

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

TESE

Protocolos Terapêuticos no Tratamento da Eriquiose Monocítica Canina

Felipe Delorme Azevedo

2012



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

**PROTOCOLOS TERAPÊUTICOS NO TRATAMENTO DA
ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA**

FELIPE DELORME AZEVEDO

Sob a Orientação do Professor
Fabio Barbour Scott

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, área de
concentração Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Março de 2012

636.70896922

A994p

T

Azevedo, Felipe Delorme, 1978-

Protocolos terapêuticos no tratamento da
Erliquiose monocítica canina / Felipe
Delorme Azevedo. - 2012.

76 f.: il.

Orientador: Fábio Barbour Scott.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 40-50.

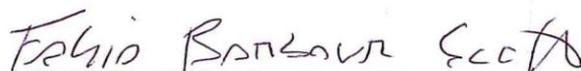
1. Cão - Doenças - Teses. 2. Cão -
Doenças - Tratamento - Teses. 3. Erliquiose
- Tratamento - Teses. 4. Ehrlichia canis -
Teses. 5. Tetraciclina - Teses I. Scott,
Fábio Barbour, 1966- II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

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

FELIPE DELORME AZEVEDO

Tese submetida com requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração Sanidade Animal.

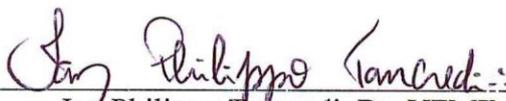
TESE APROVADA EM 30 / 03 / 2012.



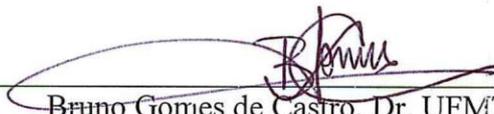
Fábio Barbour Scott, Dr., UFRRJ
(Orientador)



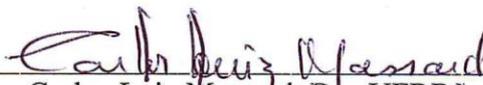
Isabella Vilhena Freire Martins, Dr. UFES



Ian Philippo Tancredi, Dr. UFMT



Bruno Gomes de Castro, Dr. UFMT



Carlos Luiz Massard, Dr.. UFRRJ



Cristiane Divan Baldani, Dr. UFRRJ

A minha mulher Thaís, ao meu filho Bernardo
e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À minha mulher Thaís Ribeiro Correia Azevedo, que esta sempre ao meu lado e que me deu minha maior alegria na vida que é o nosso filho;

Ao meu filho Bernardo que chegou a minha vida para trazer-me sentimentos que jamais imaginei, TE AMO, MEU FILHO!

Ao meu amigo e orientador Dr. Fabio Barbour Scott por me incentivar e ajudar no crescimento profissional;

Ao amigo Médico Veterinário João Carlos Sena Maia por seus ensinamentos e principalmente pela confiança que sempre depositou em minha pessoa;

Ao professor Dr. Douglas McIntosh por todo o aprendizado passado e ajuda na execução das análises moleculares;

A todos os colegas do Hospital Veterinário da UFRRJ, em especial ao amigo Cristiano Chaves Pessoa da Veiga pelo convívio agradável que vocês proporcionam;

Ao Prof. Huarrison Azevedo Santos pelo conhecimento e apoio passado;

Ao amigo Guilherme Gomes Verocai que mesmo a distância estava sempre ajudando, me enviando trabalhos e pela ajuda no inglês;

A Monique Moraes Lambert, Ary Elias Abud Dutra, Pedro Ivan Fazio Junior, Fabrício Nascimento Gaudêncio, Maria Clara Negreiros da Silva Botelho, Milena Batista Carneiro, Diego Dias da Silva, Lilian Cristina de Oliveira Batista, Pedro Vianna Tavares, Elizabeth Cristina Ferreira dos Santos, Cássio Nascimento Florêncio, Alexsandro Luiz dos Santos, Cristiane Coelho Nunes, Juliana Braga e demais bolsistas e estagiários do LQEPV por todo apoio prestado na execução desse experimento;

Aos colegas Aline Pereira e Bruno Machado Fontes pelo apoio estatístico;

Ao técnico José Cláudio Satler de Andrade;

Aos tratadores dos animais do LQEPV;

A CAPES e a FAPUR pelos auxílios financeiros;

BIOGRAFIA

Felipe Delorme Azevedo, nascido no Rio de Janeiro em 23 de fevereiro de 1978, filho de Regina Lys Delorme Azevedo e Aloysio Sérgio Fagundes de Azevedo, cursou o 1º e o 2º grau no Colégio Marista São José, na Tijuca, Rio de Janeiro, formando em 1995. Foi aprovado no vestibular para Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 1996, cursando a mesma no período de 1996 a 2001. Durante a graduação foi monitor das disciplinas de Radiodiagnóstico e Técnicas Radiográficas do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, durante três semestres. Após sua graduação em 2001, atuou como médico veterinário autônomo nas áreas de clínica médica geral e em centros de diagnóstico por imagem, trabalhando na área de radiologia veterinária. Foi responsável pelo setor de radiologia do Instituto Veterinário de Diagnóstico (IVD), localizado em Teresópolis, Rio de Janeiro, no período de 2001 a 2004. Em 2003 ingressou no Programa de Residência em Medicina Veterinária do Hospital Veterinário da UFRRJ onde atuou como médico veterinário residente, nos níveis R1 (um ano) e R2 (dois anos), nas áreas de clínica médica geral e radiologia veterinária no período de 2002 a 2006. Em 2005 atuou como professor temporário da disciplina de Diagnóstico por Imagem, do Centro Universitário Serra dos Órgãos, UNIFESO, Teresópolis, RJ. Em 2006 foi selecionado e ingressou no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, para cursar o mestrado, foi bolsista CAPES e defendeu sua dissertação em fevereiro de 2008. Durante a execução do mestrado foi aprovado em concurso público para professor substituto da UFRRJ, onde atuou como professor das disciplinas de Radiodiagnóstico e Técnicas Radiográficas, no período de 2006 a 2008. Em 2007 ingressou no curso de especialização *Latu sensu* em Diagnóstico por Imagem do convênio Universidade Anhembi Morumbi – SP / ANCLIVEPA-SP e concluiu a mesma em 2009. Em 2008 foi aprovado para ingressar no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ para realização de Doutorado, na área de Sanidade Animal, sendo selecionado como bolsista do programa REUNI. Em 2008 foi aprovado em concurso público para médico veterinário da UFRRJ, onde ingressou em agosto de 2008 para uma jornada de trabalho de 20 horas semanais no Hospital Veterinário (HV). No período de 2008 a 2012 atuou como professor do Centro Superior de Ensino de Valença, na Faculdade de Medicina Veterinária, ministrando as disciplinas de Diagnóstico por Imagem, Introdução à Medicina Veterinária e Odontologia Veterinária. Em 2010 foi nomeado Vice-Diretor do Hospital Veterinário da UFRRJ, cargo que ocupa até esta data. Em 2010 assumiu uma jornada de trabalho de 40 horas semanais. Atualmente é Coordenador do Programa de Residência em Medicina Veterinária do HV da UFRRJ e membro efetivo da Comissão de Residência Médico Veterinária do HV – UFRRJ. Também é membro do Núcleo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão em Medicina Veterinária da UFRRJ.

RESUMO

AZEVEDO, Felipe Delorme. **Protocolos terapêuticos no tratamento da erliquiose monocítica canina**. 2012. 63p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A bactéria *Ehrlichia canis* acomete principalmente os cães, no entanto, pode infectar o homem. Nos cães é causador da erliquiose monocítica canina, uma hemoparasitose muito comum na prática veterinária, que pode ocorrer de forma aguda, subclínica ou crônica, determinando manifestações clínicas diversas. A fase crônica da doença, comumente leva o animal ao óbito. É transmitida pelo carrapato vetor, *Rhipicephalus sanguineus* e coinfeções com outros hemoparasitos são comumente observadas. No Brasil, a erliquiose monocítica canina é a mais frequente hemoparasitose riquetsial, no entanto, a trombocitopenia cíclica canina (*Anaplasma platys*) e, mais recentemente, a anaplasmose granulocítica canina (*Anaplasma phagocitophilum*) têm sido comumente relatadas. A terapêutica destas enfermidades se faz com o uso de antibióticos, sendo a doxiciclina o fármaco de eleição. No Brasil, seu uso é comumente realizado duas vezes ao dia, durante 21 dias, na dose de 10mg/kg, o que demanda tempo e dedicação por parte dos proprietários. Portanto, o regime de administração do medicamento a cada 12 horas, por vezes, é um fator complicador. Sendo assim, diferentes protocolos terapêuticos foram avaliados neste trabalho, a fim de estabelecer protocolos que pudessem facilitar o tratamento dos animais. Um total de 51 cães, naturalmente infectados por *E. canis*, sendo 18 com coinfeção por *A. platys*, confirmados por exames moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram submetidos a cinco regimes terapêuticos distintos: azitromicina 10 mg/kg via oral (VO) SID por 28 dias; enrofloxacino 10 mg/kg VO SID por 28 dias; dipropionato de imidocarb 5mg/kg SC 2 aplicações com intervalo de 14 dias; doxiciclina 20mg/kg VO SID por 28 dias e oxitetraciclina LA 20mg/kg IM 4 vezes com intervalos de 7 dias. Os animais foram monitorados semanalmente por meio de exames de sangue completos. Amostras de sangue periférico foram submetidas a PCR depois do tratamento. Os achados laboratoriais significativamente importantes no curso desta enfermidade foram anemia, trombocitopenia e leucopenia. Os mesmos foram excelentes parâmetros na avaliação da resposta ao tratamento, pois estes se encontravam abaixo da normalidade em decorrência da doença e após o tratamento voltaram aos valores de referência de forma significativa ($p \leq 0,05$). A eficácia do tratamento com doxiciclina (20mg/Kg VO SID por 28 dias) e com oxitetraciclina de longa ação (LA) (20mg/Kg IM a cada 7 dias por 28 dias) foi comprovada através de ensaios de PCR, associados a normalização dos parâmetros hematológicos. Entretanto, os resultados evidenciaram uma falha na tentativa de tratar os animais com enrofloxacino, azitromicina e dipropionato de imidocarb, num regime de sete dias. Elevações significativas nos valores da alanina aminotransferase (ALT) e da ureia nos animais tratados com oxitetraciclina podem indicar a toxicidade deste fármaco para os cães a longo prazo. Portanto concluiu-se que a doxiciclina e a oxitetraciclina LA foram eficazes no tratamento da erliquiose monocítica canina, bem como no tratamento da trombocitopenia cíclica infecciosa canina.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, PCR, tetraciclina.

ABSTRACT

AZEVEDO, Felipe Delorme. **Treatment protocols for canine monocytic ehrlichiosis.** 2012. 63p. Tese (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The bacterium *Ehrlichia canis* affects mainly dogs, but can also infect humans. In dogs, it is the causative agent of the canine monocytic ehrlichiosis, a very common disease in veterinary practice, which may present as an acute, subclinical or chronic disease and can determine different clinical manifestations. In its chronic form often leads the animal to death. It is transmitted by the tick vector, *Rhipicephalus sanguineus* and co-infections with others hemoparasites are commonly observed. In Brazil, the canine monocytic ehrlichiosis is the most frequent hemoparasitosis, however canine infectious cyclic thrombocytopenia (*Anaplasma platys*) and more recently canine granulocytic anaplasmosis (*Anaplasma phagocitophilum*) have been reported. The treatment is based in antibiotics, and doxycycline is the first choice drug. In Brazil, it is used twice a day for three weeks (10 mg/kg), which requires time and dedication from dog's owners. The drug administration every 12 hours is often a complicating factor, and therefore different treatment protocols were herein evaluated in order to establish protocols that can facilitate the treatment of the animals. A total of 51 dogs naturally infected with *E.canis*, where 18 were co-infected with *A. platys*, confirmed by polymerase chain reaction (PCR) were treated with five distinct treatment protocols: Azithromycin 10 mg/kg orally every 24 hours for 28 days; enrofloxacin 10 mg/kg orally every 24 hours for 28 days; imidocarb dipropionate 5mg/kg SC, administered twice with a 14-day interval; doxycycline 20mg/kg orally every 24 hours for 28 days and long-acting oxytetracycline 20mg/kg intramuscular, administered four times with a 7-day interval. Animals were monitored weekly by complete blood tests. Peripheral blood samples were collected to perform PCR after treatment. Laboratorial findings related with this disease were: anemia, thrombocytopenia and leukopenia. These were good parameters for evaluating treatment response, since all showed values lower than normal levels before treatment and have returned to normal levels after the treatment, with significance ($p \leq 0.05$). Treatment with doxycycline (20mg/kg PO SID 28 days) and with long-acting oxytetracycline (20mg/kg intramuscularly with 7 days intervals until 28 days) were effective, confirmed by PCR, in association with the normalization of hematologic parameters. However, the results showed a failure in attempt to treat the ehrlichiosis with enrofloxacin, imidocarb dipropionate and azithromycin using a seven day protocol. Significant high values of alanine transaminase (ALT) and urea in dogs treated with oxytetracycline can suggest toxicity of this drug for dogs. Therefore we could conclude that doxycycline and the long-acting oxytetracycline were effective in the treatment of canine monocytic ehrlichiosis as well as in the treatment of canine infectious cyclic thrombocytopenia.

