; WOODY; HOSKINS, 1991). Greene; Harvey (1984) relataram a transmissão por transfusão sanguínea de cães cronicamente infectados por mais de cinco anos. No entanto, cães cronicamente infectados não parecem ser o principal reservatório natural da doença, uma

vez que os carrapatos se tornam infectados ao ingerir o sangue de cães, durante os primeiros 10 a 15 dias da doença aguda (HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986).

2.1.7 Patogenia

Pouco se sabe sobre os mecanismos imunes protetores contra *E. canis*. Outras espécies de *Ehrlichia* foram estudadas, e embora todas sejam altamente espécie-específicas, as respostas imunológicas entre as espécies monocíticas parecem ser semelhantes (BROUQUI; DUMLER, 1997).

Acredita-se que as bactérias intracelulares desenvolveram a habilidade de se replicar na célula do hospedeiro, de forma a fugir do sistema imunológico. Isto funciona como um mecanismo protetor para o microrganismo, que escapa dos anticorpos, os quais não podem entrar na célula hospedeira (PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996).

Todas as espécies de *Ehrlichia* induzem à produção de anticorpos específicos no hospedeiro, naturalmente ou em casos experimentais, independente da presença de sinais clínicos. A presença de anticorpos nem sempre está correlacionada à eliminação de *Ehrlichia* spp., nem ao estado de imunidade protetora. Infecção persistente e recorrência ou re-infecção após a recuperação de doença clínica foram relatadas para várias espécies do gênero *Ehrlichia* (RIKIHISA, 1991).

Durante a fase crônica da infecção por *E. canis*, os cães apresentam infiltração plasmocítica em vários órgãos, o que indica uma resposta imune humoral vigorosa (HILDEBRANDT et al., 1973).

Em um estudo conduzido por Winslow et al.(2000), a transferência passiva de anticorpos em camundongos infectados por *E. chaffeensis* causou a eliminação da bactéria e melhora clínica do paciente, mesmo quando a infecção já estava bem estabelecida, sugerindo um modelo de imunidade a bactérias intracelulares que inclui, tanto resposta imune celular como humoral. Os cães são imunes à re-infecção enquanto albergarem o parasito (GREENE; HARVEY, 1984).

Diferenças na susceptibilidade racial são consideradas um fator importante no desenvolvimento da patogenia da erliquiose canina (WOODY; HOSKINS, 1991; BREITSCHWERDT, 1995), de modo que o curso da doença parece diferir entre as diferentes raças de cães, sendo os Pastores Alemães os mais susceptíveis ao desenvolvimento da forma grave da doença. A resposta clínica dos Pastores Alemães à infecção pela *E. canis* resultou em estados moderados ou graves da erliquiose, enquanto cães da raça Beagle geralmente

desenvolveram a forma persistente moderada da doença (NYINDO et al., 1980). Uma possível explicação pode residir nas diferenças entre as raças, em relação à sua resposta imune à infecção por *E. canis*. A imunidade mediada por células estava deprimida em cães da raça Pastor Alemão experimentalmente infectados por *E. canis*, como pode ser demonstrado pelo teste de migração dos leucócitos e diminuição na resposta de hipersensibilidade do tipo retardada a antígenos específicos. Ainda, nenhuma diferença foi observada em relação à resposta imune humoral (NYINDO et al., 1980). Tais achados apóiam a hipótese de que nesta raça a doença seja mais grave e apresente maiores riscos de vida, com prognóstico reservado, embora alguns autores não concordem com tal susceptibilidade (KUHEN; GAUNT, 1985; BREITSCHWERDT et al., 1987).

Ainda em relação à trombocitopenia, diversos mecanismos, associados ou não, podem estar envolvidos, dependendo da fase da infecção. A redução nas contagens de plaquetas na fase aguda, que começa poucos dias após a infecção, é causada pelo aumento do consumo das plaquetas em decorrência das alterações inflamatórias no endotélio dos vasos, ou do seqüestro pelo baço, além da destruição/lesão imunológica, que resultam em um tempo de vida significativamente reduzido das plaquetas (SMITH et al., 1974; SMITH et al., 1975; PIERCE et al., 1977; KAKOMA et al., 1978). Na fase crônica grave, a trombocitopenia é causada pela produção diminuída, secundária à hipoplasia medular (WOODY; HOSKINS, 1991).

Em relação à hipergamaglobulinemia policlonal, estudos mostram que não há correlação com títulos de anticorpos específicos anti-*E. canis*, com teste de Coomb's positivo e com a presença de anticorpos anti-plaquetários (APA). Estudos sobre APA em cães após a infecção experimental por *E. canis* sugerem o envolvimento de mecanismos imunológicos na patogenia da doença (HILDEBRANDT et al., 1973; WOODY; HOSKINS, 1991; RISTIC; HOLLAND, 1993; WANER et al., 1995; HARRUS et al., 1996b).

A destruição plaquetária, que foi mensurada em um estudo utilizando-se plaquetas radioativamente marcadas, ocorre em uma velocidade acelerada durante a infecção por *E. canis* e é considerada a causa primária de trombocitopenia em cães afetados. Estas plaquetas marcadas são destruídas primariamente no baço, de forma semelhante ao que acontece na trombocitopenia imunologicamente mediada em seres humanos (SMITH et al., 1975). Abeygunawardena; Kakoma; Smith (1990) demonstraram que a *E. canis* induziu à produção de altos níveis do fator de inibição da migração plaquetária, o qual induziu à alterações proeminentes na superfície das plaquetas, que levaram ao aumento da vulnerabilidade plaquetária. Entretanto, mecanismos não imunológicos também devem estar envolvidos na trombocitopenia, uma vez que cães com intensa imunossupressão foram capazes de

desenvolver trombocitopenia após a infecção experimental (REARDON; PIERCE, 1981a).

Hemorragias têm sido frequentemente associadas à trombocitopenia, que é considerada a anormalidade hematológica mais comum e persistente observada na erliquiose canina (WOODY; HOSKINS, 1991; RISTIC; HOLLAND, 1993; HARRUS et al., 1996a), embora o sangramento venha sendo recentemente associado à disfunção plaquetária, devido à redução da capacidade de adesividade (LOVERING; PIERCE; ADAMS, 1980; HARRUS et al., 1996b). Anticorpos séricos anti-plaquetários (APA) foram documentados e pensa-se que sua ligação com os receptores glicoprotéicos plaquetários possa levar à disfunção plaquetária (WANER et al., 1995; HARRUS et al., 1996a,b). Kakoma et al. (1978) referem esta trombocitopenia como imunomediada. Um fator de inibição da migração plaquetária com um peso molecular de 150.000 a 190.000, distinto do anticorpo antiplaquetário, e que é produzido por linfócitos de cães infectados pela *E. canis*, pode ser a causa da trombocitopenia (ABEYGUNAWARDENA; KAKOMA; SMITH, 1990).

Harrus et al. (1998b) investigaram as funções do baço na erliquiose monocítica canina, encontrando valores de hematócrito, hematimetria e concentração de hemoglobina significativamente mais altos em cães infectados e esplenectomizados, em comparação com cães infectados e não esplenectomizados. Desta forma, presumiu-se que a *E. canis* pudesse induzir a produção ou elaboração de um fator esplênico que conseqüentemente suprimisse a hematopoiese. A ausência deste fator nos cães esplenectomizados poderia explicar os parâmetros eritrocitários, reduzidos nos cães não esplenectomizados. É possível que este fator possa exercer um papel na supressão da medula óssea, observada na fase crônica da erliquiose canina, considerando que a habilidade de produzir respostas imunes primária e secundária está bastante prejudicada nos animais esplenectomizados (LOCKWOOD, 1983).

A anemia na fase aguda resulta de destruição aumentada (imunológica) e produção diminuída de eritrócitos (BUHLES et al., 1974; REARDON; PIERCE, 1981b). Anemias regenerativas podem ser evidentes durante este estágio, decorrentes da destruição imunológica das células vermelhas ou de sangramento intenso. Quanto às anemias Coomb's positivas, estas podem ocorrer secundariamente à cobertura inespecífica das hemácias por globulinas ou subseqüentes à resposta imune específica aos antígenos de superfície dos eritrócitos (GREENE, 1995). Anemia na fase crônica geralmente é arregenerativa e resulta da destruição contínua de hemácias, perda crônica de sangue ou diminuição da produção, secundariamente à hipoplasia medular (WOODY; HOSKINS, 1991). O mecanismo responsável pela supressão da medula óssea na erliquiose crônica ainda não foi esclarecido (BREITSCHWERDT, 1995).

Foi demonstrado que os linfócitos de cães afetados secretam um fator que exerce um efeito citotóxico em monócitos autólogos (KAKOMA et al., 1977). Este fator citotóxico pode ser o mesmo que inibe a função dos pseudópodes das plaquetas. Além disso, um fator espécieespecífico que inibe a migração de leucócitos foi isolado de cães infectados por *E. canis* (GREENE, 1995).

A hipergamaglobulinemia observada na erliquiose crônica, possivelmente representando o desenvolvimento de uma resposta autoimune secundária aos componentes das células lesadas do hospedeiro, apóia a teoria imunopatológica da doença. A ocorrência de anticorpos antinucleares (ANA) em cães afetados pela erliquiose foi investigada e relatada como infreqüente, indicando que ANA não são importantes na patogenia da erliquiose canina (KELLY et al., 1994).

Os rins também são afetados por fatores humorais na erliquiose canina (TROY et al., 1980 apud DAGNONE et al., 2003; CODNER; MASLIN, 1992). Técnicas diagnósticas utilizando imunofluorescência revelaram depósitos discretos a moderados de imunoglobulinas nos glomérulos. Uma patogenia imune mediada explicaria por que a glomerulonefrite em casos crônicos é algumas vezes não responsiva à antibioticoterapia apropriada (GREENE, 1995).

2.1.8 Sinais Clínicos

2.1.8.1 Erliquiose monocítica canina

Caracterizada por reação febril e vários sinais clínicos que podem resultar na morte do animal, a infecção em cães por *E. canis* ocorre em três estágios, identificando-se três fases clínicas comuns para erliquiose canina. Após a picada do carrapato, isto é, o período de incubação, o espectro clínico da doença pode variar de formas assintomáticas, subclínicas a formas graves, como por exemplo, a pancitopenia canina tropical (HUXSOLL et al., 1970 apud MACHADO, 2004; BUHLES et al., 1974; LOSOS, 1986; SWANGO; BANKEMPE; KONG, 1989; WOODY; HOSKINS, 1991; BREITSCHWERDT, 1995; COUTO, 1998).

Após o período de incubação, que dura oito a vinte dias (CODNER; ROBERTS; AINSWORTH, 1985; HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986) ocorre a disseminação do patógeno pelo sangue, caracterizando a fase aguda ou de disseminação, quando o microorganismo se multiplica dentro dos monócitos circulantes e no sistema monocítico fagocitário do baço, fígado e linfonodos, causando linfadenomegalia e hiperplasia do sistema

no fígado e baço. As células infectadas são transportadas através da corrente sanguínea para outros órgãos, especialmente para os pulmões, rins e meninges e se aderem ao endotélio vascular, levando à vasculite e infecção do tecido subendotelial (BREITSCHWERDT, 1995). A fase aguda é comum em áreas enzoóticas e rara em outras regiões, durando aproximadamente de duas a quatro semanas, consistindo de sinais clínicos moderados a graves, secundários à hiperplasia linfóide, febre e citopenias. Os sinais clínicos e os achados do exame físico podem incluir a presença de carrapatos, anorexia, pirexia, depressão, perda de peso, vômitos, evidência de sangramento tipo petéquias (Figura 1), sufusões (Figura 2) e epistaxe, linfadenomegalia e esplenomegalia hiperplásicas, dispnéia ou intolerância ao exercício (CODNER; ROBERTS; AINSWORTH, 1985; GLAUS; JAGGY, 1992) provocada por pneumonia e, ocasionalmente, opacidade de córnea, conjuntivite, insuficiência respiratória e edema de membros e escroto, além de sinais do sistema nervoso central (SNC), como ataxia (BREITSCHWERDT, 1995).

