

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Avaliação clínica, morfológica, hematológica,  
bioquímica e biomolecular de cães naturalmente  
infectados por *Ehrlichia canis* e  
*Anaplasma platys***

**Valéria Régia Franco Sousa**

**2006**



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

**Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys***

**VALÉRIA RÉGIA FRANCO SOUSA**

*Sob a Orientação da Professora Ph.D.  
Teresa Cristina Bergamo do Bomfim*

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2006

636.7089696

S725a

T

Sousa, Valéria Régia Franco, 1976-  
Avaliação clínica, morfológica,  
hematológica, bioquímica e biomolecular  
de cães naturalmente infectados por  
*Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*/  
Valéria Régia Franco Sousa. - 2006.  
46 f. : il.

Orientador: Teresa Cristina Bergamo  
do Bomfim.

Tese(doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 40-47.

1. Cão - Parasito - Teses. 2. Cão -  
Infecções - Teses. 3. Ehrlichia - Teses.  
4. Anaplasma - Teses. 5. Ehrlichiose -  
Teses. 6. Anaplasmosse - Teses. 7.  
Hematologia veterinária - Teses. I.  
Bomfim, Teresa Cristina Bergamo do. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Instituto de Veterinária. III.  
Título.

Bibliotecário: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar o privilégio de adquirir um pouco mais de conhecimento.

Agradeço a minha família, aos meus pais por me incentivar a seguir estudando, aos meus irmãos pela torcida, ao meu marido pela companhia e ao meu filho pelo carinho e amor.

Agradeço à Professora Teresa Cristina Bergamo do Bomfim, pela paciência e carinho com que me orientou.

Agradeço à Médica Veterinária Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida, pela ajuda no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao Professor Luciano Antunes Barros, pela tranquilidade repassada por orientações prudentes.

Agradeço a todos do Hospital Veterinário da UFMT, em especial as técnicas Rosana Ribeiro dos Santos e Cibele Nunes Vieira, que contribuíram em muito para que esse projeto se consolidasse.

Agradeço a Professora Kátia Gouveia Sales e ao Mestrando Christiano Henrique Justino da Silva, pela ajuda nas análises clínicas e parasitológicas.

Agradeço aos meus alunos, principalmente a Luciana Dalcin.

Agradeço à Professora Rosângela Zacarias Machado pelo auxílio no desenvolvimento das provas moleculares.

Agradeço aos Professores Sávio Amado da Silva e Luciano Nakazato, por me auxiliarem na compreensão da estatística e das provas moleculares.

Agradeço aos meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram na conquista deste sonho.

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa de Mato Grosso, pelo financiamento deste projeto.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Histórico – <i>Ehrlichia canis</i> (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935) MOSHKOVSHI, 1945.....	3
2.2. Taxonomia – <i>Anaplasmataceae</i> .....	3
2.3. Aspectos biológicos da <i>E. canis</i> .....	4
2.4. Patogenia da <i>E. canis</i> .....	5
2.5. Ehrlichiose monocítica canina.....	6
2.5.1. Fase aguda da ehrlichiose monocítica canina.....	6
2.5.2. Fase subclínica da ehrlichiose monocítica canina.....	7
2.5.3. Fase crônica da ehrlichiose monocítica canina.....	8
2.6. Trombocitopenia cíclica canina.....	9
2.7. Diagnóstico de ehrlichiose monocítica canina e trombocitopenia cíclica canina.....	10
2.7.1. Diagnóstico citológico.....	10
2.7.2. Isolamento em cultivo celular.....	11
2.7.3. Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	11
2.7.4. Diagnóstico sorológico.....	12
2.7.4.1. Imunofluorescência indireta.....	12
2.7.4.2. Imunoensaio enzimático.....	12
2.7.4.3. Western immunoblotting.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 - Período e Local de Trabalho.....	14
3.2. Seleção dos Animais.....	14

3.3. Procedimento da Coleta e Identificação dos Carrapatos.....	14
3.4. Procedimento da Coleta de Sangue e Preservação das Amostras.....	14
3.5. Análises Clínicas.....	15
3.6. Análise do Esfregaço Sangüíneo.....	15
3.7. Amostras utilizadas na PCR.....	15
3.8. Extração de Material Genômico (DNA).....	16
3.9. Reação em Cadeia pela Polimerase.....	16
3.9.1. Oligonucleotídeos Iniciadores (Primers).....	16
3.9.2. Amplificação de <i>Ehrlichia canis</i> .....	16
3.9.3. Amplificação de <i>Anaplasma platys</i> .....	17
3.9.4. Análise dos produtos amplificados.....	17
3.10. Análise Estatística.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 – Características Demográficas.....	18
4.1.1 Associação entre idade e sexo dos cães e o parasitismo por <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> .....	18
4.1.2 Associação entre o local de residência dos cães, a presença de carrapatos, a raça e o parasitismo por <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> .....	20
4.2 - Aspectos Clínicos da infecção por <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> .....	21
4.3 – Achados Hematológicos.....	24
4.3.1 – Alterações eritrocitárias.....	24
4.3.2 – Alterações leucocitárias e das plaquetas.....	24
4.4 – Achados Bioquímicos.....	28
4.4.1 - Proteínas Séricas.....	28
4.4.2 – Uréia e Creatinina.....	28
4.4.3 – Enzimas Séricas.....	29

4.4.4 – Glicose.....	31
4.4.5 – Bilirrubinas.....	31
4.5 – Diagnóstico Laboratorial.....	32
4.5.1 – Análise do Esfregaço Sangüíneo.....	32
4.5.2 – Reação em Cadeia de Polimerase.....	35
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7. ANEXO.....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> por faixa etária dos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	19
<b>Tabela 02.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> por sexo dos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	19
<b>Tabela 03.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> por tipo de moradia dos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	20
<b>Tabela 04:</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e a presença de carrapatos nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	21
<b>Tabela 05.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e dos principais sinais clínicos nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	22
<b>Tabela 06.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e das principais alterações eritrocitárias nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	25
<b>Tabela 07.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e das principais alterações leucocitárias nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	26
<b>Tabela 08.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e das principais alterações plaquetárias nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	27
<b>Tabela 09.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e das alterações na concentração das proteínas séricas nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	29
<b>Tabela 10.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e das alterações dos níveis séricos de uréia e creatinina nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	30
<b>Tabela 11.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e da elevação da atividade sérica das enzimas hepáticas nos cães	



atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	30
<b>Tabela 12.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e dos níveis de glicemia nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	31
<b>Tabela 13.</b> Frequência do parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> e dos níveis de bilirrubinemia nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.....	32
<b>Tabela 14.</b> Comparação das técnicas dos esfregaços sangüíneos confeccionados de sangue circulante, capa leucocitária e sangue periférico no diagnóstico da infecção por <i>E. canis</i> .....	34
<b>Tabela 15.</b> Comparação das técnicas dos esfregaços sangüíneos confeccionados de sangue circulante, capa leucocitária e sangue periférico no diagnóstico da infecção por <i>A. platys</i> .....	34

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Cão infectado por *Ehrlichia canis*, confirmado pela observação de formas evolutivas em esfregaço sangüíneo corado, apresentando apatia e epistaxe unilateral (A) epistaxe com intensa hemorragia após agitação do animal (B)..... 23
- Figura 02.** Cadela infectada por *Ehrlichia canis*, confirmado pela observação de formas evolutivas em esfregaço sangüíneo corado, apresentando palidez e petéquias na mucosa oral (A) e vaginal (B)..... 23
- Figura 03.** Diagnóstico de *Ehrlichia canis* em monócitos de cães utilizando a técnica de esfregaço sangüíneo corado. Observa-se presença de mórula com vacúolo bem evidente (A) e mórula sem a evidência de vacúolo (B) (obj. 100 X)..... 33
- Figura 04.** Diagnóstico de *Anaplasma platys* em plaquetas de cães utilizando a técnica de esfregaço sangüíneo corado, observa-se grandes plaquetas com inclusões basofílicas (A e B) (obj. 100 X)..... 33
- Figura 05.** PCR de *Ehrlichia canis* com primers ECC/ECB (produto +/- 478 pb) de cães atendidos no HOVET – UFMT; linha 1 - marcador de tamanho molecular (100 pb), linha 2 - controle positivo, linhas 3 a 13 - amostras testadas e linha 14 - controle negativo..... 36
- Figura 06.** *Nested* PCR de *Ehrlichia canis* com primers ECA/He3 (produto +/- 358 pb) de cães atendidos no HOVET – UFMT, linha 1 - marcador de tamanho molecular (100 pb), linha 2 - controle positivo, linhas 3 a 14 - amostras testadas e linha 15 - controle negativo..... 36
- Figura 07.** *Nested* PCR de *Anaplasma platys* com primers Platys-F/Platys-R (produto 504 pb) de cães atendidos no HOVET – UFMT, linha 1 - marcador de tamanho molecular (100 pb), linha 3 - controle positivo, linhas 4 a 15 - amostras testadas e linha 2 - controle negativo..... 37

## RESUMO

SOUSA, Valéria Régia Franco **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys***. Seropédica: UFRRJ, 2006. 46p. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias).

Este trabalho teve por objetivo investigar a infecção por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* nos cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, através das técnicas de esfregaço sangüíneo e de PCR, analisando os achados clínicos e laboratoriais. Durante o período de maio de 2004 a julho de 2005 foram examinados 195 cães com sinais clínicos sugestivos de erliquiose ou com contactantes com a infecção. A trombocitopenia canina cíclica, causada pelo *A. platys*, provoca diminuição das plaquetas a cada 14 dias, sem provocar sinais severos, mas quando associada à infecção por *E. canis* a gravidade clínica aumenta. Nos treze cães atendidos com PCR positiva para *E. canis* foi possível verificar a diversidade de sinais, com predominância estatisticamente significativa dos distúrbios hemorrágicos. Já nos 195 cães testados pela técnica de esfregaço sangüíneo não houve predomínio de nenhum sinal clínico. Os achados hematológicos também foram inespecíficos, ocorrendo tanto anemia, leucopenia e trombocitopenia, quanto normalidade ou aumento das células. As alterações observadas na análise bioquímica não foram exclusivas dos grupos com infecção. Nestes grupos ocorreu aumento das proteínas plasmáticas, com hiperglobulinemia, sem, no entanto haver diferença significativa, apesar deste achado ser freqüente na erliquiose. A partir da análise da PCR confirmou-se que a infecção por *E. canis* e *A. platys* ocorre nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, devendo ser tomadas medidas preventivas, principalmente no controle do vetor, já que todos os carrapatos encontrados nos cães examinados foram da espécie *Rhipicephalus sanguineus*.

**Palavras chave:** cães, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*

## ABSTRACT

SOUSA, Valéria Régia Franco **Clinical, morphologic, hematological, biochemist and biomolecular evaluation of naturally infects dogs for *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys***. Seropédica: UFRRJ, 2006. 46p. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias).

This work had for objective to investigate the infection for *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in the dogs taken care of in the Veterinarian Hospital of the Universidade Federal de Mato Grosso, through the examination of blood smears and of the PCR, analyzing the clinical and laboratories findings. During the period of May of 2004 the July of 2005, 195 dogs with suggestive clinical signs of ehrlichiosis or had contact with the infection had been examined. The canine cyclic thrombocytopenia, caused for the *A. platys*, provokes reduction of platelets to each 14 days, without provoking severe signs, but when associated to the infection for *E. canis* the clinical gravity it increases. In the thirteen dogs taken care of with positive PCR for *E. canis* diagnosed by the PCR it was possible to verify the diversity of signals, with statistical significant predominance of the hemorrhagic riots. Already in the 195 dogs tested for the examination of blood smears it did not have predominance of no clinical signs. The hematologic findings had also been nonspecific, occurring in such a way anemia, leukopenia and thrombocytopenia, how much normality or increase of the cells. The alterations observed in the analysis biochemist had not been exclusive of the groups with infection. In these groups increase of plasma proteins occurred, with hyperglobulinaemia, without, however to have significant difference, despite this finding being frequent in ehrlichiosis. From the analysis of the PCR it was confirmed that the infection for *E. canis* and *A. platys* occur in the dogs taken care of in the Veterinarian Hospital of the UFMT, having to be taken writ of prevention, mainly in the control of the vector, since all the ticks found in the examined dogs had been of species *Rhipicephalus sanguineus*.

**Key words:** dogs, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*

## 1. INTRODUÇÃO

Ehrlichiose é uma doença causada por bactérias intracelulares obrigatórias, que infectam os animais e o homem. Atualmente apresenta uma distribuição cosmopolita e tem como agente transmissor carrapatos.

Várias espécies de *Ehrlichia* podem infectar os cães, incluindo a *E. canis*, agente da ehrlichiose monocítica canina; *E. chaffeensis*, agente da ehrlichiose monocítica humana e *E. ewingii*, agente da ehrlichiose granulocítica canina. Ainda há a *E. platys*, agente da trombocitopenia cíclica canina, que de acordo com a nova classificação taxonômica proposta a partir de análises de gens do RNA ribossomal 16S, foi transferida para o gênero *Anaplasma*, sendo designada *A. platys* (DUMLER et al., 2001)

*Ehrlichia canis*, agente da ehrlichiose monocítica canina, foi primeiramente identificada na Argélia em 1935, que na guerra do Vietnã tornou-se mais relevante por provocar morte de cães militares americanos, desde então tem sido reportada em várias partes do mundo, particularmente em regiões tropicais e subtropicais.

No Brasil, a primeira descrição de *E. canis* foi feita em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais e em seguida foi descrita em cães militares no Estado do Rio de Janeiro. Atualmente, há relatos da doença em vários estados brasileiros.

A ehrlichiose canina pode se apresentar com três fases: aguda, subclínica e crônica. Os sinais aparecem após um período de incubação de oito a vinte dias. Na fase aguda podem se observar sinais clínicos como febre, depressão, dispnéia, anorexia, linfadenopatia e leve perda de peso, juntamente com achados laboratoriais de trombocitopenia, leucopenia, anemia leve e hipergamaglobulinemia que duram de duas a quatro semanas. A fase subclínica está associada com a persistência da infecção por *E. canis* podendo permanecer os achados laboratoriais de trombocitopenia, leucopenia e anemia. Já a fase crônica é caracterizada por hemorragias, epistaxe, edema periférico, emaciação, choque hipovolêmico e morte. Nesta fase, a maioria dos cães apresenta um prognóstico desfavorável decorrente das complicações da doença e das infecções secundárias.