Key words: *Ehrlichia canis*, PCR, tetracyclines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo terapêutico empregado em cada grupo, para tratamento da erliquiose monocítica canina	15
Tabela 2. Resultado da PCR para <i>Ehrlichia canis</i> e valores hematimétricos, bioquímicos e contagem plaquetária dos dois animais do Grupo C (dipropionato de imidocarb) que vieram a óbito durante o estudo.....	17
Tabela 3. Resultado das reações de PCR, para família Anaplasmataceae e para as espécies <i>Anaplasma platys</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>Ehrlichia canis</i> nos diferentes grupos, antes e depois do tratamento.....	23
Tabela 4. Resultado das avaliações dos esfregaços sanguíneos frente à presença de inclusões celulares de hemoparasitos da família Anaplasmataceae, antes e ao fim do tratamento.	26
Tabela 5. Média dos valores do hematócrito, hemácias, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento	29
Tabela 6. Média dos valores da hemoglobina e da hemoglobina corpuscular média (HCM) dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento	30
Tabela 7. Média dos valores da contagem de plaquetas e dos leucócitos totais dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.....	31
Tabela 8. Média dos valores da fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamyl-transferase (GGT) dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.....	34
Tabela 9. Média dos valores da concentração sérica de ureia e creatinina dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.....	35
Tabela 10. Média dos valores da concentração sérica da creatinina quinase dos animais tratados com oxitetraciclina, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Últimas duas diluições do DNA controle positivo de cada espécie, que amplificaram para cada ensaio de PCR realizado.	19
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 0,8% corada com Brometo de Etídeo com material extraído das amostras demonstrando a adequada extração de DNA. Canaletas 1-24 = Amostras; $\lambda 1$ = lambda DNA 150ng, $\lambda 2$ = lambda DNA 100ng, $\lambda 3$ = lambda DNA 50ng..... 18

Figura 2. Fotografia negativa de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo. A1=água (controle negativo ambiental), A2=100pg, A3=10pg, A4=1pg, A5=100fg, A6=10fg, A7=1fg A8=água (controle negativo da mistura – com extravasamento de material do poço adjacente); B2=100pg, B3=10pg, B4=1pg, B5=100fg, B6=10fg, B1=1fg, B7=água (controle negativo da mistura); C2=100pg, C3=10pg, C4=1pg, C5=100fg, C6=10fg, C1=1fg, C7= água (controle negativo da mistura); D2=100pg, D3=10pg, D4=1pg, D5=100fg, D6=10fg, D1=1fg, D7=água (controle negativo da mistura). M= marcador 50-2000 pares de base 20

Figura 3. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo evidenciando amostras positivas e negativas na reação de PCR (354pb) para a família Anaplasmataceae. Canaleta C1=água (controle negativo da mistura), 1-24 = amostras de DNA estudadas. C2=água (controle negativo ambiental), + = controle positivo (*E. canis* 535 diluição de 10^{-1}). M=marcador de peso molecular 100pb - Invitrogen (Cat No. 15628-019)..... 20

Figura 4. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo evidenciando amostras positivas e negativa na reação de PCR (843pb) para *Ehrlichia canis*. C1=água (controle negativo da mistura); 1-25=amostras analisadas; C2=água (controle negativo ambiental); +1=controle positivo (sem diluição 10^0); +2 controle positivo (diluição de 10^{-1}); M=marcador 50-2000 pb (Invitrogen) 21

Figura 5. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo evidenciando amostras negativas na reação de PCR (334pb) para *Anaplasma phagocytophilum*. C1=água (controle negativo da mistura), 1-25=amostras testadas, C2=água (controle negativo ambiental), +1=controle positivo (diluição de 10^{-1}), +2 controle positivo (diluição de 10^{-2}); M=marcador 50-2000pb (Invitrogen)..... 21

Figura 6. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo evidenciando amostras positivas e negativas na reação de PCR para *Anaplasma platys*. C1=água(controle negativo da mistura), 1-24=amostras testadas. C2=água (controle negativo ambiental), +1=controle positivo (diluição de 10^{-2}), +2=controle positivo (diluição de 10^{-3}); M=marcador 50-2000bp (Invitrogen). Amplicons de 678pb indicados pela seta preta (▲) e amplicons inespecíficos ligeiramente menores indicados pela seta branca..... 22

Figura 7. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo evidenciando as amostras (11 - 94) reavaliadas na PCR para *Anaplasma platys*. C1 e C2 = água (controles negativos). + = controle positivo (DNA de *A. platys*). A posição das ampliações verdadeiras (678 pb) esta indicada pela seta preta (lado direito). Produtos de menor tamanho (amplificações inespecíficas) indicado pela seta branca (lado esquerdo) 22

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

BID	<i>(bis in die)</i> – Duas vezes ao dia
IM	Intramuscular
LQEPV	Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
QID	<i>(quater in die)</i> – Quatro vezes ao dia
SID	<i>(simel in die)</i> – Uma vez ao dia
TID	<i>(ter in die)</i> – Três vezes ao dia
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VO	Via oral
<i>AD LIBITUM</i>	À vontade
PCR	Polymerase Chain Reaction / Reação em cadeia da polimerase
SC	Subcutâneo
TTPA	Tempo da tromboplastina parcial ativada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Hemoparasitoses Riquetsiais	2
2.2. Erliquiose	2
2.2.1 <i>Ehrlichia canis</i>	3
2.2.1.1 Manifestações clínicas de <i>Ehrlichia canis</i>	3
2.2.1.2 Diagnóstico de <i>E. canis</i>	4
2.2.1.3 Tratamento da erliquiose monocítica canina	6
2.2.2 <i>Ehrlichia ewingii</i>	7
2.3 Anaplasnose	7
2.3.1 <i>Anaplasma platys</i>	7
2.3.1.1 Manifestações clínicas de <i>Anaplasma platys</i>	7
2.3.1.2 Diagnóstico de <i>Anaplasma platys</i>	8
2.3.1.3 Tratamento da trombocitopenia cíclica infecciosa canina	8
2.3.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	9
2.3.2.1 Manifestações clínicas do <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	9
2.3.2.2 Diagnóstico de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	10
2.3.2.3 Tratamento da anaplasnose granulocítica canina	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Localização do Experimento	11
3.2 Seleção dos Animais e Divisão dos Grupos Experimentais	11
3.3 Obtenção das Amostras Sanguíneas	11
3.4 Exames Hematológicos	12
3.4.1 Hemograma completo	12
3.4.2 Bioquímica sérica	12
3.5 Extração do Material Genômico (DNA) da Capa Leucocitária	12
3.6 PCR do DNA Extraído	12
3.6.1 Determinação do limite de detecção	13
3.6.2 Ensaios de PCR utilizados na detecção dos agentes	13
3.6.2.1 PCR para Família Anaplasmataceae	13
3.6.2.2 PCR específicas para <i>Anaplasma platys</i>	14
3.6.2.3 PCR específicas para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	14
3.6.2.4 PCR específicas para <i>Ehrlichia canis</i>	14
3.6.3 Controle negativo das PCR	15
3.7 Protocolos Terapêuticos	15
3.8 Análises Estatísticas	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 PCR	18
4.1.1 Avaliação da qualidade do DNA	18
4.1.2 Limites de detecção dos controles positivos	19
4.1.3 Limite de detecção usando amplicon como alvo	19
4.1.4 Detecção de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ; <i>Anaplasma platys</i> e <i>Ehrlichia canis</i>	19
4.2 Hematologia	25
4.2.1 Exame direto através de esfregaço sanguíneo	25
4.2.2 Hematimetria	27

4.2.3 Leucometria e plaquetometria	28
4.2.4 Bioquímica sérica	32
4.3 Eficácia dos Tratamentos	37
5 CONCLUSÕES.....	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7 ANEXOS	51
Anexo A – Tampão para Eletroforese TAE (10X).....	51
Anexo B – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo A (azitromicina), antes do tratamento	52
Anexo C – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo A (azitromicina), após sete dias de tratamento	53
Anexo D – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo B (enrofloxacino), antes do tratamento	54
Anexo E – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo B (enrofloxacino), após sete dias de tratamento	55
Anexo F – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo c (dipropionato de imidocarb), antes do tratamento	56
Anexo G – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo C (dipropionato de imidocarb), após sete dias de tratamento	57
Anexo H – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo D (doxiciclina), antes do tratamento	58
Anexo I – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo D (doxiciclina), após sete dias de tratamento	59
Anexo J – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo D (doxiciclina), após 28 dias de tratamento.....	60
Anexo K – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo E (oxitetraciclina LA), antes do tratamento	61
Anexo L – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo E (oxitetraciclina LA), após sete dias de tratamento.....	62
Anexo M – Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo E (oxitetraciclina LA), após 28 dias de tratamento	63

1 INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses são importantes enfermidades em medicina veterinária que acometem diferentes espécies animais, inclusive o homem, determinando assim um problema de saúde pública.

Dentre as hemoparasitoses mais importantes nos cães, destaca-se a erliquiose monocítica canina. Mesmo com a grande atenção dada a esta enfermidade, a erliquiose canina ainda é uma das mais comuns enfermidades encontradas nos consultórios/hospitais veterinários. Outra hemoparasitose corriqueiramente encontrada nos cães é a anaplasiose, principalmente a trombocitopenia cíclica canina.

Vários fatores favorecem à alta prevalência dessas enfermidades, como exemplo, a falta de diagnóstico preciso destas doenças, dificuldades no controle dos vetores, terapêutica inadequada, entre outros. O baixo poder aquisitivo dos proprietários torna muitas vezes o acesso a testes específicos difícil, levando ao médico veterinário tratar de forma empírica, baseados em seu conhecimento epidemiológico e nas manifestações clínicas apresentadas pelos animais.

A terapêutica destas enfermidades por muitas vezes não é empregada de forma adequada. A facilidade de acesso a medicamentos veterinários muitas vezes culminam com sua utilização de forma inadequada por muitos proprietários. Outro aspecto com relação à terapêutica é que o protocolo utilizado pela maioria dos médicos veterinários no Brasil para a droga de eleição (Doxiciclina - 10 mg/kg, por via oral, duas vezes ao dia por 21 dias), é longo e depende de dedicação e disponibilidade de tempo para um tratamento eficaz.

Outro fator muito importante é com relação ao carrapato vetor, os quais existem em abundância em diversas partes do mundo, não sendo diferente no Brasil onde inclusive por ser um país de clima tropical, favorece a presença destes. Portanto, o controle dos carrapatos a fim de se evitar essas e outras doenças por eles transmitidas é extremamente importante. No entanto, as estratégias de controle muitas vezes falham devido à falta de conhecimento adequado e às dificuldades e negligências envolvidas.

Durante as atividades no canil experimental do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) – Departamento de Parasitologia Animal - Instituto de Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), o qual é um centro voltado principalmente ao estudo de medicamentos antiparasitários com grande desafio frente à infestação de carrapatos, percebeu-se uma alta prevalência de animais com trombocitopenia causada por riquetsias.

Devido às condições de horário de uso das instalações e frente ao elevado número de animais mantidos no canil, a terapêutica usualmente utilizada com doxiciclina administrada duas vezes ao dia, torna o tratamento destas hemoparasitoses muitas vezes uma problemática.

Frente a esta situação, o objetivo do trabalho foi comparar a eficácia de diferentes protocolos terapêuticos, no tratamento da erliquiose monocítica canina, causada por *Ehrlichia canis*, e de possíveis coinfeções por espécies de *Anaplasma* spp., a fim de avaliar a eficácia de outras drogas que possam ser empregadas na rotina clínica, facilitando o manejo terapêutico no combate a esta enfermidade. E apesar de ser uma tentativa de resolver um problema específico do canil em questão, o autor acredita que com os resultados obtidos, estes possam ser extrapolados a outros canis e até mesmo a rotina médica veterinária diversa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemoparasitoses Riquetsiais

As hemoparasitoses nos cães são enfermidades que podem ser causadas por diferentes agentes etiológicos, são transmitidas por vetores hematófagos e são muito frequentes na rotina médico-veterinária (SALGADO, 2006). No Brasil os principais hemoparasitos de cães são: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis* e *Mycoplasma haemocanis* (COSTA-JUNIOR, 2007).

Dentre as hemoparasitoses causadas por riquetsias podemos citar a erliquiose e a anaplasmose, que são causadas pelas bactérias Gram-negativas *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. (DUMLER et al., 2001).

Devido aos avanços nas técnicas moleculares, diversos estudos têm sido realizados a fim de classificar taxonomicamente os parasitos. Em 2001, Dumler e colaboradores (2001) reclassificaram a família Anaplasmataceae, incluindo aí os gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*. As espécies que compõem o gênero *Ehrlichia* são: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (*Cowdria ruminantium*) e as espécies do gênero *Anaplasma* são *A. bovis* (*E. bovis*), *A. platys* (*E. platys*), *A. phagocytophilum* (*E. phagocytophil.*; *E. equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana, assim denominado) e *A. marginale* (DUMLER et al, 2001).

2.2 Erliquiose

A erliquiose é uma doença causada por diferentes espécies de bactérias, obrigatoriamente intracelulares, gram-negativas, pertencentes à família Anaplasmataceae, do gênero *Ehrlichia* (DUMLER et al., 2001).

É uma rickettsia que foi primeiramente descrita por Donatien and Lestoquard (1935). Mais tarde, nos anos 70, essa doença ganhou destaque durante a guerra do Vietnã, quando muitos cães de guerra Americanos morreram devido a esta doença (HUXSOLL et al., 1970).

No Brasil, já foi relatada a ocorrência de *E. canis* em cão (COSTA et al., 1973), *E. chaffeensis* em cervos-do-pantanal (MACHADO et al., 2006) e *E. ewingii* em cães (OLIVEIRA et al., 2009). Alguns trabalhos sugerem a presença de *E. chaffeensis* acometendo o homem no Brasil (CALIC et al., 2004; COSTA et al 2006)

A bactéria *E. canis* (cão) é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2008), *E. ruminantium* (bovino) por carrapatos do gênero *Amblyomma*, *E. chaffeensis* (cervídeos) e *E. ewingii* (homem e cão) por *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis* (DUMLER et al., 2001; YABSLEY, 2010) e *E. muris* (roedor) por *Haemaphysalis flava* e *Ixodes persulcatus* (INOKUMA et al., 2007; VIEIRA et al., 2011).

De acordo com Costa-Junior e colaboradores (2007), o carrapato *A. cajennense* foi sugerido como um possível vetor de *E. canis* em áreas rurais de Minas Gerais, Brasil.

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* pode transmitir *E. canis* de forma transestadial, mas não é capaz de transmitir por via transovariana (GROVES et al., 1975).

O agente causador da erliquiose monocítica canina é a bactéria *E. canis*, e esta é uma doença potencialmente fatal (SHAW et al., 2001; TENG et al., 2003). *E. chaffeensis* e *E. ewingii* causam respectivamente a erliquiose monocitotrófica humana e a erliquiose granulocítica humana ou canina (NDIP et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009).

2.2.1 *Ehrlichia canis*

Tem distribuição mundial, principalmente em áreas de clima tropical e subtropical (IQBAL et al., 1994) e sua ocorrência acompanhou a disseminação do *R. sanguineus* (SHAW et al., 2001; LABRUNA et al., 2007), que é maior durante o verão (HARRUS et al., 1997b; SHIPOV et al., 2008), quando o carrapato vetor está mais ativo (HARRUS; WANER, 2011).