Mylonakis et al. (2007) realizaram um estudo retrospectivo de 61 casos de epistaxe espontânea canina entre os anos de 1998 a 2001 para determinar a prevalência e identificar a possíveis indicadores clinicopatológicos de doenças associadas a este sinal clínico. Destes, 28 foram correlacionados à erliquiose monocítica canina sendo que seis destes apresentavam infecção concomitante por Leishmaniose canina.

Os sinais neurológicos podem ser atribuídos a hemorragias, vasculite e extensa infiltração plasmocítica das meninges (GREENE; BURGDORFER; CAVAGNOLO, 1985; MEINKOTH; HOOVER; COWELL, 1989). Os sinais clínicos duram de dois dias a três semanas e podem ser acompanhados de pancitopenia, particularmente trombocitopenia.

Anormalidades neurológicas estavam presentes em 10 dos cães estudados por Frank; Breitschwerdt (1999), incluindo ataxia, paraparesia, déficit proprioceptivo, inclinação da cabeça, nistagmo, tremores e convulsões.

Quase todas as estruturas oculares podem ser afetadas, podendo ocorrer petéquias e equimoses conjuntivais ou na íris, uveíte anterior, panuveíte, edema de córnea, hifema (Figura 3), glaucoma secundário, hemorragia retiniana e descolamento de retina (COLLINS; MOORE, 1991).



Figura 1. Petéquias abdominais em cadela com trombocitopenia e erliquiose.

Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 2. Sufusão abdominal em cão com *Ehrlichia canis*.

Fonte: Arquivo pessoal.

Poucos cães sucumbem devido à fase aguda. Geralmente os sinais clínicos se resolvem sem tratamento, podendo o cão eliminar o organismo através de mecanismos imunes mediados por células, ou permanecer infectado e ingressar na fase subclínica (HIBBLER;

HOSKINS; GREENE, 1986)



Figura 3. Hifema em cão.

Fonte: Arquivo pessoal

A fase subclínica ocorre após a fase de disseminação e está associada com persistência do antígeno. Podem ocorrer anormalidades laboratoriais como citopenias e hiperglobulinemias. Um cão imunocompetente geralmente elimina os microorganismos durante esta fase, por mecanismos ainda não completamente conhecidos (CODNER; ROBERTS; AINSWORTH, 1985). A fase subclínica inicia-se seis a nove semanas após a inoculação e ocorre trombocitopenia persistente, leucopenia variável, mas geralmente os animais são assintomáticos. Esta fase pode durar meses ou anos e o cão imunocompetente ainda consegue eliminar o parasita antes do desenvolvimento da fase crônica (BREITSCHWERDT, 1995). Segundo Codner; Farris-Smith (1986), a fase subclínica pode persistir por quatro a cinco anos. Estímulos estressantes ou tratamento imunossupressor durante esta fase podem provocar a progressão para a fase crônica. Esta fase desenvolve-se em cães que não conseguem eliminar o parasito e é comum em áreas não enzoóticas. Laboratorialmente se caracteriza por hiperplasia linforreticular, citopenias e hiperglobulinemia. Trombocitopenia, leucopenia variável e anemia persistem na ausência de sinais clínicos. Os sinais começam um a quatro meses após a inoculação, são variáveis em

gravidade e incluem perda de peso, palidez, evidência de defeitos hemostáticos primários, linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia hiperplásica com hematopoiese extramedular, alterações oculares como coriorretinite, uveíte anterior, hifema, hemorragias retinianas (WOODY; HOSKINS, 1991), edema dos membros e eventualmente manifestações nervosas como ataxia, paraparesia, déficits dos nervos cranianos e convulsões (MEINKOTH; HOOVER; COWELL, 1989).

Os animais ingressam na fase subclínica, clinicamente saudáveis, entretanto, todos os valores hematológicos permanecem em níveis abaixo dos normais (RISTIC; HOLLAND, 1993). Em um estudo conduzido por Waner et al. (1997), todos os cães infectados e observados na fase subclínica da erliquiose pareceram clinicamente normais durante os seis meses do trabalho experimental, apresentando títulos de anticorpos anti-*E. canis* crescentes, indicando uma infecção prolongada e estimulação antigênica persistente. Nenhum destes animais foi capaz de eliminar naturalmente a rickettsia após a fase aguda da infecção.

Durante a fase subclínica, o peso do cão se normaliza, a febre desaparece, embora as anormalidades laboratoriais como trombocitopenia moderada e hiperglobulinemia persistam e os títulos de anticorpos continuem crescendo (RISTIC et al., 1972; BUHLES et al., 1974; WEISIGER; RISTIC; HUXSOLL, 1975). Em animais infectados experimentalmente, a fase subclínica dura de 40 a 120 dias, após o que, se o cão não conseguir eliminar o parasito através de uma resposta imunológica eficaz, começa a fase crônica (GREENE; HARVEY, 1984). Porém, a fase subclínica tem o potencial de persistir por anos (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; PERILLE; MATTUS, 1991) ou os cães, imunocompetentes, podem eliminar o organismo e se livrar da infecção sem tratamento (THRIUNAVUKKARASU et al., 1994).

Em alguns casos, podem ocorrer sinais oculares como hifema, uveíte anterior, opacidade de córnea devido à deposição de precipitados celulares e/ou edema, hemorragia subretinal resultando em descolamento da retina que pode levar à cegueira (WOODY; HOSKINS, 1991; THRIUNAVUKKARASU et al., 1994; HARRUS et al., 1998a). Tais hemorragias oculares têm sido associadas com trombocitopenia, mas também com elevação da pressão oncótica, vasculite e disfunção plaquetária, tudo isso devido à hiperglobulinemia, que leva a distúrbios da coagulação e à síndrome da hiperviscosidade (HARRUS et al., 1998a).

O estágio final da erliquiose é a fase crônica, que pode estar associada com manifestações moderadas ou graves. Infelizmente, pouco se sabe a respeito dos fatores que transformam uma infecção subclínica em um estado crônico. Sinais clínicos inespecíficos, tais como fraqueza, depressão, anorexia, perda crônica de peso, mucosas pálidas, febre e

edema periférico (SWANGO; BANKEMPE; KONG, 1989; RISTIC; HOLLAND, 1993), além de tendências hemorrágicas, linfadenomegalia, esplenomegalia, sinais oculares e infecções secundárias como pneumonia, glomerulonefrite e artrite (SWANGO; BANKEMPE; KONG, 1989; GREENE, 1995) são considerados os indicadores de erliquiose crônica.

As manifestações graves da doença podem resultar de anemia profunda, trombocitopenia, diátese hemorrágica, poliartrite (COWELL et al., 1988), distúrbios neurológicos, doença renal e problemas reprodutivos (HOSKINS, 1991), incluindo sangramento estral prolongado, incapacidade de concepção, abortos, mortes neonatais (PRICE; SAYER, 1983). Polimiosite também foi associada com erliquiose canina (BUORO et al., 1990).

Munhoz; Babo (1998) e Almosny et al. (2000) relataram que a maioria dos cães sobrevive à fase aguda e entra em um estágio crônico, de longa duração, além de não apresentarem distúrbios hemorrágicos difusos, mesmo em face de trombocitopenia marcante.

Os sinais clínicos da erliquiose canina podem variar muito entre diferentes regiões geográficas ou ainda dentro da mesma região. Os fatores que aparentemente afetam a gravidade da sintomatologia e a evolução da doença incluem variação da cepa infectante, dose do microorganismo inoculado, raça e idade do cão, imunocompetência do hospedeiro e doenças concomitantes ou infecção por outros parasitos transmitidos por carrapatos (NYINDO et al., 1980; GREENE; RIKIHISA; JOHNSON; BURGER, 1987; RISTIC; HOLLAND, 1993; McBRIDE et al., 2003).

Alguns animais saudáveis ou subclínicamente afetados podem ser capazes de seqüestrar a *E. canis* ou o microorganismo desenvolve uma forma latente por algum ou muito tempo da vida do hospedeiro, podendo causar exacerbações clínicas ocasionalmente (BARTSCH; GREENE, 1996).

2.1.8.2 Erliquiose granulocítica canina

O principal agente erliquial que infecta os granulócitos de cães (neutrófilos e eosinófilos) é a *E. ewingii*, tendo como possíveis vetores o carrapato *Amblyomma americanum* e o *Otobius megnini*. Ela causa doença moderada a grave, com claudicação, trombocitopenia e edema articular (STOCKHAM; SCHMIDT; TYLER, 1985). Além da *E. ewingii*, a *E. equi* (*Anaplasma phagocytophilum*) também causa erliquiose granulocítica

canina (EGC). A *E. equi* tem como hospedeiros naturais além do cão, o homem, equinos e lhamas e experimentais, os muares, ovinos, caprinos, gatos e primatas não humanos. O vetor conhecido é o carrapato *Ixodes ricinus*. No cão pode também ser transmitida pelo *R. sanguineus* (HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986), causando doença clínica moderada com trombocitopenia. A *E. ewingii* através da análise da seqüência do gene 16S rRNA, apresenta grande semelhança genética com o agente da erliquiose granulocítica humana (EGH) (*Anaplasma phagocytophilum*) (CHEN; DUMLER; BAKKEN, 1994), e com a *E. phagocytophila* (*Anaplasma phagocytophilum*) (ANDERSON et al., 1991), porém a semelhança é maior com a *E. chaffeensis*. O agente da erliquiose granulocítica humana (EGH), tem como hospedeiros naturais os cães, seres humanos, equinos e ratos do pé branco e experimentais ratos e cervos. O principal vetor conhecido é o *Ixodes scapularis*. A *E. phagocytophila* (agente da “febre da picada do carrapato”), tem como hospedeiros naturais os cães, ovinos, caprinos, bovinos, bisões, cervos, lhamas e humanos e experimentais cobaias e ratos. Apresenta semelhança genética com o agente da EGH (DUMLER; BAKKEN, 1995). Seus vetores conhecidos são o *I. ricinus*, *I. scapularis* e *I. pacificus* (BARLOUGH et al., 1997). Causa doença leve a moderada em cães. Tais semelhanças genéticas estão reformulando as classificações e possivelmente tais espécies granulocíticas serão incluídas com uma única espécie (DUMLER et al., 2001).