*Ehrlichia canis* é transmitida pelo carrapato vermelho do cão, o *Rhipicephalus sanguineus* durante as fases de ninfa e adulto. Os cães ainda podem ser infectados através de transfusão sangüínea.

Por muitos anos o diagnóstico da infecção por *E. canis* baseou-se nos sinais clínicos, mas com limitações, pois os sinais são semelhantes a infecções por vários outros patógenos, gerando muitos falsos positivos. Já, a observação do esfregaço sangüíneo desses animais resulta em falsos negativos, sendo uma técnica diagnóstica mais eficiente na fase aguda da doença. As provas sorológicas têm sido utilizadas, mas há problemas devido a cepas diferentes e reação cruzada com outras espécies, como a *E. chaffeensis*. A reação em cadeia de polimerase é uma técnica auxiliar para o diagnóstico específico de ehrlichiose. A limitação da reação em cadeia de polimerase é econômica, pois são necessários laboratórios com equipamentos caros.

A doença causada pela *A. platys* foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos da América, como agente da trombocitopenia cíclica canina. Suspeitava-se que a transmissão fosse pelo *R. sanguineus*, mas os estudos de transmissão com possíveis vetores artrópodes não tiveram êxito, permanecendo desconhecido o seu vetor.

A infecção por *A. platys* caracteriza-se por uma parasitemia nas plaquetas e linfadenopatia generalizada. Ocorre trombocitopenia cíclica há cada uma a duas semanas. O retorno às taxas normais de plaquetas ocorre em três a quatro semanas. Raramente os cães apresentam sinais graves de hemorragia, exceto quando há trombocitopenia severa, mas na maioria dos casos, permanecem assintomáticos. Na fase aguda da trombocitopenia cíclica há parasitemia das plaquetas, com sinais de linfadenopatia e trombocitopenia. No estágio crônico da doença, a natureza cíclica de parasitismo das plaquetas diminui, resultando em trombocitopenia cíclica associada com esporádicas ocorrências de parasitemia.

Como os sinais associados com a trombocitopenia cíclica canina não são específicos, o diagnóstico da infecção por *A. platys* necessita de exames complementares, como esfregaço sangüíneo, ensaio de imunofluorescência e reação em cadeia de polimerase. A detecção de mórulas em plaquetas através do esfregaço sangüíneo leva mais tempo para aparecer e muitas vezes resultam em falsos negativos pela característica cíclica do aparecimento de plaquetas parasitadas. O ensaio de imunofluorescência parece ser bem específico, já que há mínima reação cruzada sorológica entre *A. platys* e as diferentes espécies de *Ehrlichia* que infectam cães, porém pela dificuldade em se fazer o cultivo e a obtenção de lâminas sensibilizadas limita a utilização dessa técnica. A reação em cadeia de polimerase é útil na detecção de *A. platys* no estágio inicial da trombocitopenia cíclica assim como na fase crônica da doença.

A observação clínica de muitos cães do município de Cuiabá, Estado do Mato Grosso, apresentando ehrlichiose e trombocitopenia cíclica com severidade bastante variável e dos recentes relatos de associação de *E. canis* e *A. platys* induzindo a sinais clínicos graves, direcionou o desenvolvimento deste estudo.

Este trabalho teve por objetivo investigar e confirmar a infecção natural por *E. canis* e *A. platys* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso, através do diagnóstico clínico e laboratorial.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico – *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935) MOSHKOVSHI, 1945

O primeiro relato de ehrlichiose é datado de 1935, no Instituto Pasteur na Argélia por Donatien e Lestoquard. Eles observaram no esfregaço sanguíneo de cães, febris e anêmicos, infestados por *Rhipicephalus sanguineus*, a presença de pequenos organismos semelhantes à rickettsia no interior de monócitos, nomeando-os *Rickettsia canis*. Posteriormente, no ano de 1945, Moshkovshi renomeou para *Ehrlichia canis*, em homenagem ao famoso bacteriologista alemão, Paul Ehrlich. No entanto, na Guerra do Vietnã ganhou mais destaque por induzir a morte em cães militares americanos (McDADE, 1990).

No Brasil, a primeira descrição da doença causada por *E.canis* foi feita em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais por Costa et al. (1973). Logo depois foi descrita por Carrillo et al. (1976), em cães militares do Estado do Rio de Janeiro. Hoje a ehrlichiose, está disseminada em vários estados brasileiros.

### 2.2. Taxonomia – *Anaplasmataceae*

A classificação taxonômica dos parasitos baseava-se apenas nas características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas e clínicas. Atualmente, com as dificuldades para um diagnóstico específico, baseado em parâmetros fenotípicos e o desconhecimento de muitos fatores biológicos de diferentes grupos de parasitos, vários trabalhos têm sido conduzidos com o emprego de técnicas moleculares e análises filogenéticas para o diagnóstico e classificação e/ou reclassificação de diferentes grupos.

Em 2001, a taxonomia do grupo das ehrlichias foi modificada e as espécies de *Ehrlichia*, anteriormente classificadas como pertencentes à Tribo *Ehrlichiae* e a Família *Rickettsiaceae*, assim como os gêneros *Anaplasma* e *Neorickettsia* foram reclassificados para a família *Anaplasmataceae* (DUMLER et al., 2001).

Os membros do gênero *Ehrlichia* são pequenos organismos cocóides ou elipsoidais, frequentemente pleomórficos, gram-negativos, que parasitam principalmente monócitos, macrófagos e neutrófilos de hospedeiros mamíferos. Pela ultra-estrutura, dois tipos morfológicos são observados, incluindo grandes células reticulares e pequenas formas com protoplasma condensado.

Várias espécies do gênero podem infectar clinicamente os canídeos, enquanto que estes servem como reservatório de *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* para o homem (VARELA, 2003).

Atualmente, baseado principalmente em semelhanças genotípicas e em análises filogenéticas, *E. canis* tem sido classificada em um grupo juntamente com as

espécies *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (*Cowdria ruminantium*) (DUMLER et al., 2001).

Dumler et al. (2001) baseado em semelhanças e em análises filogenéticas propõem no mesmo artigo, que a *N. helminthoeca* antigênica e geneticamente semelhante às espécies do gênero *Ehrlichia* seja classificada em um grupo juntamente com as espécies *N. risticii* (*E. risticii*), agente da Febre Equina do Potomac, *N. sennetsu* (*E. sennetsu*), agente causador da Febre Sennetsu em humanos no Japão e uma *Ehrlichia-símile* presente em metacercária do trematódeo *Stellantchasmus falcatus*.

Um terceiro grupo foi proposto com base nas mesmas características citadas anteriormente, sendo englobadas as espécies *Anaplasma bovis* (*E. bovis*), *A. platys* (*E. platys*), *A. phagocytophilum* (*E. phagocytophila* e *E. equi*) e *A. marginale* (DUMLER et al. 2001).

As espécies de *Ehrlichia* por muito tempo foram diferenciadas pelo tipo de célula parasitada, pela distribuição geográfica e pela severidade da doença (SMITH et al., 1976). As novas propostas de classificação para esse grupo têm sido realizadas de forma polifásica, envolvendo características morfométricas das formas parasitárias, características biológicas, sendo observada a especificidade pelo hospedeiro, local de parasitismo, patogenicidade, períodos pré-patente e patente, formas de transmissão e, características genéticas, sendo avaliadas as diferenças nucleotídicas nas seqüências de genes bem característicos, como genes codificantes para RNA ribossomal e proteínas estruturais e funcionais (DUMLER et al., 2001).

É importante que as propostas de classificação, reclassificação ou ambas sejam realizadas com base em todas estas características citadas, pois simples adaptações morfológicas, biológicas e/ou moleculares de uma determinada espécie, quando avaliada isoladamente, podem induzir em descrição errônea de uma nova espécie.

A classificação taxonômica dos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia* ainda está sendo amplamente discutida pela comunidade científica.

### 2.3. Aspectos biológicos da *E. canis*

Os vetores conhecidos são carrapatos, nos quais as formas parasitárias multiplicam-se assexuadamente. Algumas espécies de *Ehrlichia* são cultivadas em linhagens de monócitos e/ou macrófagos, de células endoteliais de carrapatos.

*Ehrlichia canis* pode ser transmitida pela ninfa e adulto do carrapato vermelho do cão (*R. sanguineus*). Nos carrapatos infectados, *E. canis* multiplica-se nos hemócitos e células da glândula salivar, eventualmente entram no trato digestivo e se desenvolvem no epitélio do intestino médio. Os carrapatos transmitem a doença transtendialmente, mas não por via transovariana. A forma adulta infectada com *E. canis* pode continuar transmitindo o patógeno por até 155 dias após ter abandonado o cão. No momento do repasto sangüíneo, o carrapato inocula secreção da glândula salivar com *E. canis* (RIKIHISA, 1991).

Nyindo et al. (1971) observaram que *E. canis* apresenta três estádios de desenvolvimento: corpúsculos elementares, corpúsculos iniciais e mórulas.

Os corpúsculos elementares, formas individuais de *Ehrlichia*, entram nos monócitos por fagocitose. Medem cerca de 0,5 µm de diâmetro, tornando difícil a visualização à microscopia óptica. Crescem e se dividem dentro do fagossomo por



fissão binária, entretanto não há fusão fago lisossomal nas células hospedeiras infectadas. Em três a cinco dias após a infecção é observado um pequeno número de estruturas compactas, medindo de 1,0 a 2,5 µm de diâmetro, chamados de corpúsculos iniciais. Durante os próximos nove a doze dias ocorrem crescimento e replicação, originando as mórulas. As células infectadas geralmente contêm muitas mórulas, que se rompem liberando os corpúsculos elementares que irão infectar novas células, repetindo o ciclo (McDADE, 1990).

A atividade metabólica de espécies de *Ehrlichia* tem sido investigada. Os membros deste gênero parecem efetuar catabolismo aeróbico e assacarolítico, isto é, não utilizam glicose-6-fosfato ou glicose para produção de ATP. As espécies do gênero *Ehrlichia* utilizam aminoácidos, como a glutamina ou o glutamato como fonte de energia, porém preferem a glutamina por penetrar melhor no fagossomo que o glutamato (RIKIHISA, 1991).

#### **2.4. Patogenia da *E. canis***

O período de incubação das Ehrlichiose é de aproximadamente uma a três semanas, e em geral cursa com febre, depressão e anorexia. A doença ocorre quando há grande número de organismos. Quando há poucas células infectadas com *Ehrlichia* os mecanismos de defesa do hospedeiro conseguem debelar a infecção, não ocorrendo os sinais clínicos. A entrada de *Ehrlichia* dentro de uma nova célula hospedeira, não precisa ser precedida por lise de outra célula infectada, mas pode ocorrer à saída de organismos da célula por exocitose através da fusão da membrana do vacúolo com a membrana plasmática, e entrada na nova célula hospedeira por endocitose (RIKIHISA, 1991).

As espécies de *Ehrlichia*, em geral, não induzem a uma severa reação inflamatória nos tecidos. Os organismos ehrlichiais inibem a união do lisossomo com o vacúolo nos macrófagos e impedem a ativação dos mesmos, não induzindo a liberação de mediadores químicos, como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral. No entanto, os macrófagos podem ser ativados por estímulos exógenos, como aumento do nível intracelular de íons cálcio, interferon gama e concanavalina A (RIKIHISA, 1991).

Cada espécie de *Ehrlichia* parece ter um tropismo por determinados tecidos onde causará a doença (RIKIHISA, 1991). Os organismos invadem tecidos especialmente ricos em células mononucleares, como os linfonodos e baço (VARELA, 2003). As células infectadas com *E. canis* são comumente achadas na microvasculatura dos pulmões, rins e meninges dos cães (RIKIHISA, 1991).

Freqüentemente ocorre linfadenopatia afolicular na infecção por *Ehrlichia*. O desaparecimento de folículos, depleção de pequenos linfócitos e histiocitose em linfonodos locais são características comuns da infecção por *E. canis*. Enquanto que na infecção por *A. platys* os folículos permanecem ativos nos linfonodos. A plasmocitose em diversos órgãos é um achado da infecção por *E. canis* (RIKIHISA, 1991).

Os achados hematológicos na infecção por *Ehrlichia* são bem evidentes. Pode ocorrer leucopenia ou leucocitose de acordo com evolução clínica. A trombocitopenia ocorre tanto na infecção por *E. canis* quanto por *A. platys* e pode ser imunomediada (RIKIHISA, 1991; HARRUS et al., 1996; BULLA et al., 2004 b). A infecção por *E. canis* produz aumento das atividades séricas da alanina e aspartato

aminotransferase e fosfatase alcalina, sugerindo necrose hepato-celular (ALMOSNY, 1998) e hipergamaglobulinemia (RIKIHISA, 1992; FELEK et al., 2003).

## 2.5. Ehrlichiose monocítica canina

Existem três cepas de *E. canis*, estas foram isoladas e caracterizadas geneticamente como: “Flórida” (M73226), “Oklahoma” (M73221) e “Israelí” (U26740). Apesar de estas cepas terem origens geográficas diferentes, há uma grande similaridade genética entre elas, de acordo com a seqüência do RNA ribossomal 16S (KEYSARY, 1996).

A denominação Ehrlichiose Monocítica Canina está relacionada à infecção de monócitos por *E. canis*. Esta doença também já foi conhecida como Rickettsiose Canina, Doença de Cães “tracker”, Febre Hemorrágica Canina, Febre dos Carrapatos de Cães e Pancitopenia Tropical Canina (WANER e HARRUS, 2000).

Três fases da doença têm sido descritas na infecção experimental de cães por *E. canis*, mas não é fácil distingui-las nos cães naturalmente infectados. Inicialmente, ocorre a fase aguda, que cursa com sinais multissistêmicos, como febre, anorexia e depressão. Depois há desaparecimento dos sinais clínicos, começando a fase subclínica, que pode durar de meses a anos. Os cães imunocompetentes podem debelar a infecção ou avançarem para a fase crônica, última fase, quando podem ocorrer manifestações clínicas relacionadas à pancitopenia.

Infecções concomitantes por *E. canis* e outros agentes, como *Babesia canis* (MATTHEWMAN et al., 1993) e *A. platys* (HUA et al., 2000) têm sido relatadas, com variável gravidade de sinais clínicos, sendo de difícil identificação clínica.