Alguns autores relatam *E. canis* como agente zoonótico, que podem causar infecções assintomáticas e sintomáticas em humanos (PEREZ et al., 1996, 2006)

São bactérias gram-negativas de parasitismo intracelular obrigatório, que infectam preferencialmente monócitos (DUMLER et al., 2001).

No Brasil *E. canis* foi primeiramente diagnosticado em 1973 na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais, em um cão naturalmente infectado que apresentava inclusões em linfócitos (COSTA et al., 1973).

Estudos em algumas regiões do Brasil demonstraram soroprevalência de *E. canis* em cães, que varia de 1,7% a 44,7% (LABARTHE et al., 2003; COSTA-JUNIOR, 2007; CARLOS et al., 2011). Maiores soropositividades geralmente estão relacionadas a áreas peri-urbanas, devido à maior exposição ao carrapato vetor (CARLOS et al., 2011).

Não existe predileção por sexo nem idade (M'GHIRBI et al., 2009), no entanto, alguns autores sugerem o Pastor Alemão como uma raça mais sensível (HARRUS et al., 1997b).

A erliquiose monocítica canina possui algumas sinônimas descritas na literatura, tais como: pancitopenia tropical canina, erliquiose monocitotrófica canina, riquetsiose canina, doença dos cães rastreadores, febre hemorrágica canina, tifo canina do carrapato, desordem hemorrágica de Nairobi (HUXSOLL et al., 1970; WANER; HARRUS, 2000; HARRUS; WANER, 2011).

2.2.1.1 Manifestações clínicas de *Ehrlichia canis*

O período de incubação da erliquiose monocítica canina leva de oito a 20 dias (HARRUS et al., 1999) e a doença se manifesta de forma aguda, subclínica e crônica (WOODY; HOSKINS, 1991; MOREIRA et al., 2003). A maioria dos cães se recupera da fase aguda e subclínica quando tratados adequadamente (HARRUS et al., 2004). Alguns cães, no entanto, podem entrar na fase crônica da doença a qual a taxa de mortalidade é elevada (MYLONAKIS et al., 2004).

Diferentes manifestações clínicas podem ocorrer devido à patogenicidade de cada cepa de *E. canis* e também devido a coinfeção com outros hemoparasitos (HARRUS; WANER, 2011). Esta coinfeção é esperada devido ao fato de que a maioria das hemoparasitoses tem o mesmo carrapato vetor em seus ciclos de vida (HUXSOLL et al., 1970; MOREIRA et al., 2003). Ademais, essa coinfeção pode determinar maior gravidade nas manifestações clínicas (KORDICK et al., 1999; GAL et al., 2007). Além desses fatores, cada fase da infecção irá determinar manifestações clínicas diferentes (COUTO, 1998).

Dentre as manifestações clínicas descritas na literatura, podem ser observadas febre, apatia, anorexia, vômitos, descarga nasal e ocular, palidez de mucosa, perda de peso, lesões oculares, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, epistaxe, presença de petéquias, dispnéia, desidratação e aumento da queda de pelo (MOREIRA et al., 2003; CASTRO, et al., 2004; MOREIRA et al., 2005; ORÍÁ et al., 2008; BORIN et al., 2009; CARLOS et al., 2011). Podem ser encontradas também lesões oculares, como uveíte anterior, corioretinite, edemas de papila, hemorragias retinianas, infiltrados retinianos perivasculares e descolamento de retina, essas últimas alterações podendo culminar com cegueira (HARRUS et al., 1998a; KOMNENOU et al., 2007). Em alguns casos podem ocorrer manifestações neurológicas

devido à meningite e ao sangramento meningeal (MOREIRA, 2003; HARRUS; WANER, 2011).

Na fase subclínica, geralmente não são encontradas manifestações clínicas (WANER et al., 1997; LABARTHE et al., 2003). Mas, por algum motivo ainda incerto, alguns animais podem desenvolver a fase crônica da erliquiose monocítica canina e as manifestações clínicas são semelhantes às da fase aguda, no entanto, estas são bem mais graves (MYLONAKIS et al., 2004; HARRUS; WANER, 2011).

Como achados laboratoriais observam-se trombocitopenia, anemia e leucopenia na fase aguda da doença. A anemia, em sua maioria das vezes, é do tipo normocítica normocrômica e a leucopenia geralmente esta associada à linfopenia, neutropenia e eosinopenia. Na fase subclínica pode-se observar apenas trombocitopenia e na fase crônica observam-se grave trombocitopenia acompanhada de marcada anemia e leucopenia (WANER et al., 1997; MOREIRA, et al., 2003; CASTRO et al., 2004; MOREIRA, et al., 2005; MENDONÇA et al., 2005; NAKAGHI et al., 2008; BORIN et al., 2009; HARRUS; WANER, 2011; CARLOS et al., 2011).

Já a trombocitopenia, pode ser explicada pelo consumo das plaquetas pelo endotélio vascular inflamado, pelo aumento do sequestro esplênico ou pela destruição imunomediada, levando a uma diminuição da vida média das plaquetas (HARRUS et al., 1999).

Uma marcada pancitopenia, devido à hipoplasia da medula óssea é uma característica da fase crônica (MYLONAKIS et al., 2004; HARRUS; WANER, 2011).

Com relação às alterações bioquímicas podemos encontrar: hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hipergamaglobulinemia (HARRUS et al., 1996), aumento da alanina transaminase (ALT) e da fosfatase alcalina (HARRUS; WANER, 2011).

Shipov e colaboradores (2008) ao analisarem animais com erliquiose monocítica canina, concluíram que a presença de leucopenia grave (contagem total de leucócitos $< 0,93 \times 10^3 \mu\text{L}$), anemia grave (hematócrito $< 11,5\%$), hipocalemia (Potássio $< 3,65 \text{ mmol/L}$) e aumento no tempo da tromboplastina parcial ativada (TTPA $> 18,25\text{s}$), são fatores altamente indicativos de mortalidade em cães (100%). Já a presença de animais com contagem total de leucócitos maior que $5,18 \times 10^3 \mu\text{L}$, hematócrito maior que 33,5%, contagem de plaquetas acima de 89500 e TTPA abaixo de 14,5 segundos são indicativos de sobrevivência do animal.

2.2.1.2 Diagnóstico de *E. canis*

O diagnóstico da erliquiose monocítica canina é difícil devido as diferentes fases da doença e também frente às manifestações clínicas variadas (HARRUS; WANER, 2011).

Diferentes aspectos devem ser levados em consideração para fechar o diagnóstico de erliquiose, e estes incluem: histórico (área endêmica, exposição ao carrapato), achados laboratoriais indicativos no hemograma e alterações bioquímicas, além da correta interpretação dos testes diagnósticos, principalmente em relação aos resultados sorológicos (COHN, 2003; WANER et al., 2001; HARRUS; WANER, 2011).

Em um estudo, 12,2% (n= 505) dos animais apresentavam manifestações clínicas, as quais os veterinários acreditavam serem causadas por *E. canis*, entretanto os testes sorológicos foram negativos. No mesmo estudo, 49,5% dos cães soropositivos para anticorpo de *E. canis*, não apresentavam quaisquer manifestações clínicas da doença (LABARTH et al., 2003).

E. canis está relacionada a trombocitopenia, entretanto a redução no número de plaquetas não pode ser usada como único parâmetro para se diagnosticar a erliquiose monocítica canina, tendo em vista que outras enfermidades podem causar trombocitopenia e até mesmo outras espécies de *Ehrlichia* (MACIEIRA et al., 2005).

O diagnóstico laboratorial de *E. canis* pode ser feito através de esfregaço de sangue periférico com a observação de mórulas principalmente em monócitos, através da detecção de anticorpos específicos ou pela detecção de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) (MACIEIRA et al., 2005).

Pelo esfregaço sanguíneo, podem-se identificar mórulas de *E. canis* em monócitos, no entanto essa identificação é difícil, pois a presença dessas inclusões citoplasmáticas só são observadas na fase aguda da doença, além de ser uma técnica que consome tempo, tem baixa eficácia, sensibilidade e especificidade (NAKAGHI et al., 2008; RAMOS et al., 2009; VIEIRA et al., 2011; HARRUS; WANER, 2011).

Dependendo da fase da doença, mórulas de *E. canis* podem ser observadas no interior de plaquetas, mimetizando outras enfermidades (ALMOSNY, 1998)

Como método sorológico, a pesquisa de anticorpos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é considerada o padrão-ouro. Entretanto, outras técnicas sorológicas também são utilizadas no diagnóstico da erliquiose, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e o teste de Western immunoblotting (NAKAGHI et al., 2008; VIERIA et al., 2011; HARRUS; WANER, 2011).

Os testes sorológicos podem ser afetados por reações cruzadas com outros organismos do gênero *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia* (WANER et al., 1998), além disso, não distinguem a espécie de *Ehrlichia* (HARRUS; WANER, 2011). Os exames sorológicos também não conseguem distinguir uma infecção atual de uma exposição prévia (IQBAL et al., 1994), pois os níveis de titulação para anticorpos anti *E. canis* podem permanecer elevados por mais de 11 meses após tratamento (HARRUS et al., 1998).

O isolamento de *E. canis* em cultivo celular também pode ser realizado, no entanto essa técnica é mais usada em pesquisas laboratoriais, devido a sua complexidade, ao tempo elevado para crescimento do organismo e a necessidade de laboratórios e técnicos especializados (IQBAL et al., 1994; VIERA et al., 2011; HARRUS; WANER, 2011).

Todas as técnicas de diagnóstico tem seu valor, entretanto o diagnóstico definitivo de *E. canis* requer técnicas moleculares. A PCR é um método sensível no diagnóstico de *E. canis*, entretanto falsos positivos e falsos negativos podem ocorrer. Os falsos positivos podem ocorrer quando contaminantes estão presentes na amostra ou quando não é realizada uma amplificação específica (VIEIRA et al., 2011; HARRUS; WANER, 2011). Já cães com resultado de PCR negativo podem indicar um falso negativo, visto que alguns autores sugerem que *E. canis* pode se abrigar no baço, não sendo encontrados na circulação periférica. Este fato foi proposto, pois em alguns estudos realizados com ensaios de PCR negativos para *E. canis*, em amostras de sangue periférico, tiveram resultado da PCR positivo com amostras colhidas de tecido esplênico dos mesmos animais, o que sugeriu que o baço pudesse agir como um reservatório, onde *E. canis* fica abrigado (HARRUS et al., 1998c).

Estudos mostram que a PCR é o teste mais sensível e específico para diagnóstico de *E. canis* em cães (IQBAL, et al., 1994; LABRUNA et al. 2007).

É importante distinguir a fase da infecção e reconhecer as limitações de cada exame. Na fase aguda da doença, a PCR pode detectar o DNA de *E. canis* antes do que os teste sorológicos possam identificar anticorpos para *E. canis*. As reações cruzadas são incomuns nos exames moleculares de PCR, já nos testes sorológicos estas podem ocorrer devido à presença de outras espécies de *Ehrlichia*. Casos de falsos positivos nos exames sorológicos podem também ser devido à presença de títulos de anticorpos pós-tratamento. Já na fase crônica da doença, quando a presença de *E. canis* circulante em sangue periférico é raro, os exames sorológicos se mostram mais indicados (NAKAGHI et al., 2008).

2.2.1.3 Tratamento da erliquiose monocítica canina

As drogas que foram relatadas com sucesso no tratamento da erliquiose incluem as tetraciclinas, o clorafenicol, o dipropionato de imidocarb e a amicarbalida (NEER et al., 2002).

Breitschwerdt e colaboradores (1997) ao infectarem experimentalmente oito cães, conseguiram tratar a erliquiose monocítica aguda com doxiciclina (5mg/Kg BID) por 14 dias, comprovando a eficácia do tratamento através de cultura e PCR.

Em outro estudo, cães com erliquiose monocítica subclínica foram tratados com doxiciclina (VO 10mg/Kg SID) por seis semanas (42 dias), no entanto um animal dos quatro cães utilizados na pesquisa permaneceu com PCR positivo, ao término do tratamento, na amostra de sangue periférico (HARRUS et al., 2008b).

O tratamento com dipropionato de imidocarb tem resultados contraditórios na literatura (OGUNKOYA 1981; VAN HEERDEN, 1981; PRICE, 1980 e MATTHEWMAN, 1994). Sainz e colaboradores (2000) relataram a eficácia do tratamento com dipropionato de imidocarb (5mg/Kg SC, duas aplicações com 14 dias de intervalo), no entanto reportaram uma maior demora na normalização da contagem de plaquetas quando comparado a animais tratados com doxiciclina. Em contra partida, Eddlestone e colaboradores (2006) relataram que o dipropionato de imidocarb (6,6 mg/Kg IM, duas aplicações com 14 dias de intervalo) foi ineficaz na eliminação de *E. canis* em cães infectados experimentalmente.

Em outro estudo os pesquisadores compararam o tratamento da erliquiose canina: somente com doxiciclina (5 mg/kg VO BID 21 dias) e com doxiciclina (5 mg/kg VO BID 21 dias) associada ao dipropionato de imidocarb (5 mg/kg SC dose única). Todos os animais obtiveram melhora clínica e dos parâmetros hematológicos não existindo diferença significativa quando comparados (SOUSA et al. 2004).

A oxitetraciclina de longa ação já foi utilizada com sucesso no passado. Em um estudo, a oxitetraciclina de longa ação na dose de 20 mg/Kg (por via IM 2 aplicações com intervalos de 4 dias) foi eficaz no tratamento de quatro animais infectados experimentalmente. Em outro estudo, dos 26 animais naturalmente infectados, 24 animais se recuperaram, um animal morreu antes de completar o tratamento e outro animal teve que ser medicado com outras drogas por apresentar epistaxe recorrente (OGUNKOYA, et al., 1985).

Outra droga já utilizada é o enrofloxacino. Em um estudo os pesquisadores utilizaram o enrofloxacino (5 e 10mg/kg VO SID 21 dias) e apesar da utilização em apenas três cães (n=5), os autores observaram uma normalização das plaquetas, as culturas e os resultados das PCR para *E. canis* permaneceram positivos, revelando uma ineficácia no tratamento da erliquiose com enrofloxacino. Além disso, a repetição na contagem das plaquetas uma semana após o término do tratamento com enrofloxacino revelou nova redução no número de plaquetas (NEER et al., 1999).