2.1.8.3 Erliquiose trombocítica canina

O agente etiológico da erliquiose trombocítica canina (ETC) é a *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) (HARVEY, 1978), que infecta as plaquetas do cão, podendo eventualmente infectar também os leucócitos. É visualizada como inclusões basofílicas no interior de plaquetas em esfregaços corados com corante de Giemsa. O vetor conhecido é o *R. sanguineus*. A ETC é uma doença que pode variar de leve a severa no cão (HARVEY et al., 1998 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). É caracterizada por trombocitopenia cíclica com parasitemia inicial onde um grande número de plaquetas são parasitadas. Alguns dias após a infecção há uma diminuição brusca no número de plaquetas e as erlíquias desaparecem da circulação. A contagem plaquetária retorna a valores próximos aos de referência em aproximadamente quatro dias. A parasitemia e trombocitopenia subsequentes 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. Os sinais clínicos começam após um período de incubação de oito a 15 dias, com alguns sinais digestivos, anorexia e distúrbios hemostáticos (BEAUFILS, 1997). O diagnóstico é feito utilizando-se os mesmos métodos utilizados para *E. canis*, sendo a reação em cadeia pela polimerase (PCR) o método mais confiável, porque a sorologia apresenta reações cruzadas (CHANG; SU; PAN, 1997).

Abarca et al. (2007) conduziram um trabalho sobre análise molecular do gênero *Ehrlichia* utilizando amostras de sangue de 30 cães no Chile e identificaram *A. platys* em 6 animais com sinais clínicos indicativos de erliquiose canina. Com estes achados concluíram que *A. platys* é um dos agentes etiológicos da erliquiose canina no Chile.

2.1.9 Diagnóstico

Pode-se suspeitar de erliquiose com base na história clínica e no exame físico de um paciente (GREENE; HARVEY, 1984). Entretanto, quanto aos aspectos clínicos, torna-se muito difícil distinguir a fase inicial ou de disseminação, da fase crônica da doença, já que a apresentação clínica e os achados laboratoriais podem ser semelhantes durante estas fases (WADDLE; LITTMAN, 1988).

A suspeita clínica da erliquiose canina pode ser confirmada por (1) identificação do microrganismo nos esfregaços de sangue periférico ou capa leucocitária e nas amostras citológicas de pulmões, linfonodos, baço ou medula óssea; (2) métodos sorológicos, como imunofluorescência indireta (IFI), dot-ELISA (Immunocomb®), ELISA (SNAP® 3Dx); imunoblot; (3) técnicas de biologia molecular, como reação da polimerase em cadeia (PCR); (4) cultivo celular.

O hemograma é uma importante e poderosa ferramenta diagnóstica podendo ser usado para monitorar a resposta à terapia, para calibrar a gravidade de uma doença, ou como um ponto de partida para formular uma lista de diagnósticos diferenciais. A interpretação do hemograma pode ser dividida em três seções: avaliação dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Cada um destes parâmetros pode ser interpretado individualmente; entretanto, a integração dos dados é importante para fechar um diagnóstico mais preciso (BARGER, 2003).

As alterações hematológicas dependem da espécie de *Ehrlichia*, da gravidade da síndrome e da duração da infecção. Segundo Losos (1986), na infecção por *E. canis*, a diminuição dos componentes sanguíneos celulares começa a ocorrer durante a fase de incubação e progride até a fase febril. As alterações hematológicas consistem de anemia, leucopenia e trombocitopenia, e aumento da sedimentação eritrocitária, associada com

hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (GREENE; BURGDORFER; CAVAGNOLO, 1985; MAGNARELLI; DUNLER, 1996).

Anemia normocítica normocrômica é considerada uma alteração comum na erliquiose canina (ALMOSNY et al., 2000; MACHADO, 2004). Os quadros anêmicos observados na erliquiose canina tendem a ser arregenerativos, com diminuição da resposta medular diante dos estímulos eritropoiéticos (ALMOSNY et al., 2000; PAGANI et al., 2000), provavelmente em decorrência do comprometimento orgânico importante, com diminuição acentuada da resposta medular, mesmo diante destes estímulos (OLIVEIRA et al., 2000).

Trombocitopenia é a alteração hematológica mais comum em todas as fases da erliquiose canina (TROY et al., 1980 apud DAGNONE et al., 2003; RISTIC; HOLLAND, 1993; WANER et al., 1995). Dagnone et al. (2003) não avaliaram a prevalência de trombocitopenia em cães com erliquiose, mas sim, que aproximadamente 20% dos cães trombocitopênicos tinham erliquiose.

Os achados mais comuns na fase aguda são trombocitopenia e concomitante e significativo aumento do volume médio das plaquetas, o que sugere trombopoiese ativa (WANER et al., 1995). Trombocitopenia significativa desenvolveu-se em cães experimentalmente infectados, cerca de 10 dias pós-infecção (PI) e foi mais grave no dia 17 PI (PIERCE; MARRS; HIGHTOWER, 1977). A contagem de plaquetas nem sempre está correlacionada com a extensão ou gravidade do sangramento, e um tempo de coagulação aumentado pode ser observado devido à inibição da agregação plaquetária (HARRUS et al., 1996b). Geralmente ocorre anemia moderada, arregenerativa, que poderá ser regenerativa quando houver babesiose concomitante ou ocorrer hemorragia intensa. Leucopenia moderada pode ser evidente cerca de três a quatro semanas após a fase de disseminação, seguida de leucocitose e monocitose (HOSKINS, 1991). O exame da medula óssea de cães com erliquiose revela anormalidades relacionadas à fase da infecção. Hiperplasia megacariocítica, especialmente hiperplasia megacariocítica, ocorre na fase inicial. A plasmocitose medular é um achado freqüente na erliquiose, independente da fase da infecção, embora também seja encontrada em outras doenças inflamatórias crônicas (HOSKINS, 1991; BREITSCHWERDT, 1995).

Destrução plaquetária é comumente imunomediada entretanto, agentes infecciosos como *A. platys* e o vírus da cinomose canina, podem causar trombocitopenia por destruição (RUSSELL; GRINDEM, 2000).

Bulla et al. (2004) desenvolveram uma pesquisa em Botucatu, SP, correlacionando o grau de trombocitopenia com a infecção por *E. canis* em uma área endêmica e evidenciaram,

através da análise molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR), que 84,1% dos cães trombocitopênicos e 1,4% dos cães não trombocitopênicos eram positivos para *E. canis*.

Em um estudo sobre a prevalência de *E. canis* em cães trombocitopênicos do Rio de Janeiro, foram verificados através de PCR amostras de 226 cães, sendo 36 (32,1%) dos cães trombocitopênicos e 4 (3,5%) de cães não trombocitopênicos positivos para *E. canis*. Embora a prevalência da infecção por *E. canis* seja alta em cães trombocitopênicos, menos de um terço dos cães desta pesquisa demonstraram a infecção por *E. canis*. Portanto, a trombocitopenia não é um dado específico para a detecção de *E. canis* e não deveria ser usada para estabelecer um diagnóstico de erliquiose canina mesmo em uma área geográfica de alta prevalência da doença (MACIEIRA et al., 2005).

Dagnone et al. (2003), verificaram que apenas 12 dos 61 (19,7%) cães com trombocitopenia tinham erliquiose. Prevalência similar ocorreu em cães com trombocitopenia e anemia (um de oito positivos), e em cães com trombocitopenia e carrapatos (dois de sete positivos).

Segundo Neer et al. (2002), a trombocitopenia é um achado comum em cães com erliquiose. Nos EUA, trombocitopenia foi encontrada em 77% dos cães com erliquiose num estudo sorológico retrospectivo desenvolvido por Frank e Breitschwerdt (1999) e em todos os 30 cães analisados por Troy et al. (1980) apud Dagnone et al. (2003). Em Israel, quando a erliquiose era mais prevalente que nos EUA, trombocitopenia estava presente em 27% dos cães em uma pesquisa sorológica realizada por Baneth et al. (1996) apud Dagnone et al. (2003). Diferenças na prevalência podem refletir a diversidade da patogenicidade das cepas ou ser uma polarização da seleção, porque cães trombocitopênicos são mais testados para a erliquiose. A inoculação experimental de *E. canis* não desenvolve sempre a trombocitopenia. Nenhum dos nove cães inoculados com a cepa brasileira de *E. canis* desenvolveu trombocitopenia durante 14 semanas de observação por Almosny (1998), considerando que trombocitopenia se desenvolveu em quatro semanas em quatro cães inoculados com uma cepa brasileira diferente de *E. canis* por Castro et al. (2004).

Hess et al. (2006) não verificaram anormalidades hematológicas exceto trombocitopenia em todos os cães infectados experimentalmente por *E. canis* e não determinaram imunossupressão e outros sinais clínicos característicos da doença nestes animais com exceção de febre.

As principais alterações hematológicas encontradas na pesquisa de Albernaz et al. (2007) foram trombocitopenia, anemia normocítica normocrômica e o desvio nuclear de neutrófilos a esquerda (DNNe) leve, além de linfocitopenia e eosinopenia absolutas. Anemia

foi observada em 133 (60,7%) dos 219 cães infectados, com predomínio do tipo normocítica normocrômica em 90 casos (41,1%), uma alteração eritrocitária comum na erliquiose canina.

Alterações leucocitárias podem não ser bem evidenciadas até a quarta semana de infecção, quando a leucopenia começa a ser uma alteração hematológica importante (CASTRO et al., 2004), em virtude da supressão medular (OLIVEIRA et al., 2000).

Albernaz et al. (2007) observaram nos casos positivos 0,91% de leucocitose, 10,05% de leucopenia e 89,04% dos casos sem alteração na leucometria global. Já, Oliveira et al. (2000) e Moreira et al. (2003) relataram a leucopenia como achado importante com, respectivamente, 32,69% e 30% em suas pesquisas, citando-a como uma alteração hematológica característica da fase aguda apesar de não ter sido descrita por Waddle; Littman (1988) e Meinkoth; Clinkenbeard (2000).

Em relação aos neutrófilos, Albernaz et al. (2007) registraram neutrofilia em 5,02% e neutropenia em 5,48% dos cães positivos. DNNE leve sem leucocitose ocorreu em 15,98% dos casos. Segundo Castro et al. (2004), a alteração na contagem neutrofílica pode ser influenciada pela fase da doença, sendo normalmente observada neutropenia na fase aguda. O DNNE pode estar relacionado a infecções secundárias além de migração, seqüestro e destruição de neutrófilos em órgãos que ocorrem multiplicação do microrganismo, vasculites e inflamação (MOREIRA et al., 2003).

Dos cães avaliados por Albernaz et al. (2007), 3,19% apresentaram linfocitose e 17,35%, linfocitopenia, que tem sido descrita como uma alteração hematológica importante da erliquiose canina, particularmente em relação à fase aguda, por Waddle; Littman (1988), Oliveira et al. (2000) e Castro et al. (2004). A linfocitopenia observadas nos casos de erliquiose canina é relacionada a uma decorrência da linfocitólise e/ou seqüestro de grande quantidade destas células nos tecidos, particularmente nos linfóides, segundo Mendonça et al.(2005).

Oliveira et al. (2000) relataram monocitopenia em 80,77% dos cães infectados, enquanto Waddle e Littman (1988) relataram 51% em suas pesquisas. Embora Albernaz et al. (2007) evidenciam monocitose em 10,05% e ausência de monocitopenia em 28% dos cães, Castro et al. (2004) não consideram a monocitose como um achado expressivo e Stiles (2000) afirma a variação da contagem de monócitos no transcorrer da doença e estar consideravelmente aumentada na fase crônica.