### 2.5.1. Fase aguda da ehrlichiose monocítica canina

Depois de um período de incubação de oito a vinte dias, o cão infectado com *E. canis* começa apresentar diversos sinais sistêmicos, iniciando a fase aguda que dura de duas a quatro semanas. Nesta fase, os organismos ehrlichiais se multiplicam dentro das células mononucleares circulantes e nos tecidos fagocitários mononucleares do fígado, baço e linfonodos, induzindo a linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular do fígado e do baço. As células infectadas atingem outros órgãos através da corrente sanguínea, principalmente, pulmões, rins e meninges, e aderem-se ao endotélio vascular, levando a vasculite e infecção tecidual subendotelial (BREITSCHWERDT, 2004).

Os sinais clínicos na fase aguda podem ser suaves e inespecíficos, porém alguns casos podem se apresentar com ameaça à vida. Os sinais incluem depressão, letargia, anorexia, pirexia, linfadenomegalia, esplenomegalia e perda suave de peso. Os cães podem apresentar tendências a sangramento, principalmente petéquias e equimoses na pele e nas membranas mucosas, e epistaxe ocasional. Os sinais oculares não são incomuns e incluem uveíte anterior e opacidade corneana, por edema e/ou deposição de precipitados celulares, hifema, vasos retinianos tortuosos e lesões focais da coriorretina consistindo em pontos pigmentados centrais com áreas circunvizinhas hiperreflexivas. A hemorragia retiniana resulta em descolamento e conseqüente cegueira. Outros sinais clínicos podem incluir vômito, descarga ocular e

nasal serosa ou purulenta, claudicação, ataxia e dispnéia (WANER e HARRUS, 2000). Breitschwerdt (2004) relata também nesta fase a presença de edema nos membros e escroto.

Durante a fase aguda ocorre trombocitopenia imunomediada. Os mecanismos da trombocitopenia podem envolver a destruição imune, o consumo aumentado de plaquetas, meia vida diminuída das plaquetas, seqüestro pelo sistema mononuclear fagocitário ou pode ser secundário às concentrações aumentadas do fator circulante inibidor da migração plaquetária (BULLA et al., 2004b).

A contagem de leucócitos é variável para Breitschwerdt (2004). BULLA et al. (2004a) em um estudo retrospectivo de dez anos na cidade de Botucatu, observaram leucopenia por neutropenia, eosinopenia e linfopenia na fase aguda da doença em cães. Associaram a neutropenia às mesmas causas de trombocitopenia, e a eosinopenia e linfopenia ao estresse provocado pela doença.

A anemia está relacionada à supressão da produção de eritrócitos e à destruição acelerada destas células (BREITSCHWERDT, 2004; BULLA et al., 2004a).

### **2.5.2. Fase subclínica da ehrlichiose monocítica canina**

A fase subclínica da infecção ocorre após seis a nove semanas da inoculação, mas pode durar meses ou ano. É caracterizada por persistência variável de trombocitopenia, leucopenia e anemia na ausência de sinais clínicos. Nesta fase, os cães imunocompetentes podem eliminar os organismos ehrlichiais e cessarem a doença, não entrando na fase crônica (VARELA, 2003; BREITSCHWERDT, 2004).

Varela (2003) afirma que nesta fase os cães permanecem com títulos de anticorpos elevados. O diagnóstico da doença subclínica deve ser baseado na anamnese, na localização geográfica do cão, em títulos persistentes de anticorpos contra *E. canis*, leve trombocitopenia e hipergamaglobulinemia. O diagnóstico da doença nesta fase é um desafio ao Médico Veterinário, porém quando é reconhecido precocemente está relacionada a um bom prognóstico, antes que o animal entre na fase crônica, período de prognóstico sombrio (WANER e HARRUS, 2000).

Harrus et al. (1998) estudando seis cães após infecção experimental com *E. canis*, observaram através da reação em cadeia de polimerase à presença de DNA de *E. canis* em baço, medula óssea e sangue. Os títulos de anticorpos mensurados pela reação de imunofluorescência indireta, desses cães aumentaram progressivamente durante os primeiros cinco meses pós-infecção, permanecendo elevados por um período adicional de mais de 11 meses, e declinaram depois disso, sugerindo que os cães estavam se recuperando da doença. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que cães clinicamente saudáveis na fase subclínica são portadores de rickettsia, podendo eliminar o parasito e se recuperar sem desenvolver a doença clínica crônica.

### 2.5.3. Fase crônica da ehrlichiose monocítica canina

Segundo Breitschwerdt (2004) os sinais clínicos da fase crônica da ehrlichiose são discretos e ausentes em alguns cães e graves em outros, sendo diagnosticada por ocasião da pesquisa de outras doenças. Cães da raça Pastor Alemão e cães que apresentam outras doenças concomitantemente tendem a desenvolver sinais mais graves nesta fase (RIKIHISA, 1991; KNOWLES, 2002).

Os principais sinais clínicos da doença crônica são fraqueza, depressão, anorexia, perda crônica de peso, membranas mucosas pálidas, febre e edema periférico, especialmente dos membros e do escroto. Tendências a sangramento, como petéquias e equimoses na pele e nas membranas mucosas e epistaxe são achados comuns. Pneumonia intersticial, insuficiência renal, artrite e polimiosite podem ocorrer durante a doença crônica grave. Algumas desordens reprodutivas foram associadas também com a ehrlichiose crônica incluindo, sangramento prolongado durante o estro, infertilidade, abortos e mortes neonatais. Sinais neurológicos podem ocorrer durante as fases aguda e crônica. São sinais de meningoencefalite, ou seja, os cães apresentam dores severas no pescoço, paraparesia ou tetraparesia, ataxia, déficits dos nervos cranianos e convulsões. Os sinais neurológicos podem ser atribuídos à hemorragia, plasmocitose e infiltrados perivascularares nas meninges (McDADE, 1990; WANER e HARRUS, 2000).

Gould et al. (2000) descreveram um caso clínico de cão Labrador Retriever com quatro anos de idade apresentando uveíte bilateral, hemorragia intraocular e descolamento de retina associada à infecção crônica por *E. canis*.

As alterações hematológicas incluem pancitopenia, anemia aplásica, neutropenia e trombocitopenia em reposta a medula óssea hipocelular, com variados graus de supressão da série eritróide, mielóide e megacariocítica (WANER e HARRUS, 2000; BREITSCHWERDT, 2004).

As proteínas séricas estão acima dos valores esperados na maioria dos cães soropositivos para *E. canis* (BREITSCHWERDT, 2004). A hipergamaglobulinemia pode representar o desenvolvimento de resposta imunomediada a componentes celulares do hospedeiro, evidência que pode ser verificada pela ocorrência de eritrofagocitose e glomerulonefrite (KELLY, 1994). A eletroforese das proteínas séricas revela geralmente gamopatia policlonal ou monoclonal (WANER e HARRUS, 2000; BREITSCHWERDT, 2004). As causas de hipoalbuminemia podem estar associadas à perda renal das proteínas devido a nefropatia, hemorragias, doença hepática, perda periférica, devido a edema causado pela vasculite e também por compensação para manter a pressão oncótica, devido ao aumento das globulinas (BREITSCHWERDT, 2004).

Outros achados laboratoriais incluem azotemia, associada muitas vezes a glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos; aumento da alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e bilirrubina total (BREITSCHWERDT, 2004).

Esplenomegalia, linfadenopatia e plasmocitose em vários órgãos de animais infectados com *E. canis* foram observados na necropsia. Em cães experimentalmente infectados foi visto um grande número de mórulas nos pulmões, baço e linfonodos mesentéricos e através de microscopia eletrônica, em macrófagos pulmonares (McDADE, 1990; RIKIHISA, 1991).

## 2.6. Trombocitopenia cíclica canina

*Anaplasma platys* (FRENCH e HARVEY, 1983) DUMLER, BARBET, BEKKER, DASCH, PALMER, RAY, RIKIHISA & RURANGIRWA, 2001, anteriormente chamada de *Ehrlichia platys*, é uma bactéria que infecta apenas plaqueta de cães induzindo a doença conhecida como trombocitopenia cíclica canina. Foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos por Harvey et al. (1978). Cinco anos mais tarde, French e Harvey (1983) propuseram a criação de uma nova espécie por não apresentar semelhança antigênica com *E. canis*.

A seqüência do gene RNA ribossomal 16S de *A. platys* (INOKUMA et al., 2002) apresenta uma grande similaridade com *A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* (formado pela *E. equi* e agente da ehrlichiose granulocítica humana).

O carrapato vermelho do cão, *R. sanguineus*, pode estar envolvido na transmissão de *A. platys* (SIMPSON et al., 1991), mas ainda desconhece-se o vetor, pois experimentalmente não foi possível comprovar (McDADE, 1990; BREITSCHWERDT, 2004). No entanto, Inokuma et al. (2000) verificaram a presença de *A. platys* em *R. sanguineus* através da PCR. Sabe-se que através de transfusão de sangue de animal infectado, pode ocorrer a transmissão para um cão sadio (McDADE, 1990).

Nas plaquetas de cães infectados podem ser observados diferentes estádios de desenvolvimento da *A. platys*. O estágio inicial parece ser representado por corpos pequenos com uma membrana espessa e um protoplasma moderadamente eletrodenso. O estágio intermediário de desenvolvimento parece ser caracterizado pela condensação do material associada com o DNA na zona central do organismo. Finalmente, os corpos maduros de *A. platys* são caracterizados por uma área central eletro-lucente, com fibrilas de DNA, e uma substância granular eletro-densa periférica, composta de ribossomos. Estes organismos individuais se dividem por fissão binária (INOKUMA et al., 2002).

Inokuma et al. (2002) observaram através de microscopia eletrônica que o lisossomo se localizava próximo ao vacúolo contendo mórulas de *A. platys*, mas não tinha contato, indicando que a infecção por *A. platys* também impede a fusão dessas estruturas como já foi verificado na infecção por outras espécies de *Ehrlichia*.

A maioria dos relatos de trombocitopenia cíclica canina é considerada como uma doença benigna sem graves sinais clínicos. Conseqüentemente, *A. platys* não é considerado um organismo muito patogênico, nem agente de uma doença muito importante, porém, outras investigações demonstram sinais clínicos mais graves, similares na severidade àqueles associados com a infecção por *E. canis* (CHANG e PAN, 1996; INOKUMA et al., 2002).

Os sinais clínicos da doença são febre, depressão e anorexia (RIKIHISA, 1991). De acordo com Breitschwerdt (2004) foi observado trombocitopenia cíclica em intervalos de aproximadamente 10 a 14 dias, discreta anemia normocítica normocrômica arregenerativa, leucopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia em cães infectados experimentalmente.

Devido à parasitemia ser cíclica, o diagnóstico de *A. platys* em esfregaço sanguíneo pode ser difícil, sendo as mórulas geralmente encontradas incidentalmente. Na Venezuela, foram diagnosticados 4.936 casos de infecção por *A. platys* entre janeiro 1998 e dezembro 1999, por meio da análise do esfregaço sanguíneo (INOKUMA et al., 2002).

A co-infecção por *A. platys* e *E. canis* segundo Breitschwerdt (2004) é comum. Na China, Hua et al. (2000) descreveram o caso de um cão apresentando febre, epistaxe, anemia e leucopenia, com infecção por *A. platys* e *E. canis*, demonstrada pela análise do RNA ribossomal do gene 16S. Suksawat et al. (2001) descreveram dois casos de cães oriundos da Venezuela e Tailândia com infecção mista por *E. canis*, *A. platys* e *E. equi*.

## **2.7. Diagnóstico de ehrlichiose monocítica canina e trombocitopenia cíclica canina**

A ehrlichiose monocítica canina e a trombocitopenia cíclica canina são diagnosticadas com base nos sinais clínicos e achados laboratoriais incluindo sorologia, anormalidades hematológicas e alterações na bioquímica sérica. Trombocitopenia é o achado hematológico mais comum. As anormalidades bioquímicas séricas constam de hiperproteinemia, resultante de hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e aumento da atividade sérica da alanina aminotransferase e fosfatase alcalina (VARELA, 2003). Para Waner e Harrus (2000) os proprietários podem relatar infecção anterior por carrapato ou uma visita recente a uma área endêmica. O diagnóstico da ehrlichiose canina é confirmado pela visualização de mórulas em exame de esfregaço sangüíneo nos monócitos circulantes, detecção de altos títulos de anticorpos para *E. canis*, ou ainda pela demonstração do DNA de *E. canis* pela PCR.

As provas sorológicas podem detectar a presença de anticorpos mesmo depois da melhora clínica, fato que dificulta a avaliação da eficácia dos antibióticos no controle da infecção. Na fase aguda, os animais que falharam na produção de anticorpos ou nos primeiros dias pós-infecção podem gerar resultados falso-negativos na sorologia. Resultados falso-positivos podem ser gerados na sorologia pela grande reação cruzada entre *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e outras espécies de *Ehrlichia* (WEN et al., 1997). A PCR possui a vantagem de detectar o DNA ehrlichial nos primeiros dias pós-infecção e é bastante específico desde que usados “primers” que amplifiquem DNA da espécie investigada.

### **2.7.1. Diagnóstico citológico**

Para a visualização de mórulas, o exame microscópio direto do esfregaço sangüíneo é simples e barato e fornece um registro permanente (RIKIHISA, 1991). Para Varela (2003) a visualização de mórulas provê um diagnóstico definitivo, embora seja um processo demorado e com muitos resultados falso-negativos.

O diagnóstico de ehrlichiose pode ser efetuado através da observação de inclusões intracitoplasmáticas de coloração basofílica a púrpura em esfregaço sangüíneo periférico ou em concentrado leucocitário, corados pelo método de Romanowsky (GREENE e HARVEY, 1984) ou por Giemsa ou Diff-Quik (RIKIHISA, 1991).

Almosny (1998) e Torres (2002) verificaram nos primeiros dias pós-inoculação inclusões basofílicas em células mononucleares, representadas por elementos arredondados e pequenos, que diferiam das granulações azurófilas. As

inclusões foram caracterizadas como corpúsculos iniciais de *E. canis*, descrito por Elias (1991) como a forma mais característica no diagnóstico laboratorial de ehrlichiose canina, devido ao baixo percentual de células parasitadas por mórulas. A observação de corpúsculos iniciais eleva a possibilidade de diagnóstico positivo para cerca de 88%, já que segundo Harrus et al. (1997) as mórulas só são encontradas em 4% dos casos positivos.

As mórulas de *A. platys* são mais visualizadas no primeiro episódio de trombocitopenia e podem estar presentes de forma intermitente, sendo dificilmente vistas na fase crônica (CHANG e PAN 1996).