Mais recentemente, a rifampicina tem sido avaliada quanto à sua eficácia no tratamento da erliquiose. Pelos resultados obtidos foi sugerida como droga alternativa no tratamento da erliquiose monocítica canina. Os efeitos da rifampicina (15 mg/Kg VO BID 7 dias) e da doxiciclina (10 mg/Kg VO SID 28 dias) foram comparados para o tratamento da erliquiose monocítica em cães e as duas drogas demonstraram resultados semelhantes, sendo assim, os autores reforçaram o uso da rifampicina devido ao seu curto período de administração quando comparados com a doxiciclina (SCHAEFER et al., 2008; AKHTARDANESH et al., 2011).

Além da terapia antibiótica, um adequado tratamento de suporte muitas vezes é necessário, com a administração de fluídos, transfusões sanguíneas e corticoides (WOODY; HOSKINS, 1991).

Como forma de prevenir a erliquiose, alguns autores sugerem o uso de doxiciclina de forma preventiva. Davoust e colaboradores (2005) conseguiram excelentes resultados no controle da erliquiose monocítica canina, utilizando doxiciclina (3mg/Kg VO SID) de forma preventiva, por pelo menos quatro meses de tratamento.

O controle do carrapato vetor também é fundamental na prevenção da erliquiose monocítica canina (DAVOUST et al., 2003; DAVOUST et al., 2005; OTRANTO et al., 2008).

2.2.2 Ehrlichia ewingii

Outro agente causador de erliquiose já reportado no Brasil é a *Ehrlichia ewingii*. Este é o agente causador da erliquiose granulocítica canina. Apesar de ter sido relatada infectando cães no Brasil por meio da identificação realizada com PCR, não foi realizado o sequenciamento genético para confirmação da espécie (OLIVEIRA et al., 2009). Alguns autores, baseado no fato de que existem relatos de ampliações falso positivas na PCR, principalmente quando o alvo é o gene 16S rRNA, sustentam que os dados obtidos por Oliveira e colaboradores (2009) precisam ser confirmados (VIEIRA et al., 2011).

Este agente infecta os neutrófilos e raramente os eosinófilos e esta associado a manifestações clínicas de claudicação, febre, anorexia e edema articular. E como principal achado laboratorial, tem-se a trombocitopenia (STOCKHAM et al., 1992)

2.3 Anaplasmosose

2.3.1 Anaplasma platys

É uma riquetsia que anteriormente fora denominada de *Ehrlichia platys* e atualmente pertence à família Anaplasmataceae e gênero *Anaplasma*, sendo o agente causal da trombocitopenia cíclica infecciosa canina (DUMLER et al., 2001).

Sua ocorrência foi relatada pela primeira vez em 1978, na Flórida, Estados Unidos (HARVEY et al., 1978).

A doença ocorre após um período de incubação que pode variar de 7 a 14 dias e uma parasitemia acompanhada de trombocitopenia que ocorre em ciclos de 10 a 14 dias (BAKER et al., 1987).

O vetor de *A. platys* ainda precisa ser confirmado, no entanto, suspeita-se que o carrapato vetor seja o *R. sanguineus* e seu método de transmissão natural é incerto (SHAW et al., 2001; COHN, 2003). Em uma tentativa de transmissão experimental, Simpson e colaboradores (1991) não conseguiram comprovar *R. sanguineus* como possível vetor de *A. platys*. Já Sparagano e colaboradores (2003) realizaram diagnóstico molecular de *R. sanguineus*, retirados de em cães infectados com *A. platys*, e os mesmos encontraram-se positivos para *A. platys*.

A ocorrência de coinfeções de *A. platys* com *E. canis*, bem como associados à *Babesia* spp., são comumente observadas (HOSKINS et al., 1988; SAINZ et al., 1999; SUKSAWAT et al., 2001; SANTOS et al., 2009).

2.3.1.1 Manifestações clínicas de Anaplasma platys

A maioria dos cães infectados com *A. platys* normalmente não evidencia manifestações clínicas (WOODY; HOSKINS, 1991; BROWN et al., 2001). Porém, alguns autores relatam febre e linfadenopatia como manifestações clínicas relacionadas à infecção por *A. platys* (BAKER et al., 1987; M'GHIRBI et al., 2009).

Uma redução no número de plaquetas é o achado laboratorial normalmente encontrado na maioria dos cães com *A. platys* (MATHEW et al., 1997; INOKUMA et al., 2002; EDDLESTONE et al., 2007). No entanto, mesmo em animais severamente trombocitopênicos, manifestações clínicas compatíveis com hemorragias comumente não são observadas (WOODY; HOSKINS, 1991).

Um quadro de uveíte já foi relatado em um cão que apresentava inclusões plaquetárias e titulação elevada para anticorpos anti *A. platys* (GLAZE; GAUNT 1986).

2.3.1.2 Diagnóstico de *Anaplasma platys*

Assim como na *E. canis*, o diagnóstico pode ser realizados pela identificação direta de inclusões de *A. platys* nas plaquetas, por de exames sorológicos, principalmente as reações de imunofluorescência indireta (RIFI) (WOODY; HOSKINS, 1991; SAINZ et al., 1999) e também por ensaios de PCR. (MARTIN et al, 2005)

A identificação de inclusões em plaquetas visualizadas por esfregaços sanguíneos, não é um método completamente confiável no diagnóstico de *A. platys*, principalmente devido à natureza cíclica da parasitemia, levando a uma redução no número de parasitos (WOODY; HOSKINS, 1991; MARTIN et al., 2005). Além disso, é uma técnica que consome muito tempo quando realizada adequadamente e fornece falsos positivos devido a artefatos diversos (HARRUS et al., 1997a; MYLONAKIS et al., 2003). Cabe ressaltar que em se tratando de erliquiose monocítica canina, dependendo da fase da doença, mórulas de *E. canis* podem ser observadas no interior de plaquetas, mimetizando outras enfermidades (ALMOSNY, 1998).

O diagnóstico através da RIFI é muito utilizado, no entanto, animais recuperados da infecção podem permanecer com títulos de anticorpos elevados por muito tempo, sendo assim, os testes sorológicos não conseguem distinguir uma infecção ativa de um animal tratado (MATHEW et al., 1997; MARTIN et al, 2005).

Apesar dos ensaios da PCR estarem sendo utilizados com sucesso no diagnóstico de *A. platys* (MATHEW et al., 1997), a presença do DNA na circulação sanguínea também pode sofrer reduções transitórias devido à trombocitopenia cíclica, levando a resultados falso-negativos nas PCR (EDDLESTONE et al., 2007).

2.3.1.3 Tratamento da trombocitopenia cíclica infecciosa canina

A maioria dos estudos relata que a doxiciclina é efetiva no tratamento de infecções causadas tanto por *Ehrlichia* spp. como por *Anaplasma* spp. (NEER et al.,2002).

Sainz e colaboradores (1999) relataram o sucesso do tratamento de um animal, que apresentava coinfeção de *A. platys*, *E. canis* e *Babesia* spp. com doxiciclina (10 mg/Kg VO SID 28 dias) associada com dipropionato de imidocarb (5 mg/Kg SC 2 aplicações - 14 dias de intervalo).

Chang e colaboradores (1997) relataram a ineficácia da tetraciclina (22 mg/Kg VO TID 14 dias) no tratamento de *A. platys*, ressaltando que o meio de diagnóstico utilizado como parâmetro para identificar a positividade foi a identificação de inclusões em plaquetas observadas nos esfregaços sanguíneos.

Os mesmos autores, no entanto relataram sucesso no tratamento de *A. platys* com doxiciclina (10 mg/Kg SID 8 dias), confirmando a eliminação do parasito através do diagnóstico direto de inclusões em plaquetas e também em ensaios de PCR (CHANG et al., 1997).

2.3.2 *Anaplasma phagocytophilum*

É uma riquetsia que inicialmente foi denominada de *Rickettsia phagocytophila* (FOGGIE, 1949) e posteriormente foi renomeada para *Ehrlichia phagocytophila* (RISTIC; HUXSOLL, 1984). Dumler e colaboradores (2001) reagruparam *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente causal da Ehrlichiose Granulocítica Humana em uma nova espécie denominada de *Anaplasma phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001). Esta reclassificação das espécies tem gerado muitas discussões na literatura internacional, principalmente devido a diferenças no tropismo celular entre as espécies do gênero *Anaplasma*, a virulência das espécies e a infectividade entre diferentes hospedeiros (CARRADE et al., 2009).

Dentre os animais domésticos *A. phagocytophilum* pode acometer equinos, bovinos, ovelhas, cabras, cães e gatos, além de parasitar também o homem (CARRADE et al., 2009).

Os primeiros relatos desta espécie parasitando cães ocorreram na Califórnia em 1982 (MADEWELL; GRIBBLE, 1982). Já no homem, o primeiro relato ocorreu nos Estados Unidos em 1993 (CHEN et al., 1994).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *A. phagocytophilum* parasitando cães e confirmados através da identificação do DNA do parasito em técnicas moleculares, somente ocorreu recentemente em 2011 (SANTOS et al., 2011).

Em cães, o agente causal da anaplasmoose granulocítica canina é *A. phagocytophilum*, anteriormente a doença era chamada de erliquiose granulocítica canina; doença que afeta principalmente os neutrófilos (POITOUT et al., 2005).

Os principais vetores de *A. phagocytophilum* são os carrapatos *Ixodes* spp. (SHAW et al., 2001; COHN, 2003). No Brasil suspeita-se que o *Amblyomma cajennense* possa estar envolvido na transmissão desta espécie para cães (SANTOS et al., 2011).

Em 2008 foi relatado na China um episódio onde nove pessoas se infectaram com *A. phagocytophilum* sem a exposição ao carrapato vetor, no entanto, todas as pessoas tiveram contato com um paciente que possivelmente morreu de anaplasmoose granulocítica humana, caracterizando uma infecção nosocomial, suspeitando-se que a infecção ocorreu mediante a exposição ao sangue ou a secreções respiratórias do paciente morto (ZANG et al., 2008).

2.3.2.1 Manifestações clínicas do *Anaplasma phagocytophilum*

A maioria dos cães infectados por *A. phagocytophilum* permanecem assintomáticos. Trabalhos relatam evidências sorológicas deste parasito, no entanto não relatam a doença clínica (FOLEY et al., 2001; BEALL et al., 2008). Outros autores afirmam que as manifestações clínicas da infecção por *A. phagocytophilum* são menos graves do que infecções causadas por *E. canis* (SHAW et al., 2001).

Para alguns autores, *A. phagocytophilum* pode levar a um quadro de doença aguda ou permanecer de forma subclínica (LESTER et al., 2005).

As principais manifestações descritas em cães são: letargia e febre, no entanto outros relatos incluem inapetência, anorexia, claudicação, polidipsia, palidez das mucosas, vômitos, diarreia, sinais neurológicos, petéquias, melena, epistaxe, linfadenomegalia e esplenomegalia. Como achado laboratorial normalmente é encontrado trombocitopenia. No entanto, podem ser encontrados neutropenia, linfopenia e anemia. Acredita-se que esta redução no número de plaquetas esteja relacionada a respostas imunomediadas (GREIG et al., 1996; EGENVALL et al., 1997; KIRTZ et al., 2005; LESTER et al., 2005; POITOUT et al., 2005; JENSEN et al., 2007; KOHN et al., 2008; CARRADE et al., 2009)

Com relação à avaliação bioquímica, podem ser encontrados hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hiperbilirubinemia e um discreto aumento na fosfatase alcalina (GREIG et

al., 1996; EGENVALL et al., 1997; KIRTZ et al., 2005; LESTER et al., 2005; POITOUT et al., 2005; CARRADE et al., 2009).

A leucopenia resultante da infecção por *A. phagocytophilum*, pode predispor a infecções secundárias oportunistas, e estas estão relacionadas como potenciais causas de óbitos em cães e no homem (CARRADE et al., 2009).

2.3.2.2 Diagnóstico de *Anaplasma phagocytophilum*

O diagnóstico deve ser realizado baseando-se nas manifestações clínicas apresentadas pelos animais, nos achados laboratoriais, principalmente na detecção de mórulas do parasito no interior dos neutrófilos, associados a titulações sorológicas e resultados positivos na PCR espécie específica. O isolamento celular também pode ser feito; no entanto, este não é rotineiramente realizado (CARRADE et al., 2009).

A presença de mórulas dentro de neutrófilos não pode ser utilizada sozinha como meio de diagnóstico, pois outras espécies de *Ehrlichia* spp. como por exemplo *E. ewingii* são indistinguíveis citologicamente, fazendo-se necessário a realização de PCR (CARRADE et al., 2009).

Técnicas sorológicas de RIFI têm sido utilizadas pela maioria dos laboratórios, entretanto, as técnicas sorológicas não são capazes de diferenciar uma exposição aguda de uma exposição previa ao parasito, visto que titulações de anticorpos para *A. phagocytophilum* podem permanecer elevadas por meses (EGENVALL et al., 1997; EGENVALL et al., 2000).

Nos testes sorológicos podem ocorrer reações cruzadas, principalmente com outros membros do gênero *Anaplasma* como, por exemplo, *A. platys* (BOWMAN et al., 2009).

Diversas modalidades de PCR têm sido utilizadas no diagnóstico de *A. phagocytophilum*, no entanto, PCR realizadas com o gene *msp2* têm se mostrado específicas para *A. phagocytophilum* (EGENVALL et al., 2000; CARRADE et al., 2009).

2.3.2.3 Tratamento da anaplasnose granulocítica canina

O tratamento de escolha para a anaplasnose granulocítica canina é a doxiciclina. Cães tratados com doxiciclina (5mg/Kg VO BID ou 10mg/Kg VO SID 10 a 21 dias) demonstraram melhora das manifestações clínicas em 24 a 48 após o início do tratamento (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005). Kohn e colaboradores (2008) também relataram o sucesso no tratamento da anaplasnose granulocítica canina com doxiciclina (5mg/Kg VO BID 28 dias).