ALBERNAZ et al. (2007) observaram eosinofilia em 3,65% dos cães infectados e eosinopenia em 24,2%. Já Waddle e Littman (1988) identificaram proporção superior em 63% dos cães e Oliveira et al. (2000), em 55,77%, mas confirmando os achados de Castro et al.

(2004) que relataram a eosinopenia como uma característica hematológica importante da erliquiose canina, particularmente na fase aguda.

Hiperproteinemia, primariamente resultante da elevação das globulinas, é comumente detectada uma a três semanas após o início da infecção (BUHLES et al., 1974; TROY et al., 1980 apud DAGNONE et al., 2003). Hiperglobulinemia, mesmo de grandes magnitudes, não evita infecções por parasitas do gênero Ehrlichia e geralmente persiste por um mínimo de 6 a 18 meses após o microrganismo ser eliminado através de terapia adequada (GREENE; HARVEY, 1984). Hipoalbuminemia concomitante é freqüentemente observada e pode ser causada pelos seguintes fatores: perda de sangue; redução da ingestão protéica; perda protéica periférica devido a fluidos inflamatórios edematosos resultantes de vasculite; redução da produção de proteínas devido a hepatopatas concomitantes, e proteinúria devido à glomerulonefrite por imunocomplexos (WOODY; HOSKINS, 1991; CODNER et al., 1992).

Em um estudo retrospectivo, onde foram avaliadas as concentrações das diferentes proteínas séricas em 42 casos de erliquiose canina, 41 deles apresentaram gamopatia policlonal (HARRUS et al., 1996c). Embora a eletroforese das proteínas séricas tenha demonstrado gamopatas policlonais na maioria dos cães infectados, alguns poucos podem apresentar gamopatas monoclonais (PERILLE; MATUS, 1991; HARRUS et al., 1996c). Nos estágios iniciais da doença, geralmente aparecem proteínas de fase aguda, conforme foi evidenciado por alterações iniciais em alfa globulinas (BURGUEN et al., 1971).

Elevações da alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FAL) geralmente ocorrem e podem estar acompanhadas de hiperbilirrubinemia moderada, hiperfosfatemia e azotemia (WADDLE; LITTMAN, 1988; WOODY; HOSKINS, 1991).

Em líquido cérebro-espinhal de cães com sinais do sistema nervoso central (SNC), geralmente observa-se níveis discretamente elevados de proteínas e pleocitose mononuclear, especialmente de linfócitos e plasmócitos (GREENE; BURGDORFER; CAVAGNOLO, 1985; WOODY; HOSKINS, 1991).

Em relação à fase subclínica da erliquiose canina, as alterações comumente encontradas são a trombocitopenia moderada persistente, com aumento concomitante do tamanho da plaqueta, leucopenia e anemia variáveis, e concentrações séricas aumentadas de gamaglobulinas (WANER et al., 1997). Codner; Farris-Smith (1986) demonstraram que a anemia se resolve, as contagens de plaquetas retomam aos valores normais em cerca de 50% dos cães com erliquiose subclínica prolongada, a leucopenia geralmente desaparece e ocorre neutropenia relativa e linfocitose.

O parâmetro hematológico mais confiável para avaliar a infecção subclínica parece

ser um estado de trombocitopenia moderada. Este elemento, juntamente com títulos continuamente altos na IFI, é altamente indicativo de erliquiose subclínica, e a hiperglobulinemia aumenta ainda mais esta suspeita (WANER et al., 1997).

Na fase crônica pode ocorrer pancitopenia, causada por hipoplasia de todos os precursores celulares da medula óssea. Esta manifestação grave é observada mais freqüentemente em cães da raça Pastor Alemão (BUHLES et al., 1974; SWANGO; BANKEMPE; KONG, 1989). Cães pancitopênicos tiveram concentrações significativamente mais baixas de proteína total, globulina total e gamaglobulina do que cães não pancitopênicos (HARRUS et al., 1996c).

Eletroforese do soro geralmente indica hiperglobulinemia policlonal, com aumento de alfa-2, beta e gamaglobulinas nas fases crônicas da infecção. Hiperglobulinemia monoclonal ocasional foi encontrada em cães cronicamente infectados. Hiperviscosidade sérica foi identificada em animais com erliquiose crônica (HOSKINS; BARTA; ROTHSCHMIT, 1983). A hipoalbuminemia observada em todas as fases da doença pode agir como um mecanismo compensatório para a hiperglobulinemia, a fim de manter a pressão oncótica e evitar o aumento da viscosidade do sangue (WOODY; HOSKINS, 1991).

a Identificação Direta do Parasito

Os microrganismos raramente são identificados em preparados citológicos, e as mórulas ou inclusões intracitoplasmáticas de *E. canis* aparecem com maior freqüência na fase aguda ou de disseminação da doença (TROY et al., 1980 apud DAGNONE et al., 2003; HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986). O diagnóstico definitivo é baseado no achado de inclusões nas células mononucleares do sangue de animais infectados e algumas vezes é difícil demonstrar a forma típica da mórula porque o parasita está presente no sangue, apenas em pequeno número, podendo levar a resultados falso negativos (TROY et al., 1980 apud DAGNONE et al., 2003; HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986, RIKIHISA, 1991). Aspirados ou biopsias de pulmão, linfonodos e baço (com a freqüência de achado nesta ordem) de cães com erliquiose, revelam inclusões intracitoplasmáticas em mononucleares (GREENE; HARVEY, 1984). Normalmente, as mórulas só são encontradas durante as duas primeiras semanas após a infecção, que correspondem à fase aguda da doença (KUEHN; GAUNT, 1985; HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986), sendo algumas vezes, a proporção de células infectadas, menor do que um por cento (COWELL et al., 1988). As espécies de erlichias que causam a erliquiose monocítica são menos freqüentemente observadas no

sangue, uma vez que o nível de infecção dos monócitos do sangue é baixo (RIKIHISA,1991). Segundo Elias (1992), os corpos de inclusão são mais freqüentemente observados do que as mórulas em cães infectados, na fase febril. Durante a fase de portador, os microrganismos são raramente encontrados e o diagnóstico é difícil, se não impossível. Grânulos citoplasmáticos que geralmente estão presentes em leucócitos não parasitados, não são facilmente diferenciados de corpúsculos elementares solitários, através da coloração de Giemsa.

Almosny (1998) realizou o diagnóstico laboratorial através da observação de mórulas em esfregaços de sangue periférico (da ponta de orelha). Os esfregaços foram efetuados segundo recomendações de Neitz; Thomas (1938) apud Almosny (1998), que utilizavam apenas a primeira gota de sangue, porque esta corresponde, verdadeiramente, ao sangue periférico. As gotas seguintes são sangue circulante (ALMOSNY, 1998).

Quando as mórulas de *E. canis* são encontradas em leucócitos, estão geralmente presentes mais freqüentemente nos linfócitos do que nos monócitos (EWING et al., 1971; MYLONAKIS et al., 2003).

Por ser a pesquisa da mórula nas células circulantes nos esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, exaustiva e geralmente frustrante, recomenda-se que sejam feitos esfregaços finos, de preferência de sangue capilar das margens das orelhas (EWING, 1969; HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986; MYLONAKIS et al., 2003). Em cães leucopênicos, recomenda-se a realização da leucoconcentração, através da confecção de um esfregaço da capa leucocitária (EWING, 1969; GREENE; HARVEY, 1984; HIBBLER; HOSKINS; GREENE, 1986). Troy; Forrester (1990) citam que há maior freqüência de células infectadas na borda da extensão sanguínea.

As inclusões estão geralmente presentes em monócitos, mas podem ser encontradas em neutrófilos, linfócitos ou eosinófilos, dependendo da cepa envolvida. Múltiplas mórulas em vários estágios de desenvolvimento podem estar presentes no citoplasma de uma única célula (GREENE; HARVEY, 1984).

Na fase crônica da doença, dificilmente as mórulas são encontradas em esfregaços sanguíneos corados (LEITE; RIBEIRO, 2003 apud MACHADO, 2004).

Em sua pesquisa, Albernaz et al. (2007) utilizaram amostras de sangue total e periférico de 1576 cães oriundos da cidade de Campos de Goitacazes, RJ, e evidenciaram corpúsculos iniciais, elementares ou mórulas em 219 (13,89%) lâminas avaliadas em pesquisa de hemoparasitos, sendo consideradas positivas para *Ehrlichia spp.*.

Além de sangue e medula óssea, aspirados teciduais ou *imprints* de amostras de biopsias, especialmente retirados dos pulmões, linfonodos e baço, assim como o líquido

sinovial de cães em áreas endêmicas, com claudicação aguda, podem ser analisados para pesquisas de inclusões intra-citoplasmáticas (REARDON; PIERCE, 1981b; HOSKINS, 1991).

b Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Vários estudos recentes têm demonstrado que a PCR é um método eficaz e extremamente sensível para detectar a presença de *Ehrlichia* spp. em animais infectados, a partir de amostras de sangue e tecidos (IQBAL; RIKIHISA, 1994a; DAWSON; WARNER; EWING, 1997). A PCR é mais sensível do que o isolamento em cultivo celular (McBRIDE et al., 1996). Em um estudo conduzido por Harrus et al. (1998a) foi demonstrado que o DNA extraído de aspirados esplênicos é a melhor fonte para uma amostra para PCR, a fim de diagnosticar o estado portador de *E. canis* durante a erliquiose sub-clínica. Um resultado PCR positivo pode ser obtido a partir de quatro dias pós-infecção (PI) e indica infecção, ao contrário de um resultado positivo na IFI, que apenas indica exposição prévia (NEER et al., 2002). Iqbal; Rikihisa (1994a) concluíram que a PCR é um teste altamente sensível e específico para a detecção de níveis muito baixos de *E. canis*.

Mathew et al. (1997) caracterizaram um novo isolado de *A. platys* usando microscopia eletrônica e PCR e indicaram em seus resultados que o PCR pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico da infecção por *A. platys* e ainda verificaram nas avaliações hematológicas diárias um alto grau de trombocitopenia imediatamente após o pico da parasitemia.

Ferreira et al. (2007) conduziram uma pesquisa com 101 cães que apresentavam corpúsculos de inclusão em plaquetas. Foi realizada a comparação entre a análise morfológica e a molecular (através do PCR), não havendo diferença significativa entre os dois métodos.

No trabalho realizado por Macieira et al. (2005), o DNA riquetsial foi encontrado em 32,1% dos cães trombocitopênicos e em 3,5% dos animais não trombocitopênicos enquanto o DNA de *E. canis* foi detectado em 26,8% dos cães com trombocitopenia e 3,5% dos cães não trombocitopênicos.

c Cultivo celular

Estudos recentes demonstraram que as espécies monocíticas de *Ehrlichia* podem ser cultivadas em linhagens celulares oriundas de seus hospedeiros naturais ou em linhagens de células de outros mamíferos. A linhagem contínua de células caninas DH82 (cepa Oklahoma)

foi estabelecida a partir de células de um cão com histiocitose maligna e é a linhagem utilizada nos testes de IFI. Recentemente, Keysary et al. (2001) testaram com sucesso a adaptação da cepa Israeli em uma linhagem contínua de macrófagos de camundongos (1774. AI). Desde o desenvolvimento de um método *in vitro* para cultivar *Ehrlichia canis*, por Nyindo et al. (1971), vários relatos têm sido feitos por outros autores.