### **2.7.2. Isolamento em cultivo celular**

Comparando técnicas para o diagnóstico de ehrlichiose canina, Iqbal et al. (1994a) e Rikihisu (1991), afirmaram que o isolamento de *E. canis* em cultivo celular é o método mais sensível e seguro, porém impraticável por necessitar de longo período para apresentar resultados e requerer disponibilidade de cultura celular de boa qualidade assim como, condições laboratoriais adequadas, além do seu alto custo. Esse teste deve ser o de eleição para avaliação de agentes quimioterápicos, pela sua alta sensibilidade (IQBAL et al., 1994b).

Kaminjolo et al. (1976) descreveram o isolamento de *E. canis* em cultura de monócitos e posterior inoculação em cães, onde observaram a presença de corpúsculos elementares e iniciais nestes animais. Torres (2002) também descreve o isolamento e a propagação de *E. canis* em monócitos realizado no Brasil.

### **2.7.3. Reação em cadeia de polimerase (PCR)**

A reação em cadeia de polimerase tem demonstrado ser uma técnica altamente sensível e específica para diagnóstico de ehrlichiose (IQBAL et al. 1994a).

A amplificação do DNA Ehrlichia a partir de amostras clínicas é importante para a detecção e diferenciação das espécies de *Ehrlichia*, porque esses organismos crescem lentamente e em limitadas linhagens celulares e, ainda, há vários níveis de reação cruzada limitando a diferenciação sorológica de várias espécies. No momento, a PCR está sendo usada para detecção de gene RNA ribossomal 16S (SUMMER et al., 1997).

Chang e Pan (1996) demonstraram ser o “two-step” PCR altamente sensível e específico para o diagnóstico de *A. platys*, usando “primers” da seqüência do gene RNA ribossomal 16S.

A “nested” PCR é muito sensível e específica para a detecção de *E. canis*, sendo útil para o diagnóstico laboratorial e para verificação de eficácia de antibióticos contra essa infecção (WEN et al., 1997).

#### 2.7.4. Diagnóstico sorológico

O diagnóstico das doenças ehrlichiais é possível porque todos os organismos ehrlichiais induzem a uma resposta humoral específica. Contudo, esses testes, sem o suporte das informações clínicas, provêm limitada informação para o diagnóstico da doença (RIKIHISA, 1991).

##### 2.7.4.1. Imunofluorescência indireta

Para Waner e Harrus (2000) e Varela (2003) a prova de imunofluorescência indireta é considerada mais aceitável, o padrão ouro, para diagnóstico da ehrlichiose canina. É uma das técnicas mais utilizadas tanto para inquéritos epidemiológicos quanto para estudos clínicos individuais.

A detecção de anticorpos, imunoglobulinas G anti - *E. canis*, pode ser feita por imunofluorescência indireta 21 dias após a infecção. Altos títulos de anticorpos podem permanecer por vários anos em cães que tenham se recuperado clinicamente de ehrlichiose, e declina gradualmente em três a cinco meses depois do tratamento efetivo. Título positivo na imunofluorescência indireta para *E. canis* significa infecção ativa ou exposição passada (BANETH et al., 1996). Alguns animais podem apresentar um decréscimo rápido no título de anticorpos, enquanto que outros podem permanecer com títulos elevados por semanas ou meses (MAGNARELLI et al., 1993)

Baneth et al. (1996) afirmaram que a soroprevalência da ehrlichiose depende da localização geográfica, da amostragem e do título considerado positivo. Títulos de anticorpos comumente considerados positivos depende da referência do laboratório, podem ser adotadas como reagentes nas diluições de 1:10, 1:20 e 1:40.

Em 1983, French e Harvey padronizaram o teste de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos séricos para *A. platys*. Esse teste é útil para o diagnóstico da Trombocitopenia Cíclica quando a parasitemia está baixa ou ausente. No entanto, é limitado pela dificuldade em conseguir antígeno, pois o cultivo de *A. platys* até o momento não foi possível (CHANG e PAN, 1996).

Arraga-Alvarado et al. (2003) relataram preparação de antígeno de *A. platys* com plasma concentrado em plaquetas parasitadas.

##### 2.7.4.2. Imunoensaio enzimático

O DOT-ELISA, imunoensaio enzimático, é um procedimento sensível que detecta anticorpos séricos que não precisa de equipamentos caros, o antígeno fixado em nitrocelulose permanece estável por mais de um ano, apresenta facilidade para interpretação sem necessidade de treinamento especial e os resultados dão um registro permanente das reações (CADMAN et al., 1994).

Alguns kits desenvolvidos em escala comercial usam como antígeno a *Ehrlichia* íntegra, Immuncomb R (Biogal, Israel) ou proteínas específicas, p-30 e p30-1 de *E. canis*, SnapR 3 Dx assay (Idexx Laboratories Inc., USA) (HARRUS et al., 2002).



#### **2.7.4.3. Western immunoblotting**

Esta técnica sorológica se baseia na detecção de moléculas protéicas por anticorpos específicos, após serem isoladas e transportadas para um suporte inerte.

A técnica de Western Immunoblotting é quase tão sensível quanto a imunofluorescência indireta. A leitura resulta em achados mais precisos, pois o leitor não é influenciado pela sensibilidade visual, como no caso da interpretação das reações de imunofluorescência indireta. Embora, seja uma técnica mais cara, mais demorada e que exige maior demanda técnica comparada com a imunofluorescência indireta (IQBAL et al. 1994a), para esses autores, essa técnica identifica anticorpos a partir do quarto dia pós-exposição.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Período e Local de Trabalho**

Este estudo foi realizado no período de maio de 2004 a julho de 2005, utilizando o Setor de Clínica Médica Veterinária, os Laboratórios de Patologia Clínica, Doenças Parasitárias e de Parasitologia do Hospital Veterinário do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Mato Grosso. Os procedimentos das técnicas moleculares foram realizados no Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus Jaboticabal – Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Jaboticabal, São Paulo.

#### **3.2. Seleção dos Animais**

No Setor de Clínica Médica Veterinária do Hospital Veterinário foram selecionados 195 cães com alterações clínicas sugestivas de ehrlichiose monocítica canina e trombocitopenia cíclica canina, ou que residiam no mesmo local de cães com ehrlichiose canina diagnosticada pela observação microscópica de formas evolutivas nos esfregaços sangüíneos corados.

Todos os animais foram submetidos ao exame clínico, incluindo uma detalhada anamnese e exame físico. Para facilitar a análise de dados foi usada uma ficha clínica (Anexo 1) com dados sobre a origem, residência, sexo, raça, idade e infestações anteriores ou atuais por carrapatos, além dos sinais clínicos observados.

A escolha das amostras se deu de forma aleatória após a formação dos grupos pelos resultados do exame de esfregaço sangüíneo, não sendo processadas na totalidade pelo ônus das provas moleculares.

#### **3.3. Procedimento da Coleta e Identificação dos Carrapatos**

Para a coleta de carrapatos, os cães foram examinados, especialmente no pavilhão auricular e espaços interdigitais, para detecção de infestação. Os espécimes adultos encontrados foram coletados, conservados em álcool 70° GL e identificados no Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFMT, segundo chave proposta por Aragão e Fonseca (1961).

#### **3.4. Procedimento da Coleta de Sangue e Preservação das Amostras**

Amostras sangüíneas foram colhidas a partir de venipunção cefálica ou jugular, sendo armazenadas em tubos de ensaio contendo ácido etileno diamino

tetracético (EDTA), para o hemograma e reação em cadeia de polimerase; e fluoreto de sódio, para determinação de glicemia e outro sem anticoagulante, para realização das análises bioquímicas.

Os esfregaços sangüíneos foram confeccionados utilizando a primeira e segunda gota após punção da ponta do pavilhão auricular; de sangue venoso e de capa leucocitária obtida após centrifugação do sangue total em tubos de microhematócrito, corados pela técnica para diferenciação rápida em hematologia (Newprov®).

As amostras de sangue com EDTA para realização de técnicas moleculares, foram armazenadas em freezer a - 20 °C. Essas amostras foram enviadas refrigeradas em recipiente térmico através da Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos, ao Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus Jaboticabal – UNESP, para processamento da PCR.

### **3.5. Análises Clínicas**

No hemograma foram avaliados volume globular, hematimetria, hemoglobimetria, leucometria global e específica, hematoscopia e leucocitoscopia realizados de acordo com Kaneko (1997).

A contagem de plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer utilizando-se como diluente oxalato de amônio a 5% (KANEKO, 1997).

A determinação dos valores séricos de uréia, creatinina, glicose, aspartato amino transferase, alanina amino transferase, fosfatase alcalina, bilirrubina total e direta e albumina foram realizados utilizando-se kits comerciais (Labtest®), enquanto a concentração sérica de bilirrubina indireta e globulina foram determinadas através de cálculos aritméticos no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Mato Grosso (KANEKO, 1997).

Os níveis plasmáticos de proteína total e fibrinogênio foram determinados por refratometria (KANEKO, 1997).

### **3.6. Análise do Esfregaço Sangüíneo**

As lâminas de esfregaço sangüíneo foram analisadas através de microscopia óptica, utilizando objetiva com aumento 100 vezes (Olympus®) para avaliação da presença de mórulas em leucócitos e plaquetas.

### **3.7. Amostras utilizadas na PCR**

Para a caracterização das espécies envolvidas neste estudo, foram formados quatro grupos para investigação da infecção, utilizando PCR, sendo selecionados 15 amostras que não apresentavam nenhuma mórula no esfregaço sangüíneo, 15 amostras de cães que apresentavam mórulas em células monocíticas e granulocíticas, 15 amostras de cães que apresentavam mórulas apenas em plaquetas e 15 amostras de

cães que haviam sido observadas mórulas tanto em plaquetas, quanto em células monocíticas e granulocíticas.

### **3.8. Extração de Material Genômico (DNA)**

O material genômico foi extraído a partir de alíquotas de 200µL de sangue total de cães com EDTA como anticoagulante, utilizando-se o QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen ®), conforme instruções do fabricante. Este DNA foi armazenado a – 20°C até a sua utilização.

Amostras de sangue de cães com infecção confirmada pela presença de formas características da família *Anaplasmataceae* em esfregaço sanguíneo e aquelas isentas destas infecções, foram também submetidas à extração de DNA para serem usadas como controles positivos e negativos nas reações.

### **3.9. Reação em Cadeia de Polimerase**

#### **3.9.1. Oligonucleotídeos Iniciadores (Primers)**

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (primers) selecionados para a realização da reação em cadeia de polimerase (PCR) baseados em seqüências parciais do gene 16SrRNA dos organismos *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a primeira etapa de amplificação para o gênero *Ehrlichia* foram ECC (5' - aga acg aac gct ggc ggc aag cc - 3') e ECB (5' - cgt att acc gcg gct gct ggc - 3'), e para a segunda etapa de amplificação para a espécie *E. canis* foram ECAN e HE3, que amplificam fragmentos de 458 e 398 pares de bases, respectivamente (WEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998).

Para o *Anaplasma platys*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PLATYS –F (5' - aag tcg aac gga ttt ttg tc - 3') e PLATYS –R" (5' - ctt taa ctt acc gaa cc - 3'), que amplificam um fragmento de 504 pares de bases (INOKUMA et al., 2001).

#### **3.9.2. Amplificação de *Ehrlichia canis***

Para a primeira etapa (PCR) e segunda (nested PCR) de amplificação foram utilizadas a técnica descrita por MURPHY et al. (1998) com algumas modificações.

A primeira etapa de amplificação (PCR) para o gênero *Ehrlichia* foi realizada utilizando-se uma reação de volume total de 50 µL, com uma mistura contendo 10 µL de DNA-amostra ( ~ 1 µg de DNA); 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen ®), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen ®), 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen ®), 1,25U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen ®), Tampão de PCR 10X (Invitrogen ®) e água ultra-pura qsp. A seqüência térmica e de tempo consistiu de 94° C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, 65 °C por 2 minutos e 72 °C por 2 minutos e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

A segunda etapa de amplificação (nested PCR) para a espécie *E. canis*, foi realizada com as mesmas condições da PCR, exceto que o DNA-amostra foi de 1,0 µL do produto amplificado da PCR. A seqüência térmica e de tempo consistiu de dois ciclos de 94° C por 1 minuto, 55 ° C por 2 minutos, e 72 °C por 90 segundos, seguidos por 37 ciclos de 92° C por 1 minuto, 55 °C por 2 minutos e 72 °C por 90 segundos, e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

As reações de amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Modelo PTC-200 (MJ – Research, Inc.™).

### **3.9.3. Amplificação de *Anaplasma platys***

A amplificação (PCR) para o *Anaplasma platys* foi realizada utilizando-se uma reação de volume total de 50 µL, com uma mistura contendo 10 µL de DNA-amostra (~ 1 µg de DNA), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen ®), 1,6 mM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen ®), 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen ®), 0,75U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen ®), Tampão de PCR 10X (Invitrogen ®) e água ultra-pura qsp. A seqüência térmica e de tempo consistiu de 94° C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos, e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Uma segunda etapa de amplificação (nested PCR) para o *A. platys*, foi realizada com as mesmas condições da reação de PCR, exceto que o DNA-amostra foi de 1,0 µL do produto amplificado da PCR. A seqüência térmica e de tempo foi à mesma utilizada na primeira etapa.

As reações de amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Modelo PTC-200 (MJ – Research, Inc.™).

### **3.9.4. Análise dos produtos amplificados**

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em Gel de Agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo 0,01% em cuba horizontal com tampão de Corrida TEB 1X (Tris-base, Acido Bórico e EDTA dissódico, pH= 8,0), sob fonte de 100V/50mA, durante 2 horas de corrida. A leitura foi realizada em transluminador de luz ultravioleta -Transluminator-UV light Box – model 2020E (Stratagene ®), com posterior documentação fotográfica com o programa Stratagene - Eagle Sight (Eagle Eye II – PIII Computer W/MiniCamera) e impressão (Mitsubishi –Video Copy Processor ®).

## **3.10. Análise Estatística**

Para a análise estatística dos resultados obtidos, foi utilizado o método não paramétrico do qui-quadrado, através do programa Epi info versão 3.3.2.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos esfregaços sangüíneos de sangue venoso, capa leucocitária e sangue de ponta de orelha dos 195 cães estudados foram observadas mórulas em monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e plaquetas.

Com base no estudo feito com *E. canis* por Almosny (1998) que verificou mórulas em outras células, além da série monocítica e achados clínicos inespecíficos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizada neste estudo confirmou a eficiência do diagnóstico pela técnica de esfregaço sangüíneo, além de ter identificado duas espécies envolvidas no parasitismo dos cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso.