Jensen e colaboradores (2007) relataram a melhora clínica de seis cães tratados com dipropionato de imidocarb ou doxiciclina. A tetraciclina (25 mg/Kg VO TID 14 dias), também foi relatada como sendo eficaz na terapêutica da anaplasnose granulocítica canina (LESTER et al., 2005)

Tendo em vista que esse é um patógeno potencialmente zoonótico, e os cães acabam sendo reservatórios muito próximos ao homem. Por isso, deve ser feita uma efetiva prevenção do carrapato vetor, prevenindo também a doença nos cães (CARRADE et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do Experimento

Este estudo foi realizado nas instalações do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

Os testes de biologia molecular foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular do DPA/IV – UFRRJ, sob a supervisão do professor Dr. Douglas McIntosh.

3.2 Seleção dos Animais e Divisão dos Grupos Experimentais

Foi utilizado um total de 51 cães da raça Beagle pertencentes ao canil experimental do LQEPV. Os animais foram selecionados dentre aqueles que apresentavam trombocitopenia, baseados nos achados hematológicos realizados rotineiramente no respectivo laboratório.

Os animais tinham idades que variavam de um a oito anos. Todos os animais eram identificados através de microchip implantados no tecido subcutâneo.

Os cães foram divididos inicialmente em quatro grupos de forma aleatória (Grupos A n=13, B n=13, C n=13 e D n=12). Posteriormente, tendo em vista uma resposta insatisfatória frente aos tratamentos empregados para os grupos A, B e C, 16 animais destes, foram rearranjados em um novo grupo (Grupo E n=16). Os animais foram selecionados dentre aqueles que não apresentaram normalização do número de plaquetas após uma semana de tratamento. Os demais animais foram removidos do experimento e tratados de forma convencional.

Todos os animais foram mantidos durante todo o experimento em baias individuais de alvenaria com piso cimentado, com 1,5 m², sendo a água e alimentação fornecidas *ad libitum*.

3.3 Obtenção das Amostras Sanguíneas

De cada animal foram coletados 15 mL de sangue divididos em três tubos, dois com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e um tubo com gel ativador de coágulo, através de punção à vácuo da veia jugular.

Para cada grupo foi coletado sangue, antes do tratamento (dia -3) e posteriormente ao tratamento nos dias +7 e +28.

Dos três tubos coletados, um com EDTA e outro com ativador de coagulação foram levados ao laboratório de análises clínicas do próprio LQEPV, onde as amostras foram processadas.

O outro tubo com EDTA era exclusivo para a obtenção de material para análise molecular e este era centrifugado a 3000xg por 10 minutos e posteriormente a capa leucocitária era separada de forma asséptica em microtubos novos e autoclavados com alíquotas de 1,5mL, outra alíquota de igual volume foi separada com o restante da capa leucocitária somado a sangue total, sendo este utilizado como amostra de reserva. Todos os microtubos foram identificados e armazenados a -80°C até a extração do material genômico (DNA).

3.4 Exames Hematológicos

Em todas as amostras de sangue coletadas foram realizados hemograma completo, análise bioquímica e esfregaço sanguíneo, para procura de inclusões parasitárias.

Os dados referentes à hematimetria, leucometria global e plaquetometria foram obtidos utilizando analisador hematológico veterinário¹ automatizado. A concentração da proteína plasmática total foi mensurada por refratometria.

Para o exame bioquímico foi utilizado analisador bioquímico² automatizado. Todos os kits de reagentes utilizados foram da mesma marca³.

A identificação de inclusões parasitárias foi realizada de forma manual, em esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido.

3.4.1 Hemograma completo

Hematimetria: contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM);

Leucometria: Contagem total de leucócitos e leucometria específica;
Plaquetometria.

3.4.2 Bioquímica sérica

Nos exames bioquímicos foram avaliadas as atividades séricas das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase (GGT) e creatina quinase (CK) além da concentração sérica de ureia e creatinina.

As avaliações das atividades enzimáticas de ALT, AST, fosfatase alcalina, GGT e CK foram realizadas por cinética mono-reagente e a creatinina e a ureia foram dosadas por reação de tempo fixo mono-reagente.

3.5 Extração do Material Genômico (DNA) da Capa Leucocitária

O DNA foi extraído a partir de 200µL de capa leucocitária descongelada, utilizando o sistema QIAamp DNA Mini Kit[®] (Qiagen Cat. n° 51306) de acordo com as instruções do fabricante. Em algumas amostras não foi possível obter DNA da capa leucocitária, sendo então utilizados 200µL de sangue total descongelado. A qualidade e a quantidade (razão de absorvância de 280/260nm) do DNA foram determinadas utilizando-se espectrofotômetro⁴. Para confirmar que não houve degradação do DNA, 2µL de cada amostra foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e comparados com padrão de alto peso molecular λ-DNA[®] (Fermentas Cat. n° SD0011).

3.6 PCR do DNA Extraído

Quatro ensaios diferentes de PCR, baseados em protocolos publicados na literatura, foram utilizados neste estudo. Estes incluíram ensaios para membros da família Anaplasmataceae, que geraram fragmentos de 354 pares de base do gene de 16S rRNA

¹ pocH-100iVDiff - SYSMEX DO BRASIL

² A15 – BioSystems S.A.

³ BioSystems.

⁴ NanoDrop 2000 - Thermo Scientific

(BROWN et al., 2001) além de mais três ensaios visando as seguintes espécies: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys*. Os detalhes sobre as condições e ciclos de cada reação serão fornecidos posteriormente. As avaliações iniciais dos ensaios foram realizadas utilizando DNA, previamente identificados como positivos (controles positivos), e gentilmente cedidos pelos professores Dr. Carlos Luiz Massard, Dr. Huarrisson Azevedo Santos e pela Dra. Cristiane Divan Baldani, do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ.

Para determinar o limite de detecção dos diferentes ensaios de PCR e para quantificar o DNA que foi utilizado como controle positivo, diluições seriadas (10^{-5}) foram preparadas para cada DNA controle. Um microlitro de cada diluição foi utilizado nos ensaios de PCR. Em todos os casos, o conteúdo total (12,5 μ L) da PCR foi misturada a 2,5 μ L de tampão de corrida (glicerol 15% e azul de bromofenol 0,0025% preparado em água ultra pura livre estéril) e a mistura aplicada aos poços do gel de agarose 1,5% preparados com tampão TAE 1x (anexo A) e submetidos à eletroforese com uma voltagem constante de 5 volts/cm por 30 minutos. Para avaliar o peso molecular dos amplicons foram utilizados marcadores moleculares de 50 a 2000 pares de base (Invitrogen Cat N° 74601-250) ou marcador de 100 pares de base (Invitrogen Cat N° 15628-019). Os géis foram corados com Brometo de Etídio e observados e fotografados sob luz ultravioleta. As duas últimas diluições a demonstrarem uma clara amplificação foram selecionadas para serem usadas como DNA (controle positivo) em todos os ensaios subsequentes.

3.6.1 Determinação do limite de detecção

A quantidade real de DNA parasitário no controle positivo não pôde ser estabelecida experimentalmente. Portanto, como uma alternativa semi-quantitativa, determinou-se a menor diluição capaz de detectar amplicons. A fim de se obter dados quantitativos em relação aos limites de detecção, a seguinte estratégia foi adotada. Para cada ensaio de PCR espécie específico, bem como para a PCR para a família Anaplasmataceae (usando DNA de *E. canis* como modelo) amplicons foram gerados. Os amplicons foram purificados (para remover componentes da mistura usada na reação de PCR) usando o Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System (Promega Cat N° A9281) e foram quantificados no NanoDrop 2000. Posteriormente, os amplicons eram levados até a concentração padrão de 10ng/ μ L e depois diluídos em serie até 10^{-7} (equivalente a 1fentograma/ μ L). Duplicatas de 1 μ L de cada diluição foram utilizadas para determinar o limite de detecção dos quatros ensaio de PCR. Os amplicons foram gerados em géis de agarose 1,5% conforme descrito anteriormente.

3.6.2 Ensaios de PCR utilizados na detecção dos agentes

3.6.2.1 PCR para Família Anaplasmataceae

Na PCR para membros da Família Anaplasmataceae, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos de 354 pares de base do gene 16S rRNA. EHR16SD (5' – GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC – 3') e EHR16SR (5' – TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC – 3') (BROWN, et al., 2001).

Todas as reações foram realizadas com volume final de 12,5 μ L, com as seguintes concentrações finais dos reagentes (Tampão de reação Taq polimerase 1x Platinum® – Invitrogen), 2,5mM MgCl₂, 200 μ M de (desoxinucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de primer e 0,25U de enzima Taq DNA polimerase (Platinum® - Invitrogen). A esta mistura, foi adicionado 1 μ L de DNA.

As condições do ciclo foram de 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguidos de 40 ciclos de 95°C por 60 segundos (desnaturação), 54°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão) e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.6.2.2 PCR específicas para *Anaplasma platys*

Na PCR para *A. platys* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos de 678 pares de base do gene *16S rRNA*. PLATYS (5' – GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG – 3') e EHR16SR (5' – TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC – 3') (BROWN et al., 2001).

Todas as reações foram realizadas com volume final de 12,5µL, com as seguintes concentrações finais dos reagentes (Tampão de reação Taq polimerase 1x Platinum® – Invitrogen), 2,5mM MgCl₂, 200µM de (desoxinucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de primer e 0,25U de enzima Taq DNA polimerase (Platinum® - Invitrogen). A esta mistura, foi adicionado 1µL de DNA.

As condições do ciclo foram de 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguidos de 40 ciclos de 95°C por 60 segundos (desnaturação), 54°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão) e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.6.2.3 PCR específicas para *Anaplasma phagocytophilum*

Na PCR para *A. phagocytophilum* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos de 334 pares de base do gene *msp2*. Msp2-3F (5' – CCA GCG TTT AGC AAG ATA AGA G – 3') e Msp2-3R (5' – GCC CAG TAA CAT CAT AAG C – 3') (MASSUNG; SLATER, 2003).

Todas as reações foram realizadas com volume final de 12,5µL, com as seguintes concentrações finais dos reagentes (Tampão de reação Taq polimerase 1x - Platinum®/Invitrogen), 200µM (desoxinucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,0mM MgCl₂, 10 pmol de primer e 0,25U de enzima Taq DNA polimerase (Platinum®/Invitrogen). A esta mistura, foi adicionado 1µL de DNA.

As condições do ciclo foram de 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 60 segundos (extensão) e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.6.2.4 PCR específicas para *Ehrlichia canis*

Na PCR específico para *E. canis* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos de 843pares de base do gene *p28*. ECp28-F (5' – ATG AAT TGC AAA AAA ATT CTT ATA – 3') e ECp28-R (5' – TTA GAA GTT AAA TCT TCC TCC – 3') (NAKAGHI et al., 2010).

Todas as reações foram realizadas com volume final de 12,5µL, com as seguintes concentrações finais dos reagentes (Tampão de reação Taq polimerase 1x - Platinum®/Invitrogen), 200µM (desoxinucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,0mM MgCl₂, 10 pmol de primer e 0,25U de enzima Taq DNA polimerase (Platinum®/Invitrogen). A esta mistura, foi adicionado 1µL de DNA.

As condições do ciclo foram de 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 52°C por 60 segundos (anelamento) e 72°C por 60 segundos (extensão) e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.6.3 Controle negativo das PCR

Para todas as reações foram utilizados dois tipos de controles negativos. O primeiro classificado como controle da mistura da reação que foi elaborado com os componentes da reação mais 1µL de água ultra pura estéril, este era acondicionado em tubo antes do início da manipulação tanto das amostras como dos controles positivos. Uma reação positiva neste tubo iria indicar a presença de contaminante em algum componente da mistura da reação.

O segundo controle negativo foi o controle ambiental, este foi elaborado com 1µL de água ultra pura estéril no lugar do DNA. Contudo, neste caso a água era adicionada após a preparação de todos os tubos contendo as amostras a serem analisadas e manipuladas no mesmo espaço físico (ambiente) usado no preparo das reações. Positividades nesta amostra indicariam contaminação devido à manipulação dos tubos das amostras. A fim de reduzir as possibilidades de contaminação, as misturas foram preparadas em local onde não se realiza nenhum tipo de manipulação de DNA além deste ser exposto a radiação ultravioleta de alta intensidade antes da manipulação das misturas.

Adicionalmente, todas as ponteiros das micropipetas utilizadas continham filtro (barreira) hidrofóbico de aerossol.

3.7 Protocolos Terapêuticos

Para cada grupo fora instituído um protocolo terapêutico distinto para erliquiose monocítica canina (Tabela 1).

Na tentativa de minimizar a dor causada pela aplicação da oxitetraciclina de longa ação (Grupo E) e também reduzir os efeitos inflamatórios produzidos pela mesma, foi realizada aplicação de meloxicam (1mg/Kg) por via subcutânea no dia da aplicação do antibiótico e duas outras aplicações de meloxicam (0,5mg/Kg) nos dois dias subsequentes.

Tabela 1. Protocolo terapêutico empregado em cada grupo, para tratamento da erliquiose monocítica canina.

Grupos	Protocolo Terapêutico Empregado
A	Azitromicina 10 mg/Kg VO SID (28 dias)
B	Enrofloxacino 10 mg/Kg VO SID (28 dias)
C	Dipropionato de imidocarb 5mg/kg SC (2x – intervalo 14 dias)
D	Doxiciclina 20mg/Kg VO SID (28 dias)
E	Oxitetraciclina LA 20mg/Kg IM (4x – intervalo 7 dias)

VO – via oral; SID – uma vez ao dia; SC – subcutâneo; LA – longa ação; IM - intramuscular

3.8 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas dos valores hematológicos e bioquímicos todos os parâmetros foram transformados em Log de 10 para tornar todos os parâmetros numa distribuição normal. Após esta transformação todos os dados foram analisados estatisticamente pelo Teste T para duas amostras relacionadas dentro de cada grupo no pré-tratamento e nos dias +7 e +28 (pós-tratamento). Portanto objetivou-se comparar as médias dos parâmetros analisados antes do tratamento (dia -3) e sete dias após o início do tratamento, visando uma avaliação da resposta inicial do tratamento e também comparando as médias do dia zero com o dia +28, que correspondeu ao término dos tratamentos.