O cultivo celular visa amplificar o número de corpúsculos erliquiais em um espaço de tempo relativamente curto (MUTANI; KAMINJOLO, 2001). Entretanto, na rotina clínica, o isolamento por cultivo é laborioso e impraticável nos laboratórios de microbiologia clínica, pois leva de 14 a 34 dias para fornecer resultados, além de requerer ambientes e técnicas de cultivo apropriadas, além do alto custo (IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA, 1994).

Alguns pré-requisitos para o sucesso do cultivo precisam ser levados em consideração. São eles: o estágio de infecção em que se encontra o animal, a presença de linhagens de células específicas ou a necessidade de lavagens peritoniais repetidas, a fim de se obter as células infectadas. Tanto os macrófagos peritoniais como os monócitos circulantes de cães são igualmente susceptíveis à infecção por *E. canis*. As células infectadas podem ser detectadas 60 horas após a inoculação, e a replicação se torna evidente dos 12 aos 18 dias (STEPHENSON; OSTERMAN, 1977).

d Diagnóstico Indireto

Bélanger et al. (2002) compararam quatro métodos de detecção sorológica para diagnóstico de erliquiose canina e determinaram a imunofluorescência indireta como o melhor ensaio.

A infecção por *E. canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos. A primeira produção de anticorpos ocorre sete dias após a infecção e é composta de IgA e IgM (WEISIGER; RISTIC; HUXSOLL, 1975). Iqbal; Rikihisa (1994b) detectaram títulos iniciais de IgG pelo teste de anticorpos imunofluorescentes indiretos (IFI), entre o 2º e o 6º dia PI, enquanto Waner et al. (1995), Waner et al. (1996) e Waner et al. (1998), apenas aos 15 dias PI; e estes títulos variaram entre 1:160 e 1:640. Alguns cães, entretanto, não se soroconverteram até o 28º dia PI (RISTIC et al., 1972; BUHLES et al., 1974). McBride et al. (2003) inocularam diferentes diluições de *E. canis* em cães e observaram que a diluição mais alta não foi capaz de infectar todos os cães, e os que foram infectados desenvolveram títulos de anticorpos mais tardiamente, isto é, aos 35 dias PI.

Além da IFI, outras técnicas sorológicas como dot Elisa - Imunocomb, Elisa utilizando antígeno recombinante e *immunoblotting*, têm sido desenvolvidas e podem ser úteis na determinação de imunoglobulinas, muito embora com o cuidado de uma adequada interpretação.

Desde a sua descrição por Ristic et al. em 1972, a IFI tem sido o método sorológico mais amplamente utilizado para o diagnóstico da erliquiose canina e é considerado o teste padrão ouro, indicando exposição à *Ehrlichia spp.* (RISTIC et al., 1972; WANER et al., 2001). Embora não exista um consenso, amostras de soro com títulos de imunoglobulinas maiores do que 1:20 são geralmente consideradas positivas, mas este valor pode variar entre os laboratórios (RISTIC et al., 1972; GREENE, 1995).

Muito embora a IFI seja um teste sensível e específico, não apresentando reação cruzada com *A. platys* e *R. rickettsii*, a reação cruzada com as outras espécies do gênero *Ehrlichia* pode representar um sério problema na interpretação dos resultados (NEER et al., 2002). Também, a utilização da técnica de IFI não permite a diferenciação da espécie de *Ehrlichia* infectante, particularmente entre aquelas do mesmo genogrupo.

Diante do exposto, fica evidente que a IFI, assim como outras técnicas sorológicas, não permite identificar a fase da doença na qual o animal se encontra, de forma que um título positivo apenas demonstra que o cão foi exposto ao agente em algum momento (WOODY; HOSKINS, 1991). Da mesma forma que nas infecções por *N. risticii*, em cães infectados por *E. canis*, quanto maior o título de anticorpos do paciente, mais provavelmente a presença do patógeno está associada com a doença. No entanto, Waner et al. (1997) demonstraram a persistência de altos títulos para IFI (1:2.560 a 1:20.480) na fase sub-clínica da infecção, por um período de seis meses. Tais achados também foram relatados por Burghen et al. (1971) e Codner; Farris-Smith (1986), indicando uma longa duração da infecção e estimulação antigênica crônica, o que sugeriu que nenhum destes animais foi capaz de eliminar naturalmente a infecção após a fase aguda da doença, conforme citam Greene; Harvey (1984).

2.1.10 Tratamento

Em um estudo conduzido por Breitschwerdt; Hegarty; Hancock (1998), cães infectados experimentalmente e não tratados eliminaram a infecção espontaneamente, ou no mínimo ocorreu uma redução da erlichemia, a ponto do microrganismo não ser detectado por cultivo celular, PCR ou mesmo em animais transfundidos com o sangue destes cães.

Doxiciclina é o melhor tratamento para erliquiose monocítica canina (NEER et al., 2002). A resposta clínica a este tratamento na fase aguda é rápida (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998). A doxiciclina, assim como outras ciclinas, exibe uma atividade bacteriostática se ligando aos ribossomos bacterianos, danificando a síntese protéica (SHAW; RUBINS, 1986). As bactérias exigem a proteína com a finalidade de inibir a fusão fagolisossomal dentro dos monócitos contaminados (BROUQUI; RAOULT, 1991). A atividade bacteriostática depende da duração em que as concentrações da droga permanecem acima da concentração inibitória mínima (DAVOUST et al., 2005).

A tetraciclina (22 mg/kg três vezes ao dia por 14 dias por via oral) ou doxiciclina (10 mg/kg por dia por 14 dias por via oral) representam o tratamento de escolha para erliquiose (BREITSCHWERDT, 1995), mas alguns autores dizem que esta duração do tratamento pode não ser suficiente, principalmente na fase crônica, e sugerem até oito semanas de tratamento (WOODY; HOSKINS, 1991). O consenso atual de um grupo de autores sugere utilizar a doxiciclina na dose de 10 mg/kg via oral a cada 24 horas por 28 dias (NEER et al., 2002). O cloranfenicol (50 mg/kg três vezes ao dia por 21 dias por via oral) e o dipropionato de imidocarb (5 mg/kg em duas injeções intramusculares com 14 dias de intervalo) também podem ser indicados no tratamento da erliquiose canina (EWING, 1969; PRICE; DOLAN, 1980).

Ainda, alguns trabalhos demonstraram que não há diferença de respostas clínicas entre cães tratados com doxiciclina (10 mg/kg/dia por 28 dias), ou com imidocarb (5 mg/kg em duas injeções com 15 dias de intervalo), ou com ambas as drogas simultaneamente, apesar das contagens de plaquetas terem levado mais tempo para se normalizarem nos cães que receberam imidocarb, quando comparados com os tratados com doxiciclina (SÁINZ et al., 1996). Sousa et al. (2004) concluíram ser desnecessário utilizar doxiciclina e imidocarb em conjunto para o tratamento da erliquiose canina.

O prognóstico de infecções por *E. canis* depende principalmente da fase da doença no momento em que a terapia é iniciada (WOODY; HOSKINS, 1991). O prognóstico na fase aguda da erliquiose canina é geralmente bom quando o tratamento é apropriado. Uma dramática melhora clínica geralmente ocorre dentro de 24 a 48 horas após o início da administração de tetraciclina em cães na fase aguda ou crônica. O prognóstico na fase subclínica é bom a reservado porque esta fase é assintomática e os cães afetados apresentam risco de desenvolverem a forma crônica da doença (HARRUS; BARK; WANER, 1997). Uma rápida melhora clínica é freqüentemente observada em cães cronicamente infectados,

entretanto, pode levar até um ano para a recuperação hematológica completa, a qual pode ser retardada devido à administração contínua ou prolongada de tetraciclina. Hemorragias ou infecções concomitantes podem contribuir para a morte de cães cronicamente afetados, apesar da terapia adequada (BREITSCHWERDT, 1995).

Um resultado positivo no teste de IFI exclui o cão de ser doador de sangue e todos os esforços devem ser feitos a fim de eliminar o estado de portador (KAKOMA, 1994). Os cães doadores devem ser soro-negativos em duas amostras, com um mês de intervalo, repetindo o exame sorológico anualmente (WOODY; HOSKINS, 1991).

2.1.11 Profilaxia

Devido à grande especificidade de hospedeiro, *R. sanguineus* está completamente adaptado ao ambiente do cão, sendo frequentemente encontrado na casinha do animal e nos orifícios das paredes (LEWIS et al., 1977 apud DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). Sempre se recomenda o controle de carrapatos, e alguns autores sugerem tratar os cães com baixas doses de tetraciclina (6 mg/kg) por até dois anos e/ou oxitetraciclina de longa ação (200 mg 1M duas vezes por semana) a fim de evitar que os carrapatos se tornem infectados nas regiões altamente endêmicas (GREENE; HARVEY, 1984; BREITSCHWERDT, 1995). Não há evidências de efeitos colaterais com a utilização desta dosagem profilática, a não ser ceratite seca e amarelamento dos dentes em cães jovens (WILDER, 1977). Esta conduta é indicada para infecções recorrentes, em canis onde as medidas de controle de carrapatos têm eficácia limitada. Devido ao frequente transporte de cães sem quarentena e à infecção crônica assintomática por *E. canis*, sempre há o perigo de novos focos endêmicos se estabelecerem em regiões previamente não afetadas (MAGNARELLI et al., 1990).

Embora Winslow et al. (2000) tenham demonstrado o papel dos anticorpos na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, até o momento não existe uma vacina contra *E. canis* (BREITSCHWERDT, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Período e local

Foram avaliados os laudos laboratoriais dos exames hematológicos de 3019 cães, machos e fêmeas, com idades variando entre dois meses a 23 anos, atendidos no período de maio de 2006 a junho de 2007 em diferentes clínicas veterinárias e encaminhados ao CEVET LAGOS, laboratório veterinário localizado na cidade de Cabo Frio, que atende toda a Região dos Lagos (Araruama, Arraial do Cabo, Búzios, Cabo Frio, Iguaba e São Pedro da Aldeia), no Estado do Rio de Janeiro (Figura 4).



Figura 4. Vista aérea da Região dos Lagos no Estado do Rio de Janeiro

3.2 Hemograma e pesquisa de hemoparasitos

As amostras de sangue foram enviadas para exames neste laboratório em tubo contendo EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético – 11%).

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 BC – 2800 Vet auto analisador hematológico (MINDRAY) (Figura 5).



Figura 5. Vet auto analisador hematológico

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

Os esfregaços foram obtidos através da extensão do sangue total em superfície de lâmina e corados com corante panótico Instant-prov (Newprov). As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica utilizando objetiva de imersão (Microscópio Nikon – Eclipse E200) (Figura 11) para realização da leucometria específica, segundo Jain (1986), com auxílio do contador de células (Figura 6), e visualização de corpúsculos de inclusão ou mórulas em leucócitos e/ou plaquetas. A diferenciação das espécies de hemoparasitos, encontradas nas lâminas de esfregaço sanguíneo, foi baseada no tipo de célula parasitada e também na sua morfologia.



Figura 6. Contador de células e microscópio Nikon

3.3 Seleção dos animais

Os dados obtidos a partir do hemograma foram tabulados em uma planilha do Microsoft Excel e avaliados quanto à contagem de plaquetas, selecionando-se aqueles animais em que foi evidenciada a trombocitopenia. Posteriormente identificando-se dentre estes a frequência de infecção de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* demonstrada em esfregaços sanguíneos.