Após exame de esfregaço sangüíneo, em 29 (14,9%) cães foram observadas mórulas de *E. canis* em leucócitos, em 83 (42,6%) verificou-se a presença de mórulas de *E. canis* e *A. platys* em leucócitos e plaquetas, respectivamente; em 54 (27,7%) amostras foram visualizadas mórulas somente de *A. platys* em plaquetas e em 29 (14,9%) amostras não foram encontradas mórulas. Este último grupo foi considerado “negativo” nesta técnica.

Dos quinze cães que foram visualizadas mórulas exclusivamente em leucócitos, quatro apresentaram amplificação de DNA de *E. canis*. Nas amostras sangüíneas dos quinze cães onde se observaram mórulas apenas em plaquetas houve amplificação de DNA de *E. canis* em duas amostras e concomitantemente *E. canis* e *A. platys*, em outras duas amostras. Entre o grupo de cães que apresentaram mórulas tanto em leucócitos quanto em plaquetas, constatou-se DNA de *E. canis* em três animais. Já no grupo onde não foram observadas mórulas, em quatro cães ocorreu amplificação de DNA para *E. canis*.

Em síntese, nas sessenta amostras analisadas pela PCR, foi constatada em 13 (21,7%) a amplificação de DNA de *E. canis* e em duas (3,3%) a amplificação concomitante de DNA de *E. canis* e *A. platys*.

Para uma melhor caracterização dos efeitos do parasitismo por *E. canis* e *A. platys* em cães, foram avaliados os aspectos demográficos, aspectos clínicos, achados hematológicos e achados bioquímicos, cujos resultados e discussão são apresentados em tópicos próprios, seguidos pelos resultados e discussão das técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas.

### 4.1. Características Demográficas

#### 4.1.1. Associação entre idade e sexo dos cães e o parasitismo por *E. canis* e *A. platys*.

Dentre as faixas etárias dos cães atendidos com suspeita de ehrlichiose não houve diferença significativa (Tabela 01), concordando com as observações de Harrus et al. (1997) e divergindo dos achados de Baneth et al. (1996), que justificam maior prevalência entre cães adultos e idosos, por apresentarem mais tempo de exposição ao hospedeiro invertebrado e maior suscetibilidade para os cães idosos.

**Tabela 01.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* por faixa etária dos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Faixa etária	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
< 1 ano	9 31,03%	17 31,48%	32 38,10%	8 27,59%	2 15,39%	-	16 35,55%
1 a 4 anos	9 31,03%	23 42,59%	24 28,57%	17 58,62%	7 53,85%	2 100%	17 37,77%
4 a 8 anos	9 31,03%	10 18,52%	13 15,48%	2 6,90%	1 7,70%	-	5 11,11%
> 8 anos	2 6,90%	4 7,41%	14 16,67%	3 10,34%	3 23,10%	-	7 15,55%

A avaliação dos esfregaços sanguíneos não mostrou uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o número de fêmeas e machos parasitados por *E. canis* e/ou *A. platys* (Tabela 02). Também não foi demonstrada predisposição sexual, nos cães que apresentaram amplificação de DNA de *E. canis* e *A. platys*, apesar do número de indivíduos com infecção ser muito pequeno, dificultando tal análise. Da mesma forma, no estudo de Harrus et al. (1997) não foi verificada predisposição sexual.

**Tabela 02.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* por sexo dos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Sexo	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Macho	10 34,48%	29 53,70%	42 50,60%	11 37,93%	7 53,85%	1 50,00%	24 53,33%
Fêmea	19 65,52%	25 46,30%	41 49,40%	18 62,07%	6 46,15%	1 50,00%	21 46,67%

#### 4.1.2. Associação entre o local de residência dos cães, a presença de carrapatos, a raça e o parasitismo por *E. canis* e *A. platys*.

A maioria dos animais estudados era proveniente de domicílios da zona urbana. Apenas cinco cães viviam em apartamentos, oito na zona rural e três freqüentavam esporadicamente a zona rural. Devido a esta distribuição desigual na amostragem não foi possível relacionar o ambiente de vida dos animais aos riscos de infecção por *E. canis* e *A. platys* (Tabela 03).

**Tabela 03.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* por tipo de moradia dos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Moradia	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Apartamento	2 6,90%	-	2 2,41%	1 3,45%	1 7,70%	-	1 2,22%
Casa urbana	26 89,66%	53 98,15%	73 87,95%	27 93,10%	12 92,30%	2 100,0%	41 91,11%
Domicílio rural	-	1 1,85%	6 7,23%	1 3,45%	-	-	2 4,44%
Esporádico rural	1 3,45%	-	2 2,41%	-	-	-	1 2,22%

A maioria dos animais apresentava infestação por carrapatos no momento da consulta veterinária (65,1%) ou anteriormente (24,6%). Poucos (10,3%) proprietários relataram que seus cães nunca tiveram contato com o vetor (Tabela 04). Mesmo neste último grupo, foi possível constatar a infecção por *E. canis* e *A. platys*, sugerindo outras formas de transmissão, que ainda precisam ser mais estudadas. No entanto, o mais provável é que as informações obtidas dos proprietários estivessem incorretas devido ao desconhecimento do mesmo sobre a presença do vetor em seus animais, relatando que estes nunca apresentaram carrapatos. Todos os carrapatos coletados foram identificados como pertencentes a espécie *R. sanguineus*.



**Tabela 04:** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e a presença de carrapatos nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Presença de carrapatos	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i>	<i>A. platys</i>	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>	Negativo	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>	Negativo
	n=29	n=54	n=83	n=29	n=13	n=2	n=45
Com infestação	16	35	58	18	8	1	34
	55,17%	64,81%	69,88%	62,07%	61,54%	50%	75,55%
Infestação anterior	11	13	16	8	5	-	5
	37,93%	24,07%	19,28%	27,59%	38,46%	-	11,11%
Infestação não relatada	2	6	9	3	-	1	6
	6,90%	11,11%	10,84%	10,34%	-	50%	13,33%

Dentre os 195 cães atendidos, diferentes raças foram examinadas, não havendo predominância da infecção entre elas. Este estudo foi composto por 39 (20%) cães sem raça definida, 26 (13,33%) Pit Bull, 16 (8,20%) Pastor Alemão, 12 (6,15%) Poodle, 12 (6,15%) Dachshund, 12 (6,15%) Rottweiler, 10 (5,23%) Cocker Spaniel, 10 (5,23%) Fila Brasileiro, 8 (4,10%) Pinscher, 7 (3,60%) Boxer, 6 (3,07%) Dobermann, 5 (2,54%) Labrador Retriever e 32 (16,41%) animais pertencentes a outras raças. A da detecção de DNA de *E. canis* e/ou *A. platys* não ocorreu em cão da raça Pastor Alemão, entretanto, dos 195 cães analisados pela técnica de esfregaço sanguíneo, quatorze apresentaram mórulas em leucócitos e/ou plaquetas. Segundo Harrus et al. (1997) relataram maior gravidade dos sinais clínicos em cães da raça Pastor Alemão, o que não foi observado neste estudo.

#### 4.2. Aspectos Clínicos da infecção por *E. canis* e *A. platys*

Neste estudo, foi observado, apenas treze cães sem alterações clínicas, sendo estes contactantes de cães com ehrlichiose.

Nos cães com ehrlichiose canina e trombocitopenia cíclica canina, a partir da observação de mórulas de *E. canis* e *A. platys* nos esfregaços sanguíneos, não foram demonstradas diferenças significativas na sintomatologia clínica da doença. Os cães com infecção por *E. canis* constatada pela PCR, apresentaram sinais clínicos inespecíficos, como apatia, anorexia e febre. Também apresentaram distúrbios oftálmicos e tendências à hemorragia, além de esplenomegalia, concordando com os descritos por Harrus et al. (1997) e Matthewman et al. (1993) em estudos de ehrlichiose canina diagnosticada através do teste de imunofluorescência indireta.

Na Tabela 05 pode ser visualizada os principais sinais clínicos dos cães com suspeita clínica de ehrlichiose monocítica canina e trombocitopenia cíclica canina, diagnosticados pelo exame de esfregaço sanguíneo corado e pela PCR.

**Tabela 05.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e dos principais sinais clínicos nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

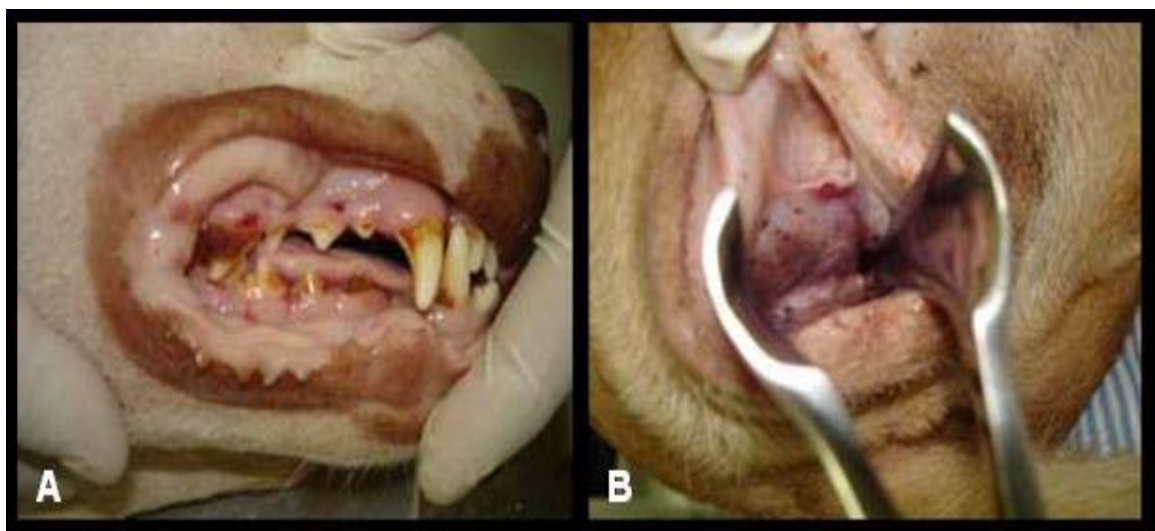
Sinais clínicos*	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Apatia	8 27,59%	13 24,07%	16 19,27%	10 34,48%	4 30,77%	1 50,0%	12 26,66%
Anorexia	3 10,34%	5 9,26%	10 12,05%	7 24,13%	2 15,38%	-	4 8,88%
Pirexia	7 24,13%	8 14,81%	12 14,45%	5 17,24%	3 23,07%	1 50,0%	5 11,11%
Linfoadenopatia	17 58,62%	30 55,55%	48 57,83%	16 55,17%	6 46,15%	1 50,0%	28 62,22%
Esplenomegalia	4 13,79%	6 11,11%	15 18,07%	2 6,90%	2 15,38%	-	3 6,66%
Perda de peso	3 10,34%	12 22,22%	13 15,66%	6 20,69%	2 15,38%	1 50,0%	11 24,44%
Distúrbios oftálmicos	7 24,13%	12 22,22%	31 37,35%	11 37,93%	3 23,07%	-	9 20,0%
Distúrbios hemorrágicos	5 17,24%	6 11,11%	4 4,82%	3 10,34%	5 38,46%	-	4 8,88%
Palidez de mucosas	7 24,13%	7 12,96%	11 13,25%	6 20,69%	3 23,07%	-	8 17,77%

\* sinais concomitantes

Dentre os sinais clínicos observados houve maior frequência, estatisticamente significativa, de distúrbios hemorrágicos (Figura 01 e 02) nos cães com infecção por *E. canis*, comprovada pela PCR.



**Figura 01.** Cão infectado por *Ehrlichia canis*, confirmado pela observação de formas evolutivas em esfregaço sangüíneo corado, apresentando apatia e epistaxe unilateral (A) epistaxe com intensa hemorragia após agitação do animal (B).



**Figura 02.** Cadela infectada por *Ehrlichia canis*, confirmado pela observação de formas evolutivas em esfregaço sangüíneo corado, apresentando palidez e petéquias na mucosa oral (A) e vaginal (B).

Neste estudo, a maioria dos achados clínicos dos cães com ehrlichiose diagnosticadas pela PCR não induziram o grave comprometimento sistêmico. De forma semelhante Almosny (1998) e Torres (2002), em cães sem raça definida descreveram sinais clínicos brandos em cães infectados experimentalmente. Sinais mais severos foram observados em poucos cães, e geralmente estavam associados a outras patologias. De acordo, com Almosny (1998) o abrandamento dos sinais clínicos pode ser justificado pela relação parasito-hospedeiro decorrente da estabilidade enzoótica em áreas endêmicas, pois os relatos de cães infectados na Guerra do Vietnã eram muito graves com prognóstico sombrio (HUXSOLL et al., 1969), mesmo na fase aguda.

Nos dois cães que tiveram comprovação de diagnóstico pela PCR de infecção concomitante por *E. canis* e *A. platys* também foram identificados sinais clínicos inespecíficos como apatia, febre, linfadenopatia e perda de peso no momento do exame clínico, mas pelas alterações hematológicas observadas. Aparentemente, estavam no início da fase crônica da infecção, período de prognóstico desfavorável.

### **4.3. Achados Hematológicos**

#### **4.3.1. Alterações eritrocitárias**

A principal forma de anemia observada foi anemia normocítica normocrômica, sendo que em 27 cães com infecção por *E. canis*, *A. platys* e co-infecção pelos dois agentes, havia sinais de regeneração e em 16 cães não havia achados indicativos de resposta medular (Tabela 06). Três cães com *E. canis*, diagnosticados através da PCR, apresentaram anemia normocítica normocrômica, sendo esta a forma mais observada na ehrlichiose, como também foi citado por Almosny (1998). Neste estudo, um não apresentou sinais de regeneração, indicando depleção medular.

Os cães que apresentaram infecção concomitante por *E. canis* e *A. platys* diagnosticados através da PCR, exibiram anemia arregenerativa, sugerindo infecção crônica.

#### **4.3.2. Alterações leucocitárias e das plaquetas**

Nos cães com ehrlichiose monocítica e trombocitopenia cíclica, confirmada pela observação de mórulas de *E. canis* e *A. platys* em esfregaço sanguíneo, não houve diferença significativa nos achados leucocitários, quanto à contagem de neutrófilos e monócitos. Já, nos animais que apresentaram leucopenia e linfopenia, houve diferença significativa entre os grupos, negativo e com infecção por *E. canis*, e o negativo e os com co-infecção por *E. canis* e *A. platys*, respectivamente, havendo predomínio desses achados no grupo considerado negativo. Nos cães com infecção por *A. platys* foi verificada superioridade de eosinofilia comparado aos com infecção mista por *A. platys* e *E. canis*. Tais achados demonstram a variação do leucograma nos quadros clínicos de ehrlichiose monocítica canina e trombocitopenia cíclica canina, que varia de acordo com a fase da doença.