As análises estatísticas foram realizadas através de programa de computador, Bioestat 5.0 e o nível de significância considerado foi de 95% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todo o curso do experimento, dois animais pertencentes ao Grupo C (dipropionato de imidocarb) vieram a óbito, ainda na etapa de pré-tratamento e o outro logo após o início do tratamento.

Os animais que morreram tiveram confirmação da presença de DNA para *E. canis* na PCR, já para *A. platys* e *A. phagocytophilum* os resultados foram negativos.

Ambos os animais apresentavam-se prostrados e as mucosas estavam ligeiramente hipocoradas. Foi instituído tratamento com soroterapia e administração de corticoides, no entanto, o primeiro animal, morreu em 24 horas e o segundo dois dias após o início da terapia de suporte. Acredita-se que ambos os animais se encontravam na fase crônica da erliquiose, apresentando anemia e trombocitopenia como achados laboratoriais mais importantes (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado da PCR para *Ehrlichia canis* e valores hematimétricos, bioquímicos e contagem plaquetária dos dois animais do Grupo C (dipropionato de imidocarb) que vieram a óbito durante o estudo.

Exame/Parâmetros	Animal N° 419842	Animal N° 290901	Valores de Referência
PCR (<i>E. canis</i>)	+	+	
Hemograma			
Leucócitos (/ µL)	10600	9400	6000-17000 ¹
Hemácias (x10⁶/µL)	3,99	3,97	5,5-8,5 ¹
Hemoglobina (g/dL)	8,2	8,1	12-18 ¹
Hematócrito (%)	26,0	25,3	37-55 ¹
VCM (fL)	65,2	63,7	60-70 ²
HCM (pg)	20,6	20,4	19,5-24,5 ²
CHCM (g/dL)	31,5	32,0	32-36 ²
Plaquetas (/µL)	5000	45000	145000-440000 ¹
Bioquímica			
Fosfatase Alcalina (U/L)	57	77	20-150 ³
ALT (U/L)	25	49	10-88 ³
AST (U/L)	21	23	10-88 ³
CK (U/L)	85	69	0-460 ¹
Creatinina (mg/dL)	1	1,2	0,5-1,5 ²
GGT (U/L)	1	4	1-10 ³
Ureia (mg/dL)	40	125	15-40 ²

¹KIRK; BONAGURA, 1992; ²BUSH, 2004; ³MEYER; COLES; RICH, 1995

Com relação ao exame físico, apenas alguns animais apresentavam as mucosas hipocoradas, não apresentando quaisquer outras manifestações clínicas relacionadas à erliquiose monocítica canina. Tal fato sugere que os animais estivessem na fase subclínica da doença, a qual normalmente é assintomática (WANER et al., 1997).

No Grupo E (oxitetraciclina LA), algumas manifestações clínicas foram evidenciadas, mas estas estavam relacionadas à aplicação do medicamento. Parte dos animais apresentou dor no momento da aplicação do medicamento, isto se deve ao veículo utilizado na apresentação deste medicamento, o qual tem ação irritante, que por sua vez desencadeia a formação de microabscessos determinando assim uma resposta inflamatória local, promovendo a liberação lenta do antibiótico. Tais manifestações foram evidenciadas de forma esporádicas e em intensidades diferentes, o que pode ser atribuído à aplicação do anti-inflamatório.

4.1 PCR

4.1.1 Avaliação da qualidade do DNA

O DNA extraído das amostras foi analisado através de eletroforese e quando comparados com o marcador de alto peso molecular, evidenciou-se grande quantidade de DNA extraído (Figura 1).

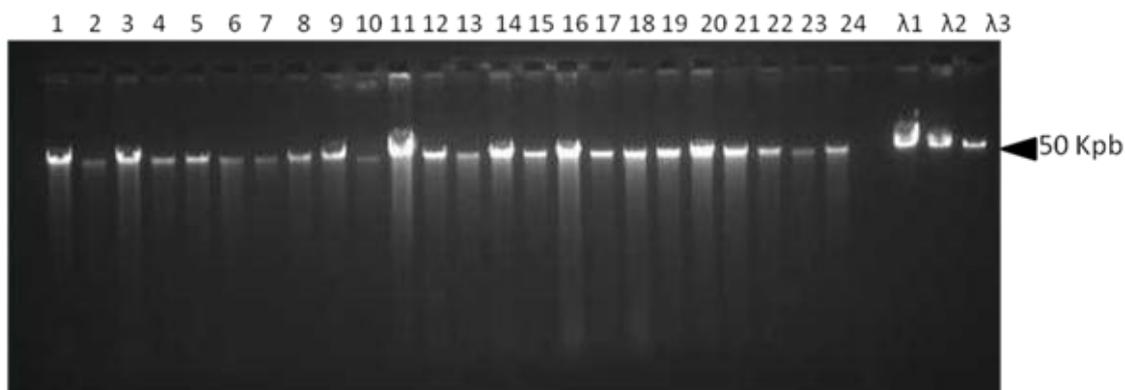


Figura 1. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 0,8% corada com Brometo de Etídeo com material extraído das amostras demonstrando a adequada extração de DNA. Canaletas 1-24 = Amostras; $\lambda 1$ = lambda DNA 150ng, $\lambda 2$ = lambda DNA 100ng, $\lambda 3$ = lambda DNA 50ng

4.1.2 Limites de detecção dos controles positivos

Os detalhes das duas últimas diluições dos DNA, utilizados como controles positivos, que amplificaram estão descritos no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1 - Últimas duas diluições do DNA controle positivo de cada espécie, que amplificaram para cada ensaio de PCR realizado.

	PCR	Família Anaplasmataceae	<i>Ehrlichia</i> <i>canis</i>	<i>Anaplasma</i> <i>phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma</i> <i>platys</i>
DNA modelo	<u>Duas últimas diluições do DNA controle positivo que amplificaram</u>				
<i>Ehrlichia canis</i> 535		10 ⁰ e 10 ⁻¹	10 ⁰ e 10 ⁻¹		
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>		10 ⁻¹ e 10 ⁻²		10 ⁻² e 10 ⁻³	
<i>Anaplasma platys</i>		10 ⁻² 10 ⁻³			10 ⁻² e 10 ⁻³

O controle positivo de *E. canis* foi fracamente positivo tanto para o gênero (Família Anaplasmataceae) como para a PCR espécie específico (*p28*). Em ambos os ensaios, amplicons só foram amplificados com amostras não diluídas ou diluídas a 10⁻¹. O DNA controle positivo de *A. phagocytophilum* foi ligeiramente mais forte, amplificando em diluições de 10⁻¹ e 10⁻² para o gênero e em diluições de 10⁻² e 10⁻³ para PCR com *msa2* (espécie específico). A aparente maior sensibilidade da PCR de *msa2* é provavelmente devido ao fato do gene estar presente em múltiplas cópias no genoma de *A. phagocytophilum*. No caso de *A. platys*, como ambos os ensaios de PCR (gênero e espécie específico), utilizam o mesmo gene (16S rRNA) alvo, os dois ensaios tiveram níveis de sensibilidade iguais, detectado em diluições de 10⁻² e 10⁻³.

4.1.3 Limite de detecção usando amplicon como alvo

Como demonstrado na Figura 2, cada um dos quatro ensaios de PCR foi capaz de amplificar até um fentograma de amplicons (colunas A7, B6, C6 e D6), demonstrando a sensibilidade do ensaio utilizado.

4.1.4 Detecção de *Anaplasma phagocytophilum*; *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis*

Todas as amostras foram submetidas aos quatro ensaios da PCR. Inicialmente as amostras foram avaliadas pelo ensaio elaborado para detectar membros da Família Anaplasmataceae e posteriormente as amostras foram submetidas aos testes da PCR para cada espécie. Os géis demonstrando a presença ou a ausência de ampliações estão ilustrados nas Figuras 3 a 6.

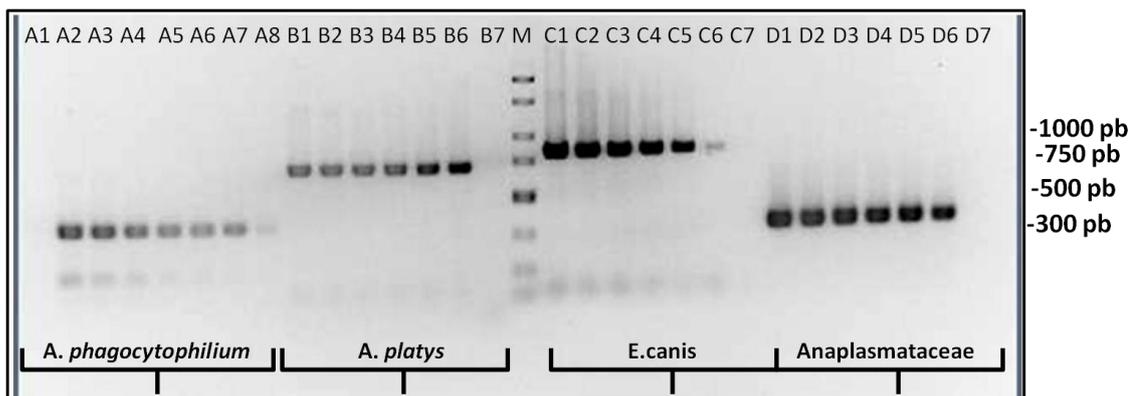


Figura 2. Fotografia negativa de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo. A1=água (controle negativo ambiental), A2=100pg, A3=10pg, A4=1pg, A5=100fg, A6=10fg, A7=1fg A8=água (controle negativo da mistura – com extravasamento de material do poço adjacente); B2=100pg, B3=10pg, B4=1pg, B5=100fg, B6=10fg, B1=1fg, B7=água (controle negativo da mistura); C2=100pg, C3=10pg, C4=1pg, C5=100fg, C6=10fg, C1=1fg, C7= água (controle negativo da mistura); D2=100pg, D3=10pg, D4=1pg, D5=100fg, D6=10fg, D1=1fg, D7=água (controle negativo da mistura). M= marcador 50-2000 pares de base.

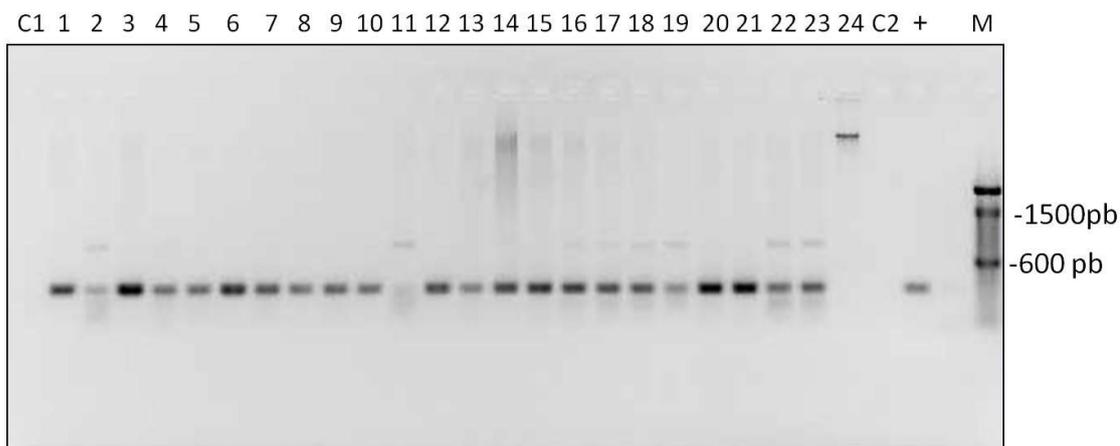


Figura 3. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo evidenciando amostras positivas e negativas na reação de PCR (354pb) para a família Anaplasmataceae. Canaleta C1=água (controle negativo da mistura), 1-24 = amostras de DNA estudadas. C2=água (controle negativo ambiental), + = controle positivo (*E. canis* 535 diluição de 10^{-1}). M=marcador de peso molecular 100pb - Invitrogen (Cat No. 15628-019).

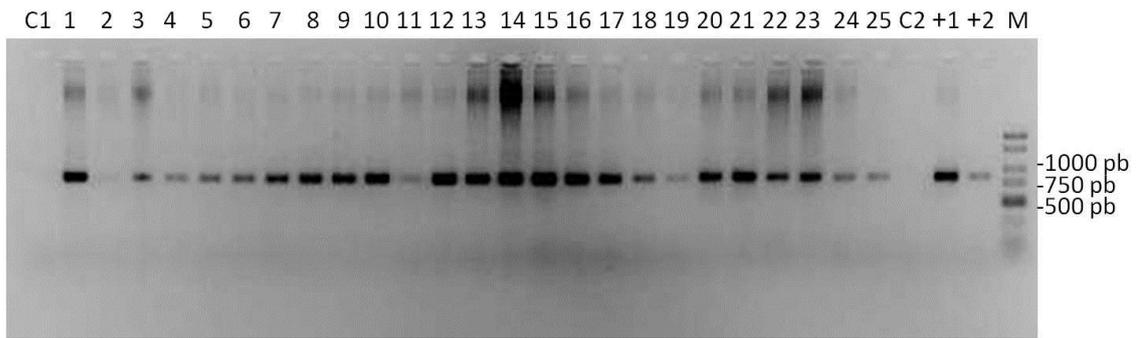


Figure 4. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio evidenciando amostras positivas e negativa na reação de PCR (843pb) para *Ehrlichia canis*. C1=água (controle negativo da mistura); 1-25=amostras analisadas; C2=água (controle negativo ambiental); +1=controle positivo (sem diluição 10^0); +2 controle positivo (diluição de 10^{-1}); M=marcador 50-2000 pb (Invitrogen).