3.4 Análise Descritiva

Foram avaliados os dados do eritograma e leucograma em relação aos agentes etiológicos identificados, e, através de uma análise descritiva foi possível correlacionar melhor estas informações.

Foram calculados média e desvio padrão dos parâmetros principais, através de planilha do Microsoft Excel, realizando uma análise mais ampla quanto aos achados mais comumente encontrados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem de plaquetas

Dos 3019 cães analisados, 1127 apresentaram contagem de plaquetas abaixo de 200.000/ μ l, o que corresponde a 37,33% de cães com trombocitopenia.

A trombocitopenia foi o principal achado hematológico observado em todas as fases da erliquiose canina nas pesquisas desenvolvidas por Almosny et al. (2000), Pagani et al. (2000) e Moreira et al. (2003), sendo relacionada principalmente à destruição de plaquetas por mecanismos auto-imunes, com diminuição da sobrevivência e da capacidade de agregação (MENDONÇA et al., 2005). A trombocitopenia canina é uma alteração comum nos achados laboratoriais de cães parasitados por ectoparasitas corroborando com os achados de Bulla et al. (2004), que confirmaram através do PCR que 84,1% dos cães com trombocitopenia eram positivos para *E. canis*. Neer et al. (2002) também relatam que a diminuição do número de plaquetas é um achado comum na erliquiose canina. Nos EUA, trombocitopenia foi encontrada em 77% dos cães com erliquiose num estudo sorológico retrospectivo desenvolvido por Frank e Breitschwerdt (1999) e em todos os 30 cães analisados por Troy et al. (1980) apud Dagnone et al. (2003).

A alta prevalência de trombocitopenia foi encontrada nos estudos de Waddle; Littman (1988), Troy; Forrester (1990), Waner et al. (1997) que a detectaram em 84%, 86% e 89%, respectivamente. Por outro lado, em um estudo mais recente, Macieira et al. (2005) encontraram uma frequência de 32,1% de positividade pelo PCR em cães trombocitopênicos do Rio de Janeiro, semelhante aos resultados de Dagnone et al. (2003), onde 19,7% dos cães trombocitopênicos tinham *E. canis*.

Macieira et al. (2005) concluíram que a trombocitopenia não é específica para a detecção da infecção por *E. canis*, não podendo ser utilizada como único fator determinante no diagnóstico de erliquiose canina, mesmo em uma área geográfica de alta prevalência.

4.2 Frequência de infecção

De 1127 cães, 84 foram positivos para hemoparasitos visualizados em seus esfregaços sanguíneos, determinando uma frequência de 7,45% de erliquiose nos animais trombocitopênicos. Já em relação ao total de 3019 cães estudados, 2,78% foram positivos para estes hemoparasitos. Neste aspecto, Albernaz et al. (2007) encontraram em Campos dos Goitacazes, 13,89% dos cães positivos para *Ehrlichia* spp..

Estruturas compatíveis com corpúsculos iniciais, elementares ou mórulas de *Ehrlichia* spp. (Figura 7) e *Anaplasma platys* (Figura 8) foram identificadas em, respectivamente, 55 cães (65,5%) e 29 cães (34,5%). Os outros 1043 cães com trombocitopenia foram considerados negativos e necessitariam de mais estudos laboratoriais para confirmar e determinar a possível causa desta alteração, estando ou não relacionada à doença, já que, na fase crônica da doença, dificilmente as mórulas são encontradas em esfregaços sanguíneos corados (LEITE; RIBEIRO, 2003 apud MACHADO, 2004).

Por estes dados parasitológicos, observa-se uma frequência de infecção por *Anaplasma platys* de 34,5% em relação ao número de animais com hemoparasitos e 0,96% em relação ao número total de animais pesquisados. Por outro lado, o número de cães positivos para *Ehrlichia* spp. foi de 55 (65,5% dos animais parasitados) e 1,82% em relação ao total de 3019 cães avaliados.

Vale ressaltar que, dos 84 cães naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e/ou *Anaplasma platys*, quatro (4,8%) apresentaram infecção concomitante com *Babesia canis*, achado aproximado ao de Mendonça et al. (2005) e Moreira et al. (2002) que relatam a ocorrência em 3,67% e 3,44%, respectivamente.

Macieira et al. (2005) encontraram uma frequência de 32,1 % de positividade para *E. canis* pelo PCR nos cães trombocitopênicos do Rio de Janeiro e Dagnone et al. (2003) encontraram uma frequência de 19,7%.



Figura 7. Mórula de *Ehrlichia* spp. em agranulócito de cão. 1000x.

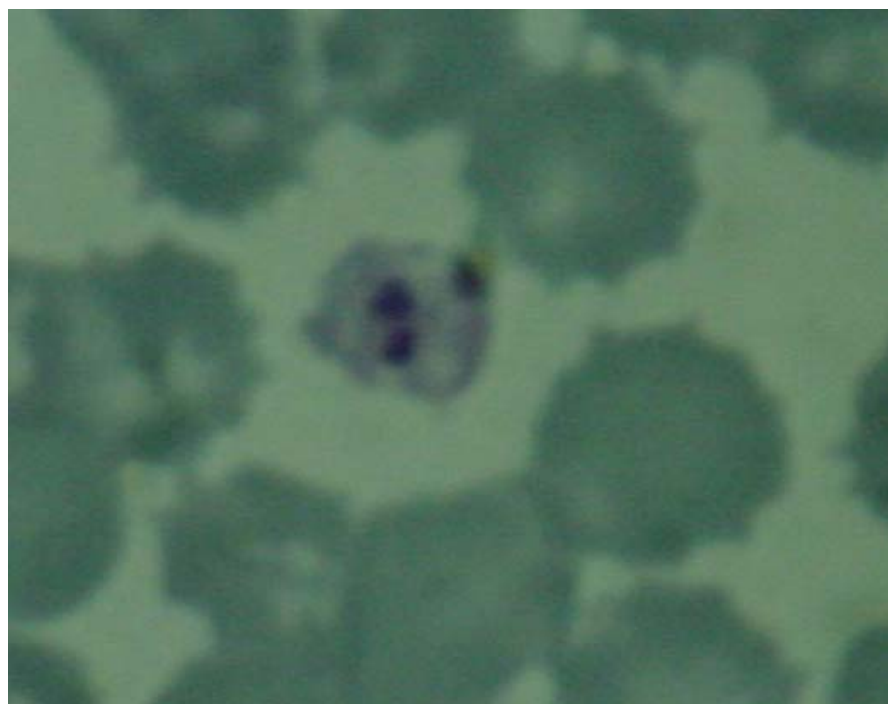


Figura 8. Mórulas de *Anaplasma platys* em plaqueta de cão. 1000x.

4.3 Alterações hematológicas

As alterações hematológicas encontradas nos 84 cães trombocitopênicos com erliquiose canina encontram-se listadas nas Tabelas 1 e 2.

Conforme demonstrado na Tabela 1, ocorreu uma grande amplitude de variação nos valores dos eritrogramas e leucogramas dos exames analisados. Os resultados foram condizentes aos encontrados por Mendonça et al. (2005) e Albernaz et al (2007).

As contagens médias de eritrócitos, dos hematócritos e das hemoglobinas, ficaram abaixo dos valores de normalidade de Meinkoth; Clinkenbeard (2000), enquanto que os valores do volume globular médio (VGM) e da concentração de hemoglobina globular média (CHGM) se mantiveram nos valores de referência de Meinkoth; Clinkenbeard (2000), caracterizando a anemia normocítica normocrômica, como um importante achado neste estudo, igualmente notado por Kuehn; Gaunt (1985). Segundo Breitschwerdt (1995), estes resultados se devem à supressão das séries eritróide, mielóide e megacariocítica na medula óssea, principalmente na fase crônica da erliquiose canina, o que acarretaria baixa ou nenhuma produção desses tipos celulares.

No leucograma, os valores médios da contagem, embora estivessem dentro da faixa de normalidade de Meinkoth; Clinkenbeard (2000), a amplitude de variação foi grande o que está de acordo com Mendonça et al (2005) e Albernaz et al (2007). Esta variação e a discordância com outros pesquisadores, provavelmente, se devem a fatores inerentes a patogenicidade da cepa, ao curso da doença, resposta individual do animal e possível presença de outros agentes infecciosos.

Leucocitose esteve presente em 33,3% destes casos, enquanto que, leucopenia em 9,5%. Já 57,1% se apresentavam com valores dentro da normalidade. Os valores leucométricos médios situaram-se dentro do valor de normalidade a exemplo de Mendonça et al. (2005) e Albernaz et al. (2007). Segundo Castro et al. (2004) as alterações leucocitárias podem não ser bem evidenciadas até a quarta semana de infecção, quando a leucopenia começa a ser importante, em virtude da supressão medular. Embora a leucopenia tenha sido relatada como uma das alterações mais comuns por diversos autores como, Warner et al. (1977), Oliveira et al. (2000) e Moreira et al. (2003); Mendonça et al. (2005) encontraram 24,77% de leucopenia nos animais avaliados do seu estudo, achado este semelhante ao de Kuehn; Gaunt (1985) que a detectaram em 25% dos cães analisados, próximo aos de Troy; Forrester (1990) e Moreira et al. (2000) que a observaram em 31 e 30%, respectivamente. Albernaz et al (2007) detectaram 0,91% de leucocitose, 10,05% de leucopenia e 89,04% sem alteração na leucometria global. Já Waddle; Littman (1988) não descreveram leucopenia como uma alteração característica da fase aguda, em sua pesquisa.

Tabela 1. Média, Desvio Padrão, Amplitude de variação dos valores hematológicos de 84 cães domésticos, naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e/ou *Anaplasma platys*.

Parâmetros avaliados	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Valores de Referência *
Hematimetria (x10 ⁶ /μL)	4,83	1,52	1,5	8	5,5 - 8,5
Hematócrito (%)	33,11	10,68	10	55	37 - 55
Hemoglobina (g/dL)	11,17	3,63	3,4	18	12 - 18
CHGM (g/dL)	33,61	1,38	28,57	36	31 - 36
VGM (fL)	68,57	4,7	55,88	77	60 - 77
Plaquetometria (x10 ³ /μL)	105,39	40,56	41	190	200 - 500
Proteínas plasmáticas (g/dL)	7,04	1,5	4	11,2	6,0-8,0
Leucócitos (x10 ³ /μL)	14,63	8,17	2,7	41,1	6 - 17
Eosinófilos (/μL)	464,87	704,26	0	3440	100 – 1250
Bastões (/μL)	72,13	200,64	0	1190	0 – 300
Segmentados (/μL)	9357,24	6866,76	405	35100	3000 – 11500
Linfócito (/μL)	2780,76	2209,14	0	9996	1000 – 4800
Monócitos (/μL)	1916,94	1270,21	238	6657	150 – 1350

*MEINKOTH; CLINKENBEARD (2000).

Tabela 2. Achados hematológicos em 84 cães domésticos, naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e/ou *Anaplasma platys*.