**Tabela 06.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e das principais alterações eritrocitárias nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Alterações eritrocitárias	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Anemia normocítica normocrômica regenerativa	5 17,24%	7 12,96%	15 18,07%	7 24,14%	2 15,38%	-	8 17,80%
Anemia normocítica normocrômica arregenerativa	1 3,45%	4 7,41%	11 13,25%	3 10,34%	1 7,70%	-	2 4,50%
Anemia normocítica hipocrômica regenerativa	2 6,90%	4 7,41%	7 8,43%	1 3,45%	1 7,70%	-	4 8,90%
Anemia normocítica hipocrômica arregenerativa	-	5 9,26%	1 1,20%	4 13,79%	-	2 100,0%	2 4,50%
Anemia microcítica normocrômica regenerativa	1 3,45%	-	-	-	-	-	-
Anemia microcítica normocrômica arregenerativa	1 3,45%	-	-	-	-	-	-

A contagem global de leucócitos encontrava-se diminuída em um cão com *E. canis*, diagnosticado através da PCR, e aumentada em cinco (Tabela 07). Já, um dos cães com co-infecção por *E. canis* e *A. platys* apresentava contagem de leucócitos diminuída.

**Tabela 07.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e das principais alterações leucocitárias nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Alterações leucocitárias	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Leucocitose	3 10,34%	6 11,11%	12 14,46%	3 10,34%	5 38,46%	-	7 15,55%
Leucopenia	2 6,90%	9 16,67%	11 13,25%	9 31,03%	1 7,69%	1 50,0%	9 20,0%
Neutrofilia	5 17,24%	6 11,11%	12 14,46%	4 13,79%	4 30,77%	-	7 15,55%
Neutropenia	1 3,45%	3 5,56%	5 6,02%	3 10,34%	1 7,69%	-	5 11,11%
Linfocitose	-	4 7,41%	7 8,43%	1 3,45%	2 15,38%	-	3 6,66%
Linfopenia	4 13,79%	7 12,96%	4 4,82%	6 20,69%	3 23,07%	1 50,0%	4 8,88%
Monocitose	2 6,90%	4 7,41%	7 8,43%	-	1 7,69%	-	-
Monocitopenia	-	5 9,26%	5 6,02%	4 13,79%	2 15,38%	-	3 6,66%
Eosinofilia	3 10,34%	11 20,37%	6 7,23%	3 10,34%	2 15,38%	-	7 15,55%
Eosinopenia	8 27,59%	6 11,11%	12 14,46%	9 31,03%	3 23,07%	1 50,0%	6 13,33%

A leucopenia por neutropenia deve-se a destruição na fase aguda da doença e a hipoplasia na fase crônica, dado compatível com as observações de Bulla et al. (2004a) e Harrus et al. (1997).

A infecção por *E. canis* em cães, leva a supressão difusa da medula óssea, induzindo a trombocitopenia, anemia e leucopenia (MOORE & BENDER, 2000; GOULD et al., 2000).

Neste estudo foi verificada pancitopenia em um cão com infecção por *E. canis* diagnosticada através da PCR, e sem visualização de mórula no exame de esfregaço sanguíneo, quadro que pode ocorrer no sangue de cães com ehrlichiose aguda ou crônica. Na forma aguda, a medula óssea é hiper celular, sugerindo que a citopenia

resulte de destruição no sangue periférico. Na forma crônica, a medula é hipocelular consistente com diagnóstico de anemia aplásica (WEISS, 2000).

Dos cães com infecção por *E. canis*, *A. platys* e co-infecção pelos dois agentes, 11, 15 e 19, respectivamente tinham trombocitopenia (Tabela 08). No entanto, houve diferença significativa entre os cães com co-infecção por *E. canis* e *A. platys* e o grupo de cães negativos, sendo que no último grupo houve maior percentual de animais trombocitopênicos. Essas observações demonstram que a trombocitopenia é um achado característico, mas não exclusivo de ehrlichiose canina, podendo aparecer em diversos quadros nosológicos. Dagnone et al. (2003) em estudo feito na Universidade Estadual de Londrina afirmaram que um dentre cinco cães trombocitopênicos tinham ehrlichiose. Bulla et al. (2004b) demonstraram através de pesquisa realizada em Botucatu, que o grau de trombocitopenia pode auxiliar no diagnóstico de ehrlichiose monocítica canina, pois no grupo com contagem de plaquetas inferior a 100 mil células houve mais amplificação de DNA de *E. canis*.

Dos treze cães com *E. canis*, diagnosticadas pela PCR, sete apresentaram trombocitopenia, um trombocitose (Tabela 08). Os cães com co-infecção por *E. canis* e *A. platys* não apresentaram alteração numérica de plaquetas, apenas na forma, sendo visualizadas macroplaquetas em um dos animais. A visualização destas formas em grande número de amostras sangüíneas foi descrita por Macedo e Leal (2005), num estudo retrospectivo feito em Natal, Rio Grande do Norte e por Almosny (1998). Para Meyer et al. (1995) preponderância de plaquetas grandes com granulações esparsas sugere aumento da produção e liberação de plaquetas na circulação e para Jain (1993) as macroplaquetas podem ser achadas ocasionalmente em animais normais.

**Tabela 08.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e das principais alterações plaquetárias nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Alterações plaquetárias	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Trombocitose	8 27,59%	8 14,81%	17 20,48%	3 10,34%	1 7,69%	-	7 15,55%
Trombocitopenia	11 38%	15 27,78%	19 22,89%	13 44,83%	7 53,84%	-	13 28,88%
Macroplaquetas	20 69%	38 70,37%	59 71,08%	16 55,17%	8 61,53%	1 50,0%	27 60,0%

Hipoplasia megacariocítica e decréscimo na meia vida plaquetária resultante de processos imunológicos e consuntivos contribuem para a trombocitopenia na infecção por *E. canis*. Já, o mecanismo de trombocitopenia associado à infecção por *A. platys* não é compreendido, mas acredita-se ter mecanismo imunológico envolvido. O decréscimo na produção de plaquetas não está comprovado, já que *A. platys* não foi

encontrado em megacariócitos, e estas células estão em número elevado nos cães infectados (RUSSEL & GRINDEM, 2000).

#### **4.4. Achados Bioquímicos**

##### **4.4.1. Proteínas Séricas**

Não foi verificada diferença significativa nos valores das proteínas séricas entre os cães com infecção por *E. canis*, *A. platys*, co-infecção pelos dois agentes e os negativos.

O valor das proteínas séricas totais encontrava-se elevado em três cães com *E. canis*, isoladamente e em um com infecção associada a *A. platys*, através da PCR. No entanto, em sete cães com infecção por *E. canis* e co-infecção foram observados hipoproteinemia que pode ser decorrente da redução dos níveis plasmáticos de albumina.

A hipoalbuminemia observada nos cães com infecção por *E. canis* e/ou *A. platys* no esfregaço sangüíneo e na PCR pode decorrer de seqüestro ou edema advindo da vasculite na fase aguda; e na fase crônica, por perda glomerular decorrente da deposição de imunocomplexos ou imunoestimulação crônica. Alguns cães apresentaram elevação sérica de albumina secundária à desidratação.

Hiperglobulinemia foi verificada em 50 cães com infecção por *E. canis* e/ou *A. platys* diagnosticada pelo exame do esfregaço sangüíneo e em quatro, pela PCR. Na ehrlichiose canina ocorre hiperglobulinemia por aumento da fração gama, e esta hipergamaglobulinemia pode ser monoclonal, induzindo a hiperviscosidade sérica. Este fato pode exacerbar a tendência a sangramento por interferência física com as plaquetas e fatores da coagulação, além de causar danos ao endotélio vascular e venoestase (GOULD et al., 2000).

A hipoglobulinemia foi constatada em 50 dos cães com infecção por *E. canis* e/ou *A. platys*, pelo exame do esfregaço sangüíneo e em sete, pela PCR; da mesma forma, também foi observada nos grupo de animais onde não foram visualizadas mórulas e nem DNA de *E. canis* ou *A. platys*. Fato justificado pela presença de distúrbios entéricos ou hepáticos graves, levando tanto a perda de albumina como de globulina intestinal.

Não foi encontrada diferença na análise estatística dos níveis séricos de fibrinogênio dos 195 cães examinados, concordando com as observações de Almosny (1998) que cita que a sua elevação está relacionada a diferentes processos inflamatórios e infecciosos dos cães (Tabela 09).

##### **4.4.2. Uréia e Creatinina**

A diminuição da concentração sérica de uréia foi encontrada em três cães com infecção por *E. canis*, sete por *A. platys* e dois com co-infecção diagnosticada através do exame do esfregaço sangüíneo. Achado relacionado provavelmente a lesões hepáticas graves, que cursam com diminuição da conversão da amônia em uréia.



**Tabela 09.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e das alterações na concentração das proteínas séricas nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Hipoproteinemia	9 31,03%	10 18,52%	16 19,28%	9 31,03%	6 46,15%	1 50,0%	8 17,77%
Hiperproteinemia	7 24,14%	14 25,93%	27 32,53%	7 24,14%	3 23,07%	1 50,0%	14 31,11%
Hipoalbuminemia	13 44,83%	22 40,74%	34 40,96%	14 48,28%	5 38,46%	2 100,0%	20 44,44%
Hiperalbuminemia	3 10,34%	13 24,07%	22 26,51%	8 27,59%	2 15,38%	-	12 26,66%
Hipoglobulinemia	10 34,48%	11 20,37%	29 34,94%	10 34,48%	6 46,15%	1 50,0%	13 28,88%
Hiperglobulinemia	6 20,69%	16 29,63%	28 33,73%	7 24,14%	3 23,07%	1 50,0%	13 28,88%
Hiperfibrinogenemia	-	7 12,96%	5 6,02%	3 10,34%	1 7,69%	1 50,0%	2 4,44%

Os níveis séricos de uréia encontravam-se elevados em 17,24%, 20,37% e 14,46% dos cães com *E. canis*, *A. platys* e co-infecção pelos dois agentes diagnosticados pelo esfregaço sanguíneo, respectivamente e em 30,77% dos cães com infecção por *E. canis* através da amplificação de DNA. O aumento da concentração sérica de creatinina se deu em todos os grupos estudados. Essa elevação sérica de uréia e creatinina pode estar relacionado a azotemia pré-renal, principalmente nos animais com desidratação severa ou ainda a glomerulonefrite nos casos crônicos de ehrlichiose (Tabela 10).

#### 4.4.3 – Enzimas Séricas

Nos cães com infecção por *E. canis*, *A. platys* ou co-infecção pelos dois agentes, diagnosticada através do exame do esfregaço sanguíneo não houve diferença significativa nas atividades séricas da fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase.

**Tabela 10.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e das alterações dos níveis séricos de uréia e creatinina nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Níveis séricos de uréia e creatinina	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Uréia aumentada	5 17,24%	11 20,37%	12 14,46%	5 17,24%	4 30,77%	-	6 13,33%
Uréia diminuída	3 10,34%	2 3,70%	7 8,43%	3 10,34%	-	-	4 8,89%
Creatinina aumentada	5 17,24%	4 7,41%	6 7,23%	6 20,69%	2 15,38%	-	5 11,11%

Dois cães apresentaram elevação da atividade sérica de fosfatase alcalina, sem, no entanto, demonstrar outras alterações séricas da alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, confirmada através da PCR (Tabela 11). Fato que pode decorrer de dano hepático ou de estresse sistêmico provocado por diversas doenças (ALMOSNY, 1998).

**Tabela 11.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e da elevação da atividade sérica das enzimas hepáticas nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

Enzimas séricas	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
AST aumentada	2 6,90%	2 3,70%	3 3,61%	3 10,34%	-	-	2 4,44%
ALT aumentada	2 6,90%	3 5,56%	2 2,41%	2 6,90%	-	-	1 2,22%
FA aumentada	1 3,45%	-	2 2,41%	3 10,34%	2 15,38%	-	-

#### 4.4.4 – Glicose

Nos cães estudados verificou-se tanto a elevação quanto à diminuição da glicemia, não tendo sido observado diferenças significativas entre os animais com ou sem infecção por *E. canis*, *A. platys* ou co-infecção, através do exame do esfregaço sanguíneo e da PCR, achado que pode ter relação com outras doenças ou a quadros de anorexia prolongada induzindo a hipoglicemia (Tabela 12). Segundo Almosny (1998) poderia ocorrer hipoglicemia tanto pela anorexia quanto pela alta taxa de metabolismo do parasito, entretanto em seu estudo experimental não foi observada diferença entre os cães inoculados e os do grupo controle.

**Tabela 12.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e dos níveis de glicemia nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Glicemia							
Hipoglicemia	4 13,79%	6 11,11%	5 6,02%	1 3,45%	2 15,38%	-	2 4,44%
Hiperglicemia	7 24,14%	7 12,96%	14 16,87%	2 6,90%	2 15,38%	1 50,0%	7 15,55%

#### 4.4.5 – Bilirrubinas

Com relação a ocorrência de bilirrubinemia direta ou indireta (Tabela 13) não foi observada diferença significativa entre os cães, com ou sem infecção por *E. canis*, *A. platys* ou co-infecção pelos dois agentes, através do exame do esfregaço sanguíneo e da PCR. Concordando com observação de Almosny (1998), que verificou normalidade dos níveis médios das bilirrubinas direta e indireta nos cães experimentalmente infectados com *E. canis*.