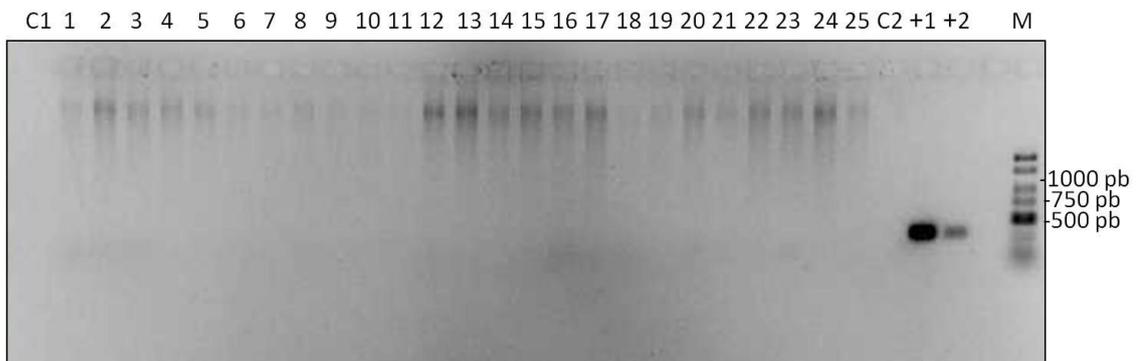


Figura 5. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio evidenciando amostras negativas na reação de PCR (334pb) para *Anaplasma phagocytophilum*. C1=água (controle negativo da mistura), 1-25=amostras testadas, C2=água (controle negativo ambiental), +1=controle positivo (diluição de 10^{-1}), +2 controle positivo (diluição de 10^{-2}); M=marcador 50-2000pb (Invitrogen).

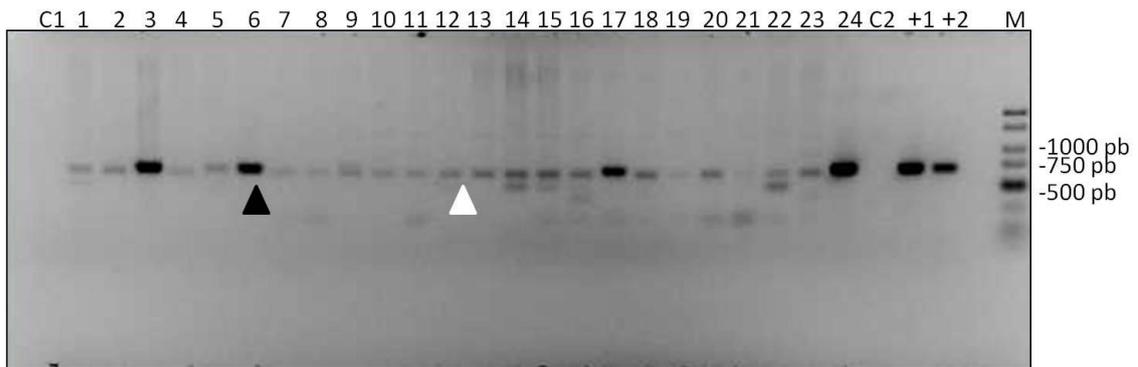


Figura 6. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio evidenciando amostras positivas e negativas na reação de PCR para *Anaplasma platys*. C1=água (controle negativo da mistura), 1-24=amostras testadas. C2=água (controle negativo ambiental), +1=controle positivo (diluição de 10^{-2}), +2=controle positivo (diluição de 10^{-3}); M=marcador 50-2000bp (Invitrogen). Amplicons de 678pb indicados pela seta preta (▲) e amplicons inespecíficos ligeiramente menores indicados pela seta branca.

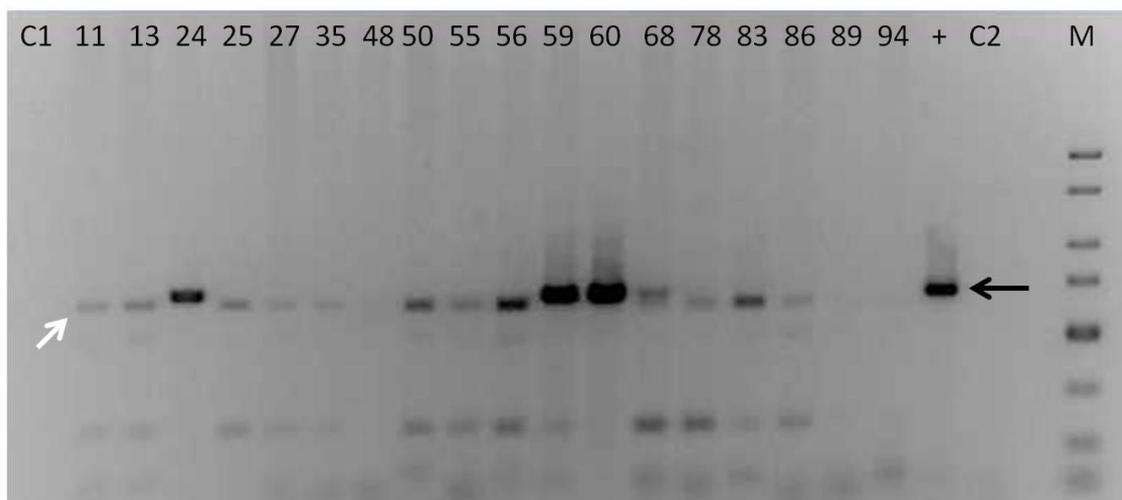


Figura 7. Fotografia negativa de gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio evidenciando as amostras (11 - 94) reavaliadas na PCR para *Anaplasma platys*. C1 e C2 = água (controles negativos). + = controle positivo (DNA de *A. platys*). A posição das amplificações verdadeiras (678 pb) esta indicada pela seta preta (lado direito). Produtos de menor tamanho (amplificações inespecíficas) indicado pela seta branca (lado esquerdo).

Como pode ser evidenciada na Figura 6, uma grande quantidade de ampliações inespecíficas com peso molecular muito próximo aos de *A. platys* (678pb), foi observada nas avaliações de todas as amostras testadas para esta espécie, gerando algumas dúvidas quanto à confirmação de um resultado positivo. Portanto, 18 amostras de resultado duvidoso foram reexaminadas para PCR de *A. platys* (DNA de *A. platys* 10⁻² como controle positivo) (Figura 7).

O gel (Figura 7) foi corrido por uma hora em uma voltagem constante de 75 volts. Isso resultou em uma separação mais eficiente das bandas, quando comparados com os géis anteriores, que foram corridos por 30 minutos com a mesma voltagem (ver fotos anteriores). Usando esse tempo maior de corrida da eletroforese, foi possível diferenciar claramente uma amplificação verdadeira de uma amplificação não específica.

Os resultados gerais encontrados nas PCR para os diferentes grupos e agentes estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultado das reações de PCR, para família Anaplasmataceae e para as espécies *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia canis* nos diferentes grupos, antes e depois do tratamento (continua).

Grupos	Pré Tratamento			Final do Tratamento				
	Família	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	Família	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
A (azitromicina)								
409813	+	-	-	+	+	-	-	+
044269	+	+	-	+	+	-	-	+
035582	+	+	-	+	+	-	-	+
080625	+	-	-	+	+	-	-	+
044364	+	-	-	+	+	-	-	+
035710	+	+	-	+	+	-	-	+
044170	+	-	-	+	-	-	-	-
298497	+	+	-	+	+	-	-	+
044103	+	-	-	+	+	-	-	+
044210	+	-	-	+	-	-	-	-
035811	+	-	-	+	+	-	-	+
044298	+	-	-	+	+	-	-	+
416929	-	-	-	+	+	-	-	+
B (enrofloxacina)								
274848	+	-	-	+	+	-	-	+
415434	+	-	-	+	+	-	-	+
028106	+	+	-	+	+	-	-	+
044309	+	-	-	+	-	-	-	+
393540	+	-	-	+	+	-	-	+
247112	+	-	-	+	-	-	-	-
035762	+	-	-	+	+	-	-	+
251534	+	-	-	+	+	-	-	+
300020	+	-	-	+	+	-	-	+
281310	+	-	-	+	+	-	-	+
261090	+	-	-	+	+	-	-	-
411429	+	+	-	+	+	-	-	+
044422	+	+	-	+	+	-	-	+

Tabela 3. (continuação)

Grupos	Pré Tratamento				Final do Tratamento			
	Família	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	Família	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
C (dipropionato de imidocab)								
389049	+	-	-	+	+	-	-	+
419842	+	-	-	+	óbito	óbito	óbito	óbito
258090	+	-	-	+	-	-	-	-
261153	+	-	-	+	+	+	-	+
291310	+	-	-	+	+	+	-	+
417245	+	+	-	+	+	+	-	+
414249	+	+	-	-	+	-	-	+
397470	+	-	-	+	+	+	-	+
419834	+	+	-	+	+	+	-	+
267388	+	-	-	+	-	-	-	-
290901	+	-	-	+	óbito	óbito	óbito	óbito
260688	+	-	-	+	+	-	-	+
415998	+	+	-	+	+	+	-	+
D (doxiciclina)								
035700	+	+	-	+	-	-	-	-
020412	+	-	-	+	-	-	-	-
044482	+	+	-	+	-	-	-	-
044066	+	-	-	+	-	-	-	-
035514	+	+	-	+	-	-	-	-
044319	+	-	-	+	-	-	-	-
390944	-	-	-	+	-	-	-	-
414618	+	-	-	+	-	-	-	-
421754	+	-	-	-	-	-	-	-
044083	+	-	-	+	-	-	-	-
281410	+	-	-	+	-	-	-	-
044279	+	-	-	+	-	-	-	-
E (oxitetraciclina LA)								
035582	+	-	-	+	-	-	-	-
080625	+	-	-	+	-	-	-	-
035710	+	-	-	+	-	-	-	-
274848	+	-	-	+	-	-	-	-
415434	+	-	-	+	-	-	-	-
393540	+	-	-	+	-	-	-	-
035762	+	-	-	+	-	-	-	-
251534	+	-	-	+	-	-	-	-
389049	+	-	-	+	-	-	-	-
261153	+	+	-	+	-	-	-	-
291310	+	+	-	+	-	-	-	-
417245	+	+	-	+	-	-	-	-
414249	+	-	-	+	-	-	-	-
397470	+	+	-	+	-	-	-	-
260688	+	-	-	+	-	-	-	-
415998	+	+	-	+	-	-	-	-

+ resultado positivo; - resultado negativo

Ao observarmos os resultados das PCR, percebemos que apenas dois animais (microchip 414249 do Grupo C e 421754 do Grupo D) não apresentaram resultado positivo para a presença de DNA de *E. canis* antes do tratamento, no entanto, ambos os animais apresentaram resultado positivo para DNA da Família Anaplasmataceae. Este achado pode ser explicado pela baixa quantidade de DNA do parasito circulante, como proposto por alguns autores (HARRUS et al., 1998c), ou devido à presença de outros membros da Família Anaplasmataceae. Este fato inclusive foi confirmado no animal 414249 do Grupo C, que apresentou PCR para *A. platys* positivo antes do tratamento, no entanto, este não pode ser considerado um caso isolado de anaplasmoze cíclica infecciosa canina, pois no exame realizado após sete dias do início do tratamento o animal apresentou PCR positivo para *E. canis*, caracterizando um caso de coinfeção por esses dois agentes.

Dezesseis animais 31,4% (n=51) apresentaram coinfeção por *E. canis* e *A. platys*. Três animais do grupo C (261153; 291310 e 397470) tiveram DNA de *A. platys* detectados somente após sete dias do início do tratamento, tal fato pode ser explicado pela natureza cíclica da parasitemia de *A. platys* que pode ter ocasionado uma redução da quantidade de parasitos (EDDLESTONE et al., 2007). Ainda sobre a parasitemia cíclica, esta também pode justificar o fato de que quatro animais do Grupo A (azitromicina), três animais do Grupo B (enrofloxacino) e um animal do Grupo C, que estavam positivos para *A. platys* na PCR, apresentaram resultado negativo na PCR após sete dias do início do tratamento. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que tenha ocorrido a eliminação do parasito frente à presença do antibiótico.

Apesar de Santos e colaboradores (2011) reportarem 18 casos de infecção por *A. phagocytophilum* em uma região muito próxima de onde este estudo foi conduzido, nenhuma coinfeção ou mesmo infecção isolada por *A. phagocytophilum* foi observada, estando todas as PCR realizadas negativas para a presença de DNA de *A. phagocytophilum*. Este fato pode ser justificado, pois os animais utilizados neste experimento são animais de canil, sem contato com animais externos ou errantes. Outro fator que pode justificar tais resultados é a possível baixa sensibilidade da técnica molecular empregada no diagnóstico de *A. phagocytophilum* como sugerem alguns autores (SANTOS et al., 2011).

4.2 Hematologia

4.2.1 Exame direto através de esfregaço sanguíneo

Foram encontradas inclusões celulares antes do início do experimento em cinco (n=51) animais 9,8% (Tabela 4), sabendo-se que todos estavam positivos para *E. canis* e alguns também apresentavam *A. platys*, este fato reforça a baixa eficiência e sensibilidade dessa técnica diagnóstica (RAMOS et al., 2009). Cabe ressaltar que todas as inclusões foram encontradas em esfregaço de capa leucocitária. Em apenas um animal foi encontrado inclusões em monócitos, nos demais todas as inclusões observadas foram em plaquetas e quando correlacionados com os resultados da PCR, evidenciou-se a presença de animais com inclusões em plaquetas e os mesmos eram negativos para a presença de *A. platys*. Isto pode ser explicado como sendo resultados falsos positivos para *A. platys*, pois diversos artefatos podem mimetizar a presença de *A. platys* em plaquetas (HARRUS et al., 1997a; MYLONAKIS et al., 2003). Outra explicação possível é que estas inclusões sejam de mórulas de *E. canis*, pois conforme relatado anteriormente, dependendo da fase da doença, inclusões de *E. canis* podem ser observadas em plaquetas (ALMOSNY, 1998).

Tabela 4. Resultado das avaliações dos esfregaços sanguíneos frente à presença de inclusões celulares de hemoparasitos da família Anaplasmataceae, antes e ao fim do tratamento.