Parâmetros	Diminuído	Normal	Aumentado	Valores de
------------	-----------	--------	-----------	------------

avaliados	N	%	N	%	N	%	Referência *
Hematimetria (x10⁶/μL)	49	58,3	35	41,7	0	0	5,5 – 8,5
Hematócrito (%)	50	59,5	34	40,5	0	0	37 – 55
Hemoglobina (g/dL)	46	54,8	38	45,2	0	0	12 – 18
CHGM (g/dL)	5	6,0	79	94,0	0	0	32 – 36
VGM (fL)	1	1,2	83	98,8	0	0	60 – 77
Plaquetometria (x10³/μL)	84	100	0	0	0	0	200 – 500
Proteínas plasmáticas (g/dL)	15	17,9	50	59,5	19	22,6	6,0 – 8,0
Leucócitos (x10³/μL)	8	9,5	48	57,1	28	33,3	6,0 – 17,0
Eosinófilos (/μL)	33	39,3	42	50	9	10,7	100 – 1250
Bastões (/μL)	0	0	78	92,9	6	7,1	0 – 300
Segmentados (/μL)	4	4,8	57	67,9	23	27,4	3000 – 11500
Linfócitos (/μL)	19	22,6	50	59,5	15	17,9	1000 – 4800
Monócitos (/μL)	0	0	33	39,3	51	60,7	150 – 1350

*MEINKOTH; CLINKENBEARD (2000).

Na contagem diferencial de leucócitos (leucometria específica), foram verificados 27,4% de neutrofilia e 4,8% de neutropenia; 60,7% de monocitose; 17,9% linfocitose e 22,6% linfopenia.

No presente trabalho verificou-se 39,3% de eosinopenia, já Mendonça et al. (2005) verificaram uma freqüência de 64,22%, condizentes aos achados de Waddle; Littman (1988) em 63%, Troy; Forrester (1990) em 56%.

Foi evidenciado ainda 7,1% de desvio nuclear de neutrófilos para a esquerda (DNNE); Já Moreira et al. (2002) detectaram DNNE em 66,7% dos animais, diferindo dos 26% encontrados por Waddle; Littman (1988).

Em relação aos dados hematológicos dos cães parasitados (Tabela 3), anemia esteve presente em 59,52% dos 84 cães trombocitopênicos. Sendo 53,57% normocítica normocrômica, 4,76% normocítica hipocrômica e 1,19% microcítica hipocrômica. Os dados corroboram com a observação de Almosny et al. (2000) e Machado (2004), de que a anemia normocítica normocrômica é considerada uma alteração comum na erliquiose canina. Os quadros anêmicos observados na erliquiose canina tendem a ser arregenerativos, com diminuição da resposta medular diante dos estímulos eritropoiéticos (ALMOSNY et al., 2000; PAGANI et al., 2000),

Tabela 3. Frequência dos tipos morfológicos de anemia em 84 cães domésticos, naturalmente infectados por *Ehrlichia spp.* e/ou *Anaplasma platys*.

Tipo de anemia	N. de animais	Frequência (%)
Normocítica normocrômica	45	53,57
Normocítica hipocrômica	4	4,76
Microcítica normocrômica	0	0
Microcítica hipocrômica	1	1,19
Macrocitica hipocrômica	0	0
Total	50	59,52

5 CONCLUSÕES

Este estudo confirmou a ocorrência e importância das hemoparasitoses por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* na Região dos Lagos do Estado do Rio de Janeiro.

A frequência de erliquiose canina em esfregaços sanguíneos de cães trombocitopênicos da Região dos Lagos foi de 7,45%.

Embora não sejam específicas para o diagnóstico, a monocitose e a anemia

normocítica normocrômica foram os achados mais freqüentes nos casos confirmados pela microscopia.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; PERRET, C.; GUERRERO, J.; GODOY, P.; VELÇOZ, F.V.E.; LEÓN, U.; GUTJAHR, C.; AZÓCAR, T. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 9, p. 1392-1395, 2007.

ABEYGUNAWARDENA, I.; KAKOMA, I.; SMITH, R.D. Pathophysiology of canine ehrlichiosis. In (Ed.) Williams, J.c.; Kakoma, I. *Ehrlichiosis, a vector-bone disease of animals and humans*. Kluwer Academic Publishers, Boston, p. 78-92, 2001.

AGUIAR, D.M. 2006. Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil. *Tese de doutorado*. FMVZ. U.S.P. São Paulo - SP.

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.

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.

ALMOSNY, N.R.P. 1998. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. *Tese de Doutorado*. U.F.R.R.J. Itaguaí - RJ.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L.; SILVA, G.V.O.; RODRIGUES, L.M.; XAVIER, 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.

ALMOSNY, N.R.P; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais e como zoonose. In: ALMOSNY, N.R.P. *Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros Ltda., p. 14-56, 2002.

ALLSOPP, M.T.E.P.; ALLSOPP, B.A. Novel Ehrlichia Genotype detected in dogs in South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 11, p. 4204-4207, 2001.

ANDERSON, B.E.; DAWSON, J.E.; JONES, D.C. et al. *Ehrlichia chaffeensis* a new species associated with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, p.2838-2842, 1991.

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A; WEINSTEIN, S.; KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. *Vet. Rec.* v.138 p. 257-259, 1996.

BARGER, A.M. The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. *Veterinary Clinic of Small Animal*, v. 33, p. 1207-1222, 2003.

BARLOUGH JE, MADIGAN JE, KRAMER VL, et al. Ehrlichia phagocytophila genogroup Rickettsiae in Ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 2018-2021, 1997.

BARTSCH, R. C.; GREENE, R. T. Post-therapy Antibody Titers in Dogs with Ehrlichiosis: Follow-up study on 68 patients treated primarily with Tetracycline and/or Doxycycline. *Journal Veerinary Internal Medicine*, v. 10, p. 271-274, 1996.

BEAUFILS, J.P. Ehrlichiosis: clinical aspects in dogs and cats. *Compendium of Coninuum Educacional Practice Veerinary*, v. 19, p.57-61, 1997.

BÉLANGER, M.; SORENSON, H.L.; FRANCE, M.K.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F.; REITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of Ehrlichia canis infection in dogs. *Journal of Clinical Hematology*, v. 40, n. 9, p. 3560-3508, 2002.

BOTROS, B.A. M.; ELMOLLA, M. S.; SALIB, A.W .; CALARNAIO, C.A; DASCH, G.A.; ARTHUR, R.R. Canine ehrlichiosis in Egypt: Sero-epiderniological survey. *Onderspoort Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 41-43, 1995.

BREITSCHWERDT, E.B.; WOODY, B.J.; ZERBE, C.A; DE BUYSSCHER, E.V.; BARTA,

O. Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 1, p. 2-9, 1987.

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, p. 376-383, 1995.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.; 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.

BROUQUI, P.; DAVOUST, B.; HADDAD, S.; VIDOR, E.; RAOULT, D. Serological evaluation of *Ehrlichia canis* infections in military dogs in Africa and Reunion Island. *Veterinary Microbiology*, v. 26, 103-105, 1991.

BROUQUI, P.; DUMLER, J. S. The immune response to *Ehrlichia chaffeensis*. In (Ed.) Anderson, B.; Friedman, H.; Bendinelli, M. *Rickettsial Infection and Immunity*. Plenum Press. New York, p. 163-172, 1997.

BROUQUI, P.; RAOULT, D. Etude de la sensibilité d'*Ehrlichia canis* aux antibiotiques. In: *Proceedings of the Interdisciplinary Meeting of Antibiotherapy and Antimicrobial Chemotherapy*, Paris, 1991.

BUHLES, W. C. JR; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical Canine Pancytopenia: clinical, hematologic and serological responses of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy and challenge inoculation. *Journal of Infection Disease*, v.130, p. 357-367, 1974.

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.

BUORO, L B. J.; KANUI, T. L; ATWEL, R. B.; NTEGA, K. N.; GATHUMBI, P. K.

Polymyositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v. 31, p. 624-627, 1990.

BURGHEN, G.A.; BEISEL, W. R.; WALKER, J. S.; NIMS, R. M.; HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K. Development of hyperglobulinemia in tropical canine pancytopenia. *American Journal of Veterinay Research*, v. 32, n. 5, p. 749-756, 1971.

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.

CARRILLO, B. J.; RESENDE, H. E. B.; MASSARD, C. L. Erlichiose canina no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro. Anais. p.162, 1976.

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.

CHANG, W.L.; SU, W.L.; PAN, M.J. Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 59, n. 9, p. 849-851, 1997.

CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.589-595, 1994.

CODNER, E.C.; ROBERTS, R.E.; AINSWORTH, A.G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.186, p.166-169, 1985.

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

CODNER, E. C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G. K.; SMITH, C. A.; ROBERTSON, J. L.; MARTIN, R. A.; TROY, G. C. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, n. 12, p. 2286-2291, 1992.

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

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. *The Veterinary Clinical Small Animal Practice* v. 33, p. 863-884, 2003.

COLLINS, K B.; MOORE, C. P. Canine anterior uvea. In: (Ed.) GELATT, K N. *Veterinary ophthalmology*. Lea and Febiger, Philadelphia. p. 357-395, 1991.

COUTO, C.G. Doenças Rickettsiais In: BIRCHARD, SHERDING, *Manual Saunders: Clínica de pequenos animais*. Ed. Roca, p. 139-42, 1998.

COUTO, C.G. Anemia. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina Interna de pequenos animais*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.85, p.1119-1132, 2006.

COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; CLINKENBEARD, K D.; MEINKOTH, J.H. Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 192, p. 1093-1095, 1988.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. *Seminário de Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 191-201, jul./dez. 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.

DAVOUST, B.L. Erhlichiose canine. *Le point Vet*. v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DAVOUST, B.; KEUNDJIAN, A.; ROUS, V.; MAURIZI, L.; PARZY, D. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. *Veterinary Microbiology*, v. 107, p. 279-283, 2005.

DAWSON, J. E.; WARNER, C. K.; EWING, S. A. Fingerprinting of *Ehrlichia* species by repetitive element PCR. *American Journal of Tropical Medical Hygienist*, v. 57, p. 109-114, 1997.

DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S. Ehrlichial diseases of humans: Emerging Tick-born infections. *Clinical Infectious Disease*, v. 20, P. 1102-1110, 1995.

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*. *Internal Journal of Syst. Evol. Microbiology*, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *Journal of Small Animal Practice*, v.33, p.540-543, 1992.

EWING, S. A ; ROBERTSON, W. R.; BUCHNER, R. G.; HAYAT, E. S. 1971. A new strain of *Ehrlichia canis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 159, p. 1771-1774.

EWING, S.A. Canine Ehrlichiosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v.13, p.331-353, 1969.

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: comparasion between morphological and molecular tests. *Internal Journal appl. Research Veterinary Medicine*, v. 5, n. 3, p. 113-119, 2007.

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

1999.

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.

GLAUS, T.; JAGGY, A. Ehrlichiosis in dogs: literature review and case description. *Schweiz Arch Tierheilk*, v. 134, n. 7, p. 319-323, 1992.

GREIG, B.; BREITSCHWERDT, E.B.; ARMSTRONG, P.J. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and *Wolbachia* Infection. In: GREENE, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3 ed. Georgia: Saunders Elsevier,.. p. 203-230, 2006.

GREENE, R.T. Canine Erlichiosis: Clinical implications for humoral factors. In (Ed) BONAGURA, J.D. *Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1520 p., 1995.

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

GREENE, C. E.; BURGDORFER, W.; CAVAGNOLO, R. et al. Rocky mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.186, p. 465-472, 1985.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L. et al. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*, v.36, p.937-940, 1975.

HARRUS, S.; WANER, T.; WEISS, D. J.; KEYSARY, A.; BARK, H. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 51, p. 13-20, 1996a.

HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A.; ZWANG, E.; BARK, H. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Records*, v. 139, p. 290-293, 1996b.

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

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.; WANER, T.; AIZENBERG, L; BARK, H. Therapeutic Effect of Doxycycline in Experimental Subclinical Canine Monocytic Ehrlichiosis: Evaluation of a 6-Week Course. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 7, p. 2140-2142, 1998a.

HARRUS, S.; 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, 1998b.

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.

HIBBLER, C.O.S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs. Part II: Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Compendium of Continium Education*, v.8, p.106-113, 1986.

HILDERBRANDT, P.K.; HUXSOLL, D.L.; WALKER, J.S.; NIMS, R.M.; TAYLOR, R.; ANDREWS, M. Pathology of canine ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia). *American Journal of Veterinary Research*, v. 34, n. 10, p. 1309-1320, 1973.

HOSKINS, J.D., BARTA, O.; ROTHSCHMIT, T.J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.183, n. 9, p. 1011-1013, 1983.

HOSKINS, J.D. Ehrlichial Diseases of Dogs: Diagnosis and Treatment. *Canine Practice*. v.16, n.3, p.13- 21, 1991.

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, p. 211-216, 2005.

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; WALKER, J.S.. Tropical canine pancytopenia. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 157, p. 1627-1632, 1970.

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

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32 (7), p. 1658-1662, 1994.

IQBAL, Z; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. *Veterinary Microbiology*, v. 42, p. 281-287, 1994a.

IQBAL, Z; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 7, p. 1644-1649, 1994b.

JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 4 ed., Lea & Febiger, 121 p, 1986.

KAKOMA, I.; CARSON, C.A; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; STEPHENSON, E.H.; NYINDO, M.B. Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 38, n. 10, p. 1557-1559, 1977.

KAKOMA, I.; CARSON, C.A; RISTIC, M.; STEPHENSON, E.H.; HILDEBRANDT, P.K; HUXSOLL, D.L. Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. *Infection Immunology*, v. 20, p. 242-247, 1978.

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

KELLY, P.J.; CARTER, S.D.; BOBADE, P.A.; MATTHEWMAN, L.A.; BELL, S.C. Absence of antinuclear antibodies in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Records*, v. 134, p. 382, 1994.

KEYSARY, A.; WANER, T.; STRENGER, C.; HARRUS, S. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, n. 6, p. 521-523, 2001.

KUHEN, N.F.; GAUNT, S.D. Clinical and hematological findings in canine ehrlichiosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 186, p.355-358, 1985.

LABARTHE, N.; PEREIRA, M.C., BALBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C.A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. *Veterinary Therapy*, v.4, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, n. 30, p. 24-32, 2001.

LAPPIN, M.R., Doenças riquetsianas polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina Interna de pequenos animais*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.101, p.1227-1247, 2006.

LOCKWOOD, C.M. Immunological functions of the spleen. *Clinical Haematology*, v. 12, p. 449-465, 1983.

LOSOS, G.J. Ehrlichiosis. In (Ed) LOSOS, G.J. *Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals*. Longman Scientific Technical, Canada. p. 796-816, 1986.

LOVERING, S.L.; PIERCE, K.R.; ADAMS, L.G. Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 41, n. 8, p. 1266-1271, 1980.

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*, v.34, n.1, p. 44-8, 2005.

MAGNARELLI, L. A.; LITWIN, H. J.; HOLLAND, C. J.; ANDERSON, J. F.; RISTIC, M. Canine ehrlichiosis in Connecticut. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 2, p. 366-7, 1990.

MAGNARELLI, L A; DUMLER, J. S. Ehrlichiosis: Emerging Infectious Diseases in Tick Infested Areas *Clin. Microbiology Newsletter*, v. 18, n. 11, p. 81-88, 1996.

MASON, R. J.; LEE, J. M.; CURRAN, J. M.; MOSS, A; VAN DER HEIDE, B.; DANIELS, P.W. Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from -the major population centres of northern Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 79, n. 8, p. 559-562, 2001.

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

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.

MCBRIDE, J.W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; BOUDREAUX, C.; GUEDRY, T.;

WALKER, D. H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infection Immunology*, v. 71, p. 2516-2524, 2003.

McDADE, J.E. Ehrlichiosis – a disease of Animals and Humans. *Journal of Infectious Disease*, v.161, p.609-617, 1990.

MEINKOTH, J.H.; HOOVER, J.P.; COWELL, R.L. et al. Ehrlichiosis in a dog with seizures and non-regenerative anemia. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.195, 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, 787 p. 2000.

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.

MESSICK, J.B.; RIKIHISA, Y. Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization and proliferation in host cells by flow cytometry. *Infection Immunology*, v. 61, p. 3803-3810, 1993.

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.

MUNHÓZ, A.L.F.; BABO, V.J. Estudo retrospectivo das características da erliquiose canina. *A Hora Veterinária*, v. 106, p. 39-43, 1998.

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.

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

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

MYLONAKIS, M.E.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; LAZARIDIS, V.; LEONTIDES, L.S.; KOSTOULAS, P.; KOUTINAS, A.F. A retrospective study of 61 cases of spontaneous canine epistaxis (1998 to 2001). *Journal of Small Animal Practice*, Paper, p. 1-6, 2007.

NEER, T.M., BREITSCHWERDT, E.B., GREEN, 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*, v. 16, p. 309–315, 2002.

NYINDO, M.B.A; RISTIC, M; HUXSOLL, DL.; SMITH, A.R. Tropical canine pancytopenia: In vitro cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. *American journal of Veterinary Research*, v.32, n.11, p.1651-1658, 1971.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J.L.; CARSON, C.A.; STEPHENSON, E.H. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 41, n. 2, p. 250-254, 1980.

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.

PARZY, D.; DAVOUST, B.; RAPHENON, G.; VIDOR, E. L' ehrlichiose canine au Senegal:

enquête seroépidémiologique humaine et canine a Dakar. *Medecine Tropicale*, v. 51, n. 1, p. 5963, 1991.

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

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

PRICE, J.E.; DOLAN, T.T.A. comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. *Veterinary Records*, v. 107, p. 275-277, 1980.

PRICE, J.E.; SAYER, P.D. Canine ehrlichiosis. In (Ed) KIRK, R.W. *Current Veterinary Therapy VIII*. W. B. Saunders Co. Philadelphia. pp. 1197-1202, 1983.

PUSTERLA, N.; PUSTERLA, J.B.; DEPLAZES, P.; WOLFENBERGER, C.; MULLER, W.; HORAUF, A ; REUSCH, C.; LUTZ, H. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of Canine Granulocytic Ehrlichia Infection in Dogs in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n.12, p. 3460-3462, 1998.

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.

PIERCE, K.R.; MARRS, G.E.; HIGHTOWER, D. Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. *American Journal Veterinary Research*, Schaumburg, v. 38, n. 11, p. 1821-1825, 1977.

REARDON, M.J.; PIERCE, K.R. Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs.

Veterinary Pathology, v. 18, p. 384-395, 1981a.

REARDON, M.J.; PIERCE, R.K. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Veterinary Pathology*, v.18, p.348-361. 1981b.

RIKIHISA, Y.; JOHNSON, G.J.; BURGER, C.J. Reduced immune responsiveness and lymphoid depletion in mice infected with *Ehrlichia risticii*. *Infection Immunology*, v. 55, p. 2215-2222, 1987.

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

RISTIC, M; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M; HILDEBRANDT, P.K.; NYINDO, M.B.A. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infection Immunology*, v. 6, p. 226-231, 1972.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Ehrlichiae. In (ed) KREIG, N.R.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Baltimore p. 704-709. 1984.

RISTIC, M.; HOLLAND, C.J. Canine Ehrlichiosis. In (Ed) Woldehiwet, Z; Ristic, M. *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Pergamon Press. New York. pp. 169-186, 1993.

RUSSELL, K.; GRINDEM, C. Secondary thrombocytopenia. In: FELDMAN BF, ZINKL JG, JAIN NC, editors. *Schalm's veterinary hematology*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 487-95, 2000.

SÁINZ, A.; TESOURO, M.A; RODRIGUEZ, F.; MAYORAL, L; MAZZUCHELLI, F. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infections in police dogs in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 23, p. 179-182, 1995.

SÁINZ, A.; DELGADO, S.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M.A.; CÁRMENES, P. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Léon (north-west Spain). *Preventive Veterinary Medicine*, v. 29, p. 1-7, 1996.

SHAW, D.; RUBINS, S. Pharmacologic activity of doxycycline. *Journal of American Veterinary Medicine*, v. 189, p. 808–809, 1986.

SMITH, R.D.; HOOKS, J.E.; HUXSOLL, D.L; RISTIC, M. Canine ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia): survival of phosphorus-32-labeled blood platelets in normal and infected dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 35, n. 2, p. 269-273, 1974.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. *American Journal of Veterinary Research*, v. 37, n. 2, p. 71-72, 1975.

SOUZA, M.G.; HIGA, A.C.; GERARDI, D.G.; TINUCCI-COSTA, M.; MACHADO, R.Z. Tratamento da erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. Lages, v. 3, n. 2, p. 126-130, 2004.

STEPHENSON, E.H.; OSTERMAN, J.V. Canine peritoneal macrophages: cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 38, n. 11, p. 1851-1859, 1977.

STILES, J. Canine rickettsial infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, St. Louis, v. 30, n.5, p.1135-1150, 2000.

STOCKHAM, S.L.; SCHMIDT, D.A.; TYLER, J.W. Canine granulocytic ehrlichiosis in dogs from Central Missouri: a possible cause of polyarthrits. *Veterinary Medical Rev.*, v. 6, p.3-5, 1985.

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.

THRIUNAVUKKARASU, P.S.; NAMBI, AP.; RAJAN, T.S.S.; GNANAPRAKSAM, V. Clinical and hematological findings in canine ehrlichiosis in Madras city. *Indian Veterinary Journal*, v. 71, n. 8, p. 825-828, 1994.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O; FREIRE, R.L.; DE 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, cap.37, p. 404-417, 1990.

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, p. 615-620, 1988.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D.J.; BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 48, p. 177-182, 1995.

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

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

WANER, T.; STRENGER, C.; KEYSARY, A.; HARRUS, S. Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in

experimental *E. canis* infection in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 66, p. 237-243, 1998.

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

WEISIGER, R.M.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *American Journal of Veterinary Research*, v. 36, n. 5, p. 689-694, 1975.

WEISS, E.; DASCH, G.A. The Family Rickettsiaceae: pathogens of domestic animals and invertebrates; nonpathogenic arthropod symbiotes. In (Ed.) STARR, M.P. *The Prokaryotes*. Springer-Verlag. Berlin, p. 2161-2171, 1981.

WILDER, A.G. Prophylactic use of tetracycline for tropical canine pancytopenia. *Veterinary Records*, v. 101, p.15, 1977.

WINSLOW, G.M.; YAGER, E.; SHILO, K.; VOLK, E.; REILLY, A.; CHU, F.K. Antibody mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. *Infectious Immunology*, v. 68, p. 2187-2195, 2000.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial disease of dogs. In: HOSKINS, J.D. *Veterinary clinics of North America*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p. 75-98, 1991.

WOODY, B.J.; MCDONALD, R.K. Canine ehrlichiosis. *Mississippi Veterinary Journal*, p. 2-5, 1985.