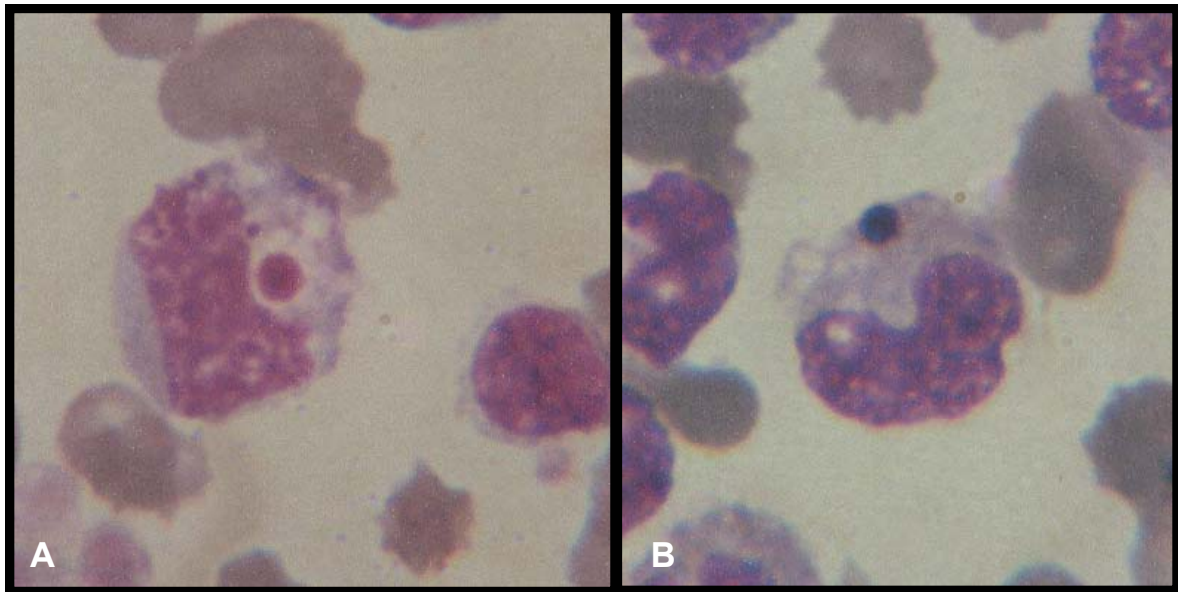
**Tabela 13.** Frequência do parasitismo por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e dos níveis de bilirrubinemia nos cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005.

	Esfregaço sanguíneo (n=195)				PCR (n=60)		
	<i>E. canis</i> n=29	<i>A. platys</i> n=54	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=83	Negativo n=29	<i>E. canis</i> n=13	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> n=2	Negativo n=45
Bilirrubinemia indireta	-	3 5,56%	5 6,02%	2 6,90%	1 7,69%	-	4 8,89%
Bilirrubinemia direta	5 17,24%	8 14,81%	12 14,46%	9 31,03%	1 7,69%	-	9 20,0%

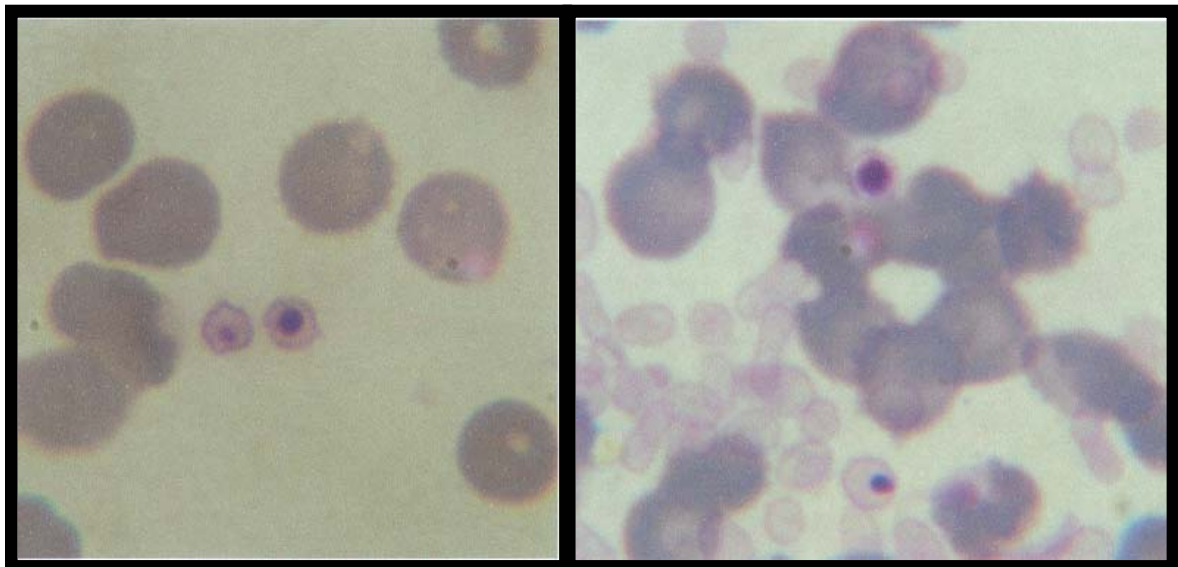
#### 4.5. Diagnóstico Laboratorial

##### 4.5.1. Análise do Esfregaço Sanguíneo

O diagnóstico inicial de ehrlichiose e trombocitopenia cíclica canina foi através da observação de mórulas em leucócitos (Figura 03) e plaquetas (Figura 04) no esfregaço sanguíneo, técnica bastante utilizada nas clínicas e hospitais veterinários do Brasil, pelo pouco tempo necessário assim como, laboratórios de baixo custo.



**Figura 03.** Diagnóstico de *Ehrlichia canis* em monócitos de cães utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo corado. Observa-se presença de mórula com vacúolo bem evidente (A) e mórula sem a evidência de vacúolo (B) (obj. 100 X).



**Figura 04.** Diagnóstico de *Anaplasma platys* em plaquetas de cães utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo corado, observa-se grandes plaquetas com inclusões basofílicas (A e B) (obj. 100 X).

Nos 195 esfregaços obtidos da ponta de orelha, em 48 foram visualizadas inclusões intracitoplasmáticas em leucócitos e 11 em plaquetas. No esfregaço de sangue venoso, em 74 amostras foram visualizadas inclusões em leucócitos e 93 em plaquetas, já nos esfregaços de capa leucocitária, 57 amostras tinham inclusões em leucócitos e 85 em plaquetas (Tabela 14 e 15). Houve diferença estatística significativa entre os três métodos, sendo que os exames do sangue venoso e da capa leucocitária foram mais eficientes que o exame do sangue da ponta de orelha para o diagnóstico de *A. platys*.

**Tabela 14.** Comparação das técnicas dos esfregaços sangüíneos confeccionados de sangue circulante, capa leucocitária e sangue periférico no diagnóstico da infecção por *E. canis*.

Esfregaço	<i>E. canis</i>		
	Positivo	Negativo	% Positivos
Sangue venoso	74	121	37,9
Capa leucocitária	57	138	29,2
Sangue da ponta de orelha	48	147	24,6

$X^2 = 8,42$  (significativo,  $p < 0,05$ )

**Tabela 15.** Comparação das técnicas dos esfregaços sangüíneos confeccionados de sangue circulante, capa leucocitária e sangue periférico no diagnóstico da infecção por *A. platys*.

Esfregaço	<i>A. platys</i>		
	Positivo	Negativo	% Positivos
Sangue venoso	93	102	47,6
Capa leucocitária	85	110	43,5
Sangue da ponta de orelha	11	184	5,6

$X^2 = 95,86$  (significativo,  $p < 0,05$ )

Infecções concomitantes por *Babesia canis*, *Mycoplasma* sp. foram observadas em quatro e onze cães, respectivamente. Não foram verificadas infecções por *Hepatozoon canis*. Outras afecções de diversas origens foram observadas em associação a infecção por *E. canis* e *A. platys*. Estas afecções podem ter influenciado tanto os achados clínicos como hematológicos e bioquímicos.

Para Stockham (2000) a sensibilidade da detecção de agentes ehrlichiais é variável, por exemplo, é rara a observação de mórulas de *E. canis* em sangue periférico. No entanto, em esfregaços de capa leucocitária há maior chance de encontrar células parasitadas, porque mais leucócitos podem ser examinados na

lâmina. Neste estudo, da mesma forma, foi verificado maior número de células parasitadas no esfregaço de capa leucocitária comparativamente ao de sangue de ponta de orelha.

Já Almosny (2002) relata que a observação de mórulas em esfregaços de sangue periférico é indicada a partir da primeira gota de sangue da ponta da orelha, pois nesta há maior número de leucócitos mononucleares em relação à segunda gota, que seria sangue circulante.

Os baixos valores encontrados na técnica de esfregaço de sangue periférico resultaram principalmente de defeitos na confecção das lâminas pela dificuldade na obtenção do sangue, por se tratar de estudo clínico realizado com cães de diferentes índoles e proprietários nem sempre dispostos a cooperar.

O diagnóstico laboratorial de Trombocitopenia Cíclica Canina tem sido feito por observação direta das mórulas de *A. platys* dentro das plaquetas em esfregaços de sangue periférico. No entanto, as mórulas são mais observadas no primeiro episódio trombocitopênico e de forma intermitente, tornando o diagnóstico de trombocitopenia cíclica canina incerto (CHANG & PAN, 1996).

#### 4.5.2. Reação em Cadeia de Polimerase

Através da primeira etapa de PCR das sessenta amostras sanguíneas de animais usando primer universal, foi possível amplificar DNA de *Ehrlichia* sp. em seis amostras, sendo que em três não houve amplificação de DNA na segunda etapa quando usado primer específico para *E. canis* e em uma amostra foi amplificado DNA de *A. platys*. Na segunda etapa, o nested PCR, com primer específico para *E. canis* foram amplificados DNA em 12 amostras sanguíneas das sessenta testadas.

Na primeira e segunda etapa da PCR foram utilizados primers específicos para *A. platys*, sendo que houve amplificação de DNA em duas amostras sanguíneas, apenas no *nested* PCR.

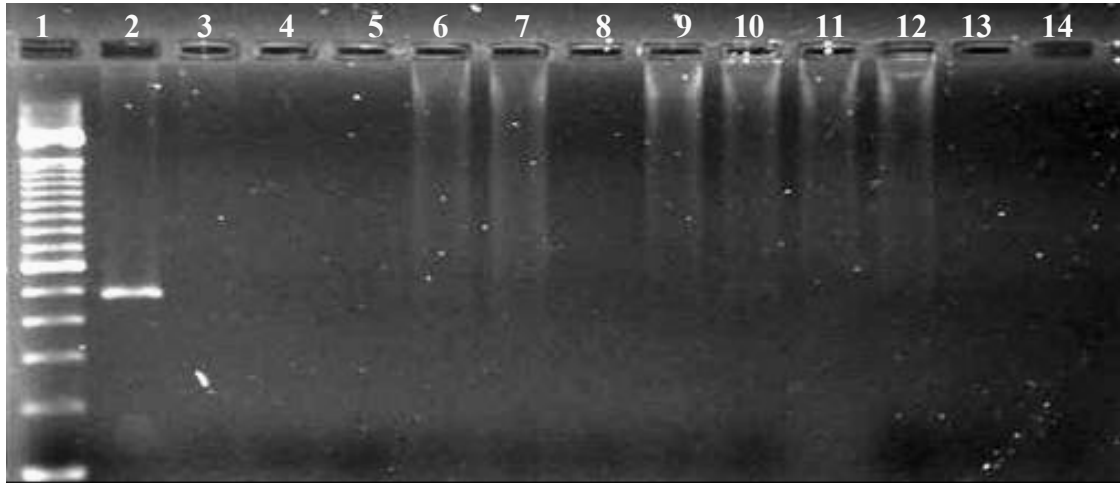
A introdução de técnicas como a PCR, tem aumentado a habilidade para diagnosticar doenças infecciosas, principalmente no que se refere a identificação de espécie de um determinado agente etiológico. A desvantagem da PCR baseada na detecção de DNA é a necessidade de confirmar autenticidade dos produtos amplificados através da “southern blot hibridization”, do sequenciamento de DNA ou da restrição padronizada de clivagem por endonuclease (CHANG & PAN, 1996).

Segundo CHANG & PAN (1996) a *nested* PCR é muito sensível na detecção de *A. platys* no sangue tanto na fase aguda ou crônica da trombocitopenia cíclica canina.

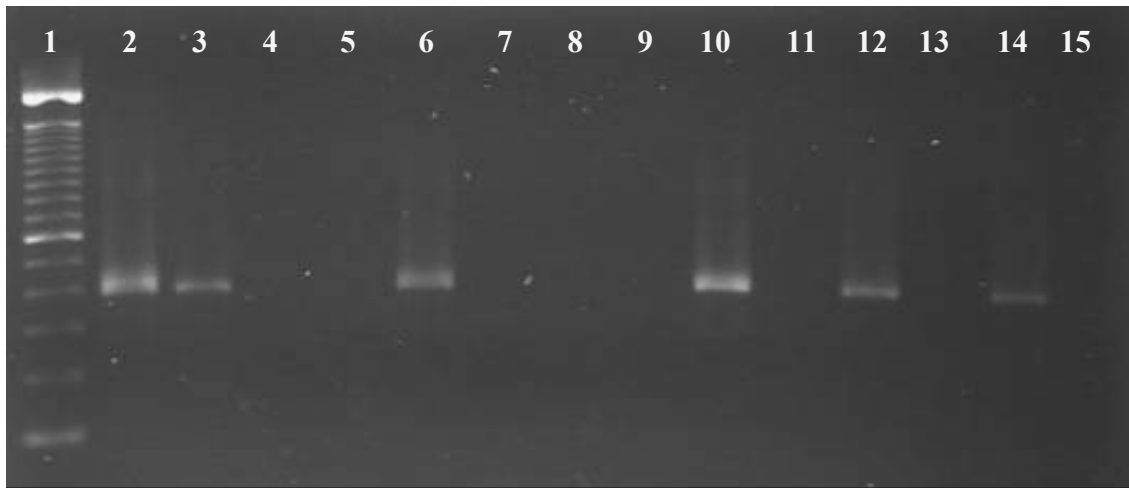
Na Figura 05 pode ser visualizado a foto do gel de agarose da PCR primário para *E. canis*. Observa-se que há presença de arrasto em algumas amostras e apenas uma banda fraca na canaleta 10.

A Figura 06 mostra a foto do gel de agarose contendo o produto da *nested* PCR para *E. canis*, sendo que cinco bandas podem ser nitidamente identificadas.

A Figura 07 mostra a *nested* PCR de *A. platys*, evidenciando-se as duas bandas das amostras que amplificaram com esta técnica.