Grupo A ¹	Inclusão celular (célula)		Grupo B ⁴	Inclusão celular (célula)		Grupo C ⁵	Inclusão celular (célula)		Grupo D ⁶	Inclusão celular (célula)		Grupo E ⁷	Inclusão celular (célula)	
	Pré ²	Fim ³		Pré	Fim		Pré	Fim		Pré	Fim		Pré	Fim
409813	-	-	274848	-	-	389049	-	-	035700	-	-	035582	-	-
044269	-	-	415434	-	-	419842	+P	Óbito	020412	-	-	080625	-	-
035582	-	-	028106	-	+P	258090	-	-	044482	-	-	035710	+P	-
080625	-	-	044309	-	-	261153	-	-	044066	-	-	274848	-	-
044364	-	-	393540	-	-	291310	-	-	035514	-	-	415434	-	-
035710	-	+P ⁸	247112	-	-	417245	-	-	044319	-	-	393540	-	-
044170	-	-	035762	+M ⁹	+P	414249	-	-	390944	-	-	035762	+P	-
298497	-	-	251534	-	-	397470	-	-	414618	-	-	251534	-	-
044103	+P	-	300020	-	-	419834	-	-	421754	-	-	389049	-	-
044210	-	+P	281310	-	-	267388	-	-	044083	-	-	261153	-	-
035811	-	-	261090	-	-	290901	-	Óbito	281410	-	-	291310	-	-
044298	-	-	411429	-	-	260688	-	-	044279	+P	-	417245	-	-
416929	+P	-	044422	-	-	415998	-	-				414249	-	-
												397470	-	-
												260688	-	-
												415998	-	-

¹Azitromicina; ²Pré-tratamento; ³Fim do tratamento; ⁴Enrofloxacino; ⁵Dipropionato de Imidocarb; ⁶Doxicilina; ⁷Oxitetraciclina longa ação; ⁸Plaqueta; ⁹Monócito

4.2.2 Hematimetria

Vale lembrar que ao se avaliar os resultados encontrados nesses parâmetros sete dias após início do tratamento (dia +7) nos Grupos A, B e C e comparando-os com o Grupo D (doxiciclina), constatou-se pouca ou nenhuma melhora nos parâmetros hematimétricos e da contagem de plaquetas, na maioria dos animais, gerando preocupação com os animais. Fato este que determinou a imediata intervenção no experimento, e alguns animais dos que apresentavam os piores parâmetros laboratoriais, foram realocados em um novo grupo (Grupo E) e outro protocolo terapêutico fora instituído.

Os resultados referentes à hematimetria, leucometria, plaquetometria e bioquímica sérica serão apresentados baseados nas médias dos grupos antes, com sete dias de tratamento e depois do tratamento. As médias foram estatisticamente comparadas. Os resultados serão listados a seguir e dispostos em formas de tabelas para melhor observação dos resultados (Tabelas 5-10), ao final de cada tópico, os resultados serão discutidos.

Com relação aos valores hematimétricos as médias do hematócrito, valor de referência: 37 – 55 % (KIRK; BONAGURA, 1992), antes do tratamento foram de 35,2±4,9 no Grupo A; 35,0±6,2 no Grupo B; 34,3±2,8 no Grupo C, 34,5±6,0 no Grupo D e 34,4±6,0 no Grupo E. Decorridos sete dias (dia +7) de tratamento, todas as médias de todos os grupos se elevaram, permanecendo assim até o fim do tratamento (dia +28), diferindo significativamente somente nos Grupos A, B e D (dia +7) e diferindo significativamente tanto no Grupo D quanto no E (dia +28) (Tabela 5).

Quanto ao número de hemácias, valor de referência: 5,5 – 8,5 x10⁶/μL (KIRK; BONAGURA, 1992), as médias de cada grupo foram: Grupo A (5,5±0,9); Grupo B (5,5±1,0); Grupo C (5,3±0,5); Grupo D (5,2±1,1) e Grupo E (5,4±0,9). Novamente todas as médias se elevaram, diferindo significativamente somente no Grupo A (dia +7) e nos Grupos D e E (dia +28) (Tabela 5).

Os valores do VCM se mantiveram dentro da normalidade em todos os grupos, não havendo diferenças significativas. Já com relação aos valores do CHCM estes também permaneceram dentro da normalidade por todo o experimento. No entanto, variações significativas foram observadas no Grupo B (dia +7) e no Grupo D (dia +28) (Tabela 5).

A respeito dos valores da hemoglobina, valor de referência: 12-18g/dL (KIRK; BONAGURA, 1992), todos os grupos apresentavam valores médios de hemoglobina abaixo da normalidade antes do tratamento: Grupo A (11,3±1,5); Grupo B (11,3±2,0); Grupo C (11,2±1,1); Grupo D (11,0±2,0) e Grupo E (11,2± 2,0). Elevações significativas foram observadas nos Grupos A, B e D (dia +7) e nos Grupos D e E (dia +28) (Tabela 6).

As médias da HCM permaneceram dentro da normalidade em todos os grupos durante todo o tratamento, observando-se diferença significativa apenas no Grupo E antes do tratamento e após sete dias de tratamento, devido a uma queda neste valor (Tabela 6).

Fazendo uma correlação com os resultados obtidos, ficou evidente a ocorrência de anemia em todos os grupos antes do tratamento e numa análise por animal, é facilmente observado que a maioria dos animais encontrava-se anêmica antes do tratamento. Este é um achado frequentemente associado à infecção por *E. canis* (NEER et al., 2002). O tratamento com doxiciclina e oxitetraciclina de longa ação por 28 dias reverteu a condição de anemia nesses grupos. No entanto, em uma avaliação individual, alguns animais permaneceram com valores abaixo da normalidade, podendo sugerir a presença de alguma outra enfermidade concomitante, apesar de nenhuma manifestação clínica ter sido observada.

Assim como ocorreu com o hematócrito, as médias do número de hemácias também se encontravam abaixo da normalidade ou próximas ao valor mínimo. É um consenso que tal achado pode ser muitas vezes associados à erliquiose monocítica canina (NEER et al., 2002). Após sete dias de tratamento todos os grupos já apresentavam esse parâmetro dentro da

normalidade e nos Grupos D e E foi claramente observada uma elevação nas médias após 28 dias.

Acompanhando a redução no número de hemácias, a média das hemoglobinas também estava reduzida antes do tratamento. Após sete dias de tratamento, três grupos já tinham normalizado esse parâmetro e nos dois grupos os quais o tratamento se estendeu até 28 dias, a hemoglobina havia se normalizado.

4.2.3 Leucometria e plaquetometria

Com relação à contagem do número de plaquetas todos os grupos apresentavam médias bem abaixo dos valores normais, valor de referência: 145000-440000/ μ L (KIRK; BONAGURA, 1992). Grupo A (62307 \pm 52886,5); Grupo B (46076 \pm 27034); Grupo C (75000 \pm 49056); Grupo D (47583 \pm 24057) e Grupo E (47875 \pm 21528). Em todos os grupos foi possível observar uma elevação no número de plaquetas. Diferenças significativas só foram observadas nos Grupos B (117153 \pm 91651), D (262333 \pm 78818) e E (249687 \pm 91873) (dia +7) e nos Grupos D (258666,7 \pm 87888) e E (251187 \pm 76051) (dia +28) (Tabela 7).

Numa análise mais detalhada, percebe-se aumento no número de plaquetas em todos os grupos. No entanto, a média do número de plaquetas nos grupos A, B e C não atingiu a normalidade. Em uma avaliação individual nota-se que a maioria dos animais nos Grupos A, B e C permaneceu com a contagem de plaquetas abaixo dos valores considerados normais, já nos Grupos D e E mesmo com apenas sete dias de tratamento, quase todos os animais do grupo voltaram a apresentar valores normais, mantendo suas médias dentro da normalidade. Após 28 dias, os Grupos D e E permaneciam com os valores médios dentro dos parâmetros normais.

A média da leucometria total, valor de referência = 6000-17000/ μ L (KIRK; BONAGURA, 1992), nos diferentes grupos foi de: Grupo A (7438 \pm 2741); Grupo B (7353 \pm 2597); Grupo C (8181 \pm 2359); Grupo D (7366 \pm 2804) e Grupo E (7012 \pm 3071). Aumentos significativos nesses valores foram observados somente nos Grupos D (10433 \pm 2364) e E (9281 \pm 2469) (dia +7) e novamente (dia +28) nos Grupos D(10483 \pm 3649) e E (12062 \pm 3888) (Tabela 7).

Os valores da contagem total de leucócitos em todos os grupos estavam dentro da normalidade antes do tratamento e assim permaneceram durante todo o tratamento. No entanto, percebe-se claramente um aumento nos valores médios após sete e 28 dias de tratamento nos Grupos D e E. Na análise individual dos animais, nota-se que todos os animais dos Grupos D e quase todos do Grupo E normalizaram seus parâmetros após sete dias de tratamento e após 28 dias todos os animais estavam com os valores normais. Já nos Grupos A, B e C, tais achados não foram observados, inclusive aumentando o número de animais abaixo da faixa de normalidade.

Assim como a anemia, a presença de trombocitopenia é um achado bastante significativo da infecção por *E. canis* (NEER, 2002) A redução no número de plaquetas foi identificada em quase todos os animais e esta foi revertida após sete dias nos animais tratados com doxiciclina bem como naqueles tratados com oxitetraciclina de longa ação. E apesar de ocorrer uma melhora desse parâmetro nos animais tratados sete dias com azitromicina, enrofloxacino e dipropionato de imidocarb, tais medicamentos não foram capazes de normalizar o número de plaquetas, o que pode sugerir uma ineficácia no tratamento conforme já relatado por alguns autores. (EDDLESTONE et al., 2006; NEER et al., 1999).

Tabela 5. Média dos valores do hematócrito, hemácias, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.

Grupo	Número de animais	N° Animais (+) PCR*		N° Animais (+) CL		Valores	Hematócrito(Ht) (%)			Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)			VCM (fL)			CHCM (g/dL)		
		Antes	Depois	Antes	Depois		pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28
Azitromicina	13	13	11	2	2	Média	35,2 ^a	37,1 ^b	-	5,5 ^a	5,9 ^b	-	63,8 ^a	62,9 ^a	-	32,3 ^a	32,4 ^a	-
						DP	4,9	4,9	-	0,9	0,8	-	2,8	1,3	-	0,8	0,8	-
						Abaixo	9	7	-	6	3	-	0	0	-	3	2	-
						Dentro	4	6	-	7	10	-	13	13	-	10	11	-
						Acima	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Enrofloxacina	13	12	11	1	2	Média	35,0 ^a	38,1 ^b	-	5,5 ^a	6,0 ^a	-	63,8 ^a	64,0 ^a	-	32,1 ^a	32,5 ^b	-
						DP	6,2	7,4	-	1,0	1,3	-	2,1	2,3	-	0,5	0,8	-
						Abaixo	8	7	-	6	4	-	0	1	-	5	2	-
						Dentro	5	6	-	7	9	-	13	12	-	8	11	-
						Acima	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Imidocarb	11	11	9	0	0	Média	34,3 ^a	36,5 ^a	-	5,3 ^a	5,7 ^a	-	64,4 ^a	64,6 ^a	-	32,4 ^a	32,5 ^a	-
						DP	2,8	2,3	-	0,5	0,4	-	2,5	1,9	-	0,8	0,6	-
						Abaixo	9	6	-	6	4	-	1	0	-	3	2	-
						Dentro	2	5	-	5	7	-	10	11	-	8	9	-
						Acima	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Doxiciclina	12	12	0	1	0	Média	34,5 ^a	38,0 ^b	39,9 ^b	5,2 ^a	5,8 ^a	6,1 ^b	66,4 ^a	65,8 ^a	65,2 ^a	32,0 ^a	32,1 ^a	32,6 ^b
						DP	6,0	6,7	5,2	1,1	1,1	0,9	3,1	2,9	2,9	0,7	0,6	0,4
						Abaixo	8	4	4	8	4	2	1	0	0	5	7	1
						Dentro	4	8	8	4	8	10	11	12	12	7	5	11
						Acima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxitetraciclina	16	16	0	2	0	Média	34,4 ^a	35,6 ^a	37,0 ^b	5,4 ^a	5,6 ^a	5,8 ^b	64,2 ^a	63,9 ^a	63,9 ^a	32,4 ^a	32,3 ^a	32,5 ^a
						DP	6,0	4,0	4,4	0,9	0,6	0,7	1,8	1,9	2,0	0,7	0,5	0,5
						Abaixo	10	8	6	8	6	5	1	1	1	3	3	3
						Dentro	6	8	10	8	10	11	15	15	15	13	13	13
						Acima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* - Positivo para *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* e/ou para família Anaplasmataceae

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$); CL = capa leucocitária; DP = desvio padrão

Valores de referência: Hematócrito = 37-55% e Hemácias = $5,5-8,5 \times 10^6/\mu\text{L}$ (KIRK; BONAGURA, 1992); VCM = 60-70fL e CHCM = 32-36g/dL (BUSH, 2004)

Tabela 6. Média dos valores da hemoglobina e da hemoglobina corpuscular média (HCM) dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.

Grupo	Número de animais	N° Animais (+) PCR*		N° Animais (+) CL		Valores	Hemoglobina (g/dL)			HCM (pg)		
		Antes	Depois	Antes	Depois		pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28
Azitromicina	13	13	11	2	2	Média	11,3 ^a	12,0 ^b	-	20,6 ^a	20,3 ^a	-
						DP	1,5	1,6	-	1,0	0,6	-
						Abaixo	9	7	-	0	0	-
						Dentro	4	6	-	13	13	-
						Acima	0	0	-	0	0	-
Enrofloxacina	13	12	11	1	2	Média	11,3 ^a	12,4 ^b	-	20,5 ^a	20,8 ^a	-
						DP	2,0	2,5	-	0,5	0,5	-
						Abaixo	8	7	-	0	0	-
						Dentro	5	6	-	13	13	-
						Acima	0	0	-	0	0	-
Imidocarb	11	11	9	0	0	Média	11,2 ^a	11,9 ^a	-	20,9 ^a	21,0 ^a	-
						DP	1,1	0,9	-	0,7	0,7	-
						Abaixo	9	6	-	0	0	-
						Dentro	2	5	-	11	11	-
						Acima	0	0	-	0	0	-
Doxiciclina	12	12	0	1	0	Média	11,0 ^a	12,2 ^b	13,0 ^b	21,2 ^a	21,2 ^a	21,3 ^a
						DP	2,0	2,3	1,7	1,0	0,9	1,1
						Abaixo	8	4	4	1	0	0
						Dentro	4	8	8	11	12	12
						Acima	0	0	0	0	0	0
Oxitetraciclina	16	16	0	2	0	Média	11,2 ^a	11,5 ^a	12,0 ^b	20,8 ^a	20,6 ^b	20,8 ^a
						DP	2,0	1,3	1,4	0,8	0,7	0,7
						Abaixo	10	9	6	0	1	0
						Dentro	6	7	10	16	15	16
						Acima	0	0	0	0	0	0

* - Positivo para *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* e/ou para família Anaplasmataceae