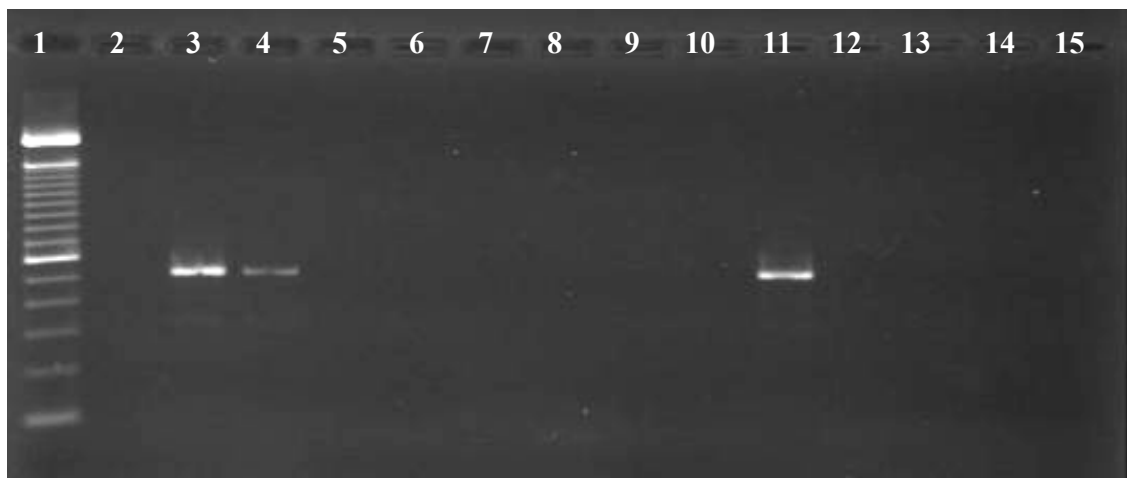


**Figura 05.** PCR de *Ehrlichia canis* com primers ECC/ECB (produto +/- 478 pb) de cães atendidos no HOVET – UFMT; linha 1 - marcador de tamanho molecular (100 pb), linha 2 - controle positivo, linhas 3 a 13 - amostras testadas e linha 14 - controle negativo.



**Figura 06.** Nested PCR de *Ehrlichia canis* com primers ECA/He3 (produto +/- 358 pb) de cães atendidos no HOVET – UFMT, linha 1 - marcador de tamanho molecular (100 pb), linha 2 - controle positivo, linhas 3 a 14 - amostras testadas e linha 15 - controle negativo.





**Figura 07.** *Nested* PCR de *Anaplasma platys* com primers Platys-F/Platys-R (produto 504 pb) de cães atendidos no HOVET – UFMT, linha 1 - marcador de tamanho molecular (100 pb), linha 3 - controle positivo, linhas 4 a 15 - amostras testadas e linha 2 - controle negativo.

A sensibilidade para diagnosticar a infecção por *E. canis* e *A. platys* foi 57,43% e 70,25%, enquanto que a especificidade foi 42,56% e 29,74%, respectivamente, na técnica de esfregaço sangüíneo.

Na PCR, a sensibilidade em confirmar a infecção por *E. canis* e *A. platys* foi igual a 25% e 3,33%, enquanto a especificidade foi de 75% e 96,66%.

Com a comparação das duas técnicas obteve-se o valor preditivo de positividade em 100% para diagnóstico de *A. platys*, em contrapartida o valor preditivo de negatividade igualou-se a 6,66%, do exame de esfregaço sangüíneo em relação à PCR.

O valor preditivo de positividade para diagnóstico de *E. canis* foi igual a 73,33%, enquanto o valor preditivo de negatividade igualou-se a 23,33%.

A técnica de esfregaço sangüíneo é considerada bastante específica e pouco sensível, entretanto, alterações morfológicas nas células que podem ser parasitadas por *E. canis* e *A. platys*, podem gerar confusão durante a leitura na microscopia, especialmente em plaquetas que apresentam granulações densas ou resquícios nucleares de megacariócitos, assemelhando-se a mórula de *A. platys*. Outras inclusões intra-citoplasmáticas em leucócitos também podem gerar dúvida no diagnóstico (MYLONAKIS et al., 2003). Outro fator importante é que mórulas de *E. canis* podem ser observadas em plaquetas como já foi descrito por Almosny (1998), podendo ser confundida com *A. platys* baseando-se na identificação morfológica do agente na célula parasitada.

A PCR apresentou baixa sensibilidade com alta especificidade, principalmente no diagnóstico de *A. platys*, já que o primer utilizado nas duas etapas foi espécie-específico.

A comparação das duas técnicas diagnósticas realizada nas sessenta amostras testadas demonstrou que a técnica do esfregaço sangüíneo apresentou maior sensibilidade e menor especificidade que a PCR, no entanto, esses achados precisam ser analisados com cautela devido ao pequeno número de amostras testadas. Porém, através da PCR pôde-se confirmar a presença de *E. canis* e *A. platys* em cães da região de Cuiabá, Estado do Mato Grosso, Brasil.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo realizado, em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, permitiu concluir que:

- As alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas observadas nos cães com infecção por *E. canis* e *A. platys* são bastante variáveis.

- Os distúrbios hemorrágicos foram mais acentuados nos cães com infecção por *E. canis*, confirmados pela PCR.

- A presença de macroplaquetas foi a principal alteração plaquetária observada.

- A infecção por *E. canis* e *A. platys* não apresentou predisposição com relação a faixa etária e sexo.

- A infecção concomitante de *E. canis* e *A. platys* foi diagnosticada em um maior número de animais, através da observação de formas parasitárias em esfregaços sanguíneos.

- O exame do esfregaço sanguíneo demonstrou maior sensibilidade e menor especificidade que a PCR.

- Novos estudos devem ser desenvolvidos com intuito de verificar outros meios de transmissão de *A. platys*, assim como a existência de outras espécies de *Ehrlichia* na região.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935): avaliação parasitológica, hematológica, bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. Seropédica, 1998. 115p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária, UFRRJ.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. 1 ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, 2002, 135p.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia VIII. Lista e chave para representantes da fauna ixodológica brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v.59, n.2, p.115-129, 1961.

ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in Dogs from Maracaibo, Venezuela: An Ultrastructural Study of Experimental and Natural Infections. *Veterinary Pathology*. v. 40, n. 2, p.149–156, 2003.

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A. WEINSTEIN, S.; KEYSARY A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. *Veterinary Record*, v.138, n. 11, p. 257-259, 1996.

BREITSCHWERDT, E. B. Riquetsioses In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária. Doenças do Cão e do Gato*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 422-429.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; PAPANOTTO, T.; PAES, P. R. O.; LOPES, R. S. Fase aguda da ehrlichiose canina monocítica canina: um estudo retrospectivo de 10 anos. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, v. 2, p. 82- 85, 2004a.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAÚJO 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, 2004b.

CADMAN, H. F.; KELLY, J. P.; MATTHEWMAN, R. Z.; MASON, P. R. Comparison of dot-blot enzyme immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. *Veterinary Record*, v. 135, n. 15, p. 362, 1994.

CARRILLO, B. J.; RESENDE, H. E. B.; MASSARD, C. L. Ehrlichiose canina no estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Rio de Janeiro. *Anais...* p.162, 1976.

CHANG, W. L.; PAN, M. J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimen by two-step PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 4, p. 3142-3146, 1996.

COSTA, J. O.; BATISTA Jr, J. A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M. D. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. *Arquivo da Escola de Veterinária*, v. 25, p. 199-200, 1973.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S.; 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*, v.117, n.4, p.285-290, 2003.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, v. 28, p. 418, 1935.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; 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*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 6, p.2145-2165, 2001.

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

FELEK, S.; GREENE, R.; RIKIHISA, Y. Transcriptional analysis of p30 major outer membrane protein genes of *Ehrlichia canis* in naturally infected ticks and sequence analysis of p30-10 of *E. canis* from diverse geographic regions. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 2, p. 886-888, 2003.

FRENCH, T. W.; HARVEY, J. W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *American Journal. Veterinary Research*, v. 44, n. 12, p. 2407-2411, 1983.

GOULD, D. J.; MURPHY, K. RUDORF, H.; CRISPIN, S. M. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *Journal Small Animal Practice*, v. 41, n. 6, p. 263-265, 2000.

GREENE, C. H.; HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. *Clinical and Microbiology and Infectious disease of dogs and cats*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1984, p. 545-561.

HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A.; ZWANG, E.; BARK, H. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Records*, v. 139, n. 12, p. 290-293, 1996.

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation

of prognostic indicators for the disease. *Veterinary Records*, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.

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

HARRUS, S.; ALLEMAM, A. R.; BARK, H., MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunoabsorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*, v. 86, n. 4, p. 361-368, 2002.

HARVEY, J. W., SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. *Journal Infectious Disease*, v. 137, n. 2, p.182-188, 1978.

HUA, P.; YUHAI, M.; SHIDE, T.; YANG, S.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. *Microbiology and Immunology*, v. 44, n. 9, p. 737-739, 2000.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRAND, P. K.; NIMS, R. M. *Ehrlichia canis* – the causative agent of a hemorrhagic disease of dogs? *Veterinary Record*, v. 85, n. 21, p. 587, 1969.

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

INOKUMA, H. D; OHNO, K.; ONISHI, T; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. *Journal Veterinary Medicine Science*, v.63, n.7, p. 815-817, 2001.

INOKUMA, H. D.; FUJII, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; BEAUFILS, J.; RAOULT, D.; BROUQUI, P.; Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon *groESL* and the Citrate Synthase Gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 5, p. 1132–1136, 2002.

IQBQAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Compararison of PCR with other tests for early diagnosis of canine erlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* , v. 32, n. 7, p.1658-1662, 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. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

KAMINJOLO, J. S.; NYINDO, M. B. A.; SAYER, P. D.; RURANGIRWA, F.; JOHNSON, L. W.; HIRD, S. F.; ROSENBAUM, E. MAXIE, L. L. S.; OGAA, J. S. Identificacion of *Ehrlichia canis* in East Africa. *Veterinary Record*, v. 99, n. 22, p. 434-435, 1976.

KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.

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 Record*, v. 134, n. 15, p. 382, 1994.

KEYSARY, A.; WANER, T.; ROSNER, M.; WARNER, C. K.; DAWSON, J. E.; ZASS, R.; BIGGIE, K. L.; HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation and genetic caracterizacion of *Ehrlichia canis* in Israel. *Veterinay Parasitology*, v.62, n.3-4, p.331-340, 1996.

KNOWLES, T. T. Characterization of the major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* and its application for serodiagnosis of ehrlichiosis. 2002. 48p. Tese (Mestrado) - UNIVERSITY OF FLORIDA, 2002.

MACEDO, A. B.; LEAL, E. R. V. Ehrlichiose canina: estudo retrospectivo e principais achados hematológicos. *Revista Nosso Clínico*, v.8, n.45, p.30-34, 2005.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F. Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in Northeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.11, p.2857-2860, 1993.

MATTHEWMAN, L. A.; KELLY, P. J.; BOBADE, P. A.; TAGWIRA, M.; MASON, P. R.; MAJOK, A.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in dogs in Zimbabwe. *Veterinary Record*, v. 133, n. 14, p. 344-346, 1993.

McDADE, J. E.; Ehrlichiosis – a disease of animals and humans. *Journal Infectious Disease*, v. 161, n. 4, p. 609-617, 1990.

MEYER, D. J. M.; COLES, E. H.; RICH, L. J. *Medicina de laboratório veterinário. Interpretação e diagnóstico*. 1 ed. São Paulo: Editora Roca, 1995, 295p.

MOORE, F. M.; BENDER, H. S. Neutropenia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKE, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm`s Veterinary Hematology*. 5 ed. Canadá: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 350-355.

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

- MUTANI, A.; KAMIJOLO, 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, 2001.
- MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOV, A. Evaluation of citology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.
- NYINDO, M. B. A.; RISTIC, M.; HUXOLL, D. L.; SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent – *Ehrlichia canis*. *American Journal Veterinary Research*, v. 32, n. 11, p. 1651- 1658, 1971.
- RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Review.*, v. 4, n. 3, p. 286-308, 1991.
- RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C.; SIREGAR, A. G.; PASARIBU, F. H.; MALOLE, M. B. Analyses of *Ehrlichia canis* and ac canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 1, p.143-148, 1992.
- RUSSEL, K. E.; GRINDEM, C. B. Secondary Trombocytopenia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKE, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm`s Veterinary Hematology*. 5 ed. Canadá: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 487-495.
- SIMPSON, R. M.; GAUNT, S. D.; HAIR, J. A.; KOCAN, K. M.; HENK, W. G.; CASEY, H. W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *American Journal Veterinary Research*, v. 52, n. 9s, p. 1537-1541, 1991.
- 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 Veterinary Research*, v. 37, n. 2, p. 119-126, 1976.
- STOCKHAM, S. L. Hematologic changes due to bacterial infections. In: FELDMAN, B. F.; ZINKE, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm`s Veterinary Hematology*. 5 ed. Canadá: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 38-43.
- SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S. I.; BREITSCHWERDT, E. B. Coinfection with Three *Ehrlichia* Species in Dogs from Thailand and Venezuela with Emphasis on Consideration of 16S Ribosomal DNA Secondary Structure . *Journal of Clinical. Microbiology*. v. 39, n. 1, p. 90-93, 2001.
- SUMMER, J. W.; NICHOLSON, W. L.; MASSUNG, R. F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. *Journal of Clinical. Microbiology*, v. 35, n. 8, p. 2087-2092, 1997.



TORRES, H. M. Isolamento e propagação de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. 2002. 63p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

VARELA, A.S. *Tick-borne Ehrlichiae and Rickettsiae of dogs*. In: BOWMAN, D. D. *Companion and Exotic Animal Parasitology*. 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 6 abr. 2004.

WANER, T.; HARRUS, S. *Canine monocytic ehrlichiosis (CME)* In: *Recent Advances in Canine Infectious Disease*. 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 08 jan. 2005.

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

WEISS, D. J. Aplastic Anemia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKE, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5 ed. Canadá: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 212-215.

## ANEXO I



### FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO Prof<sup>a</sup>. Valéria Régia Franco Sousa

Data:

NPP:

#### Identificação do proprietário

Nome:

Fone:

Rua:

N°:

Bairro:

Cidade:

#### Identificação do animal

Nome:

Sexo:

Idade:

Raça:

Porte:

#### Dados demográficos

Qual origem dos cães?

nasceu e vive em  
Cuiabá

vive em Cuiabá no  
momento

vive em outro local:

Reside em:

apartamento  
sempre

casa na zona  
urbana

sítio – zona rural

esporadicamente vai a zona  
rural

Infecção por carrapatos?

tem atualmente

já teve

nunca observou

#### Exame físico

Sinais clínicos observados:

sem alterações clínicas

claudicação (poliartrite)

apatia

alterações nervosas: \_\_\_\_\_

anorexia

alterações oftálmicas: \_\_\_\_\_

pirexia

alterações digestivas: \_\_\_\_\_

linfadenopatia

alterações respiratórias: \_\_\_\_\_

esplenomegalia

alterações urinárias: \_\_\_\_\_

perda de peso

outros: \_\_\_\_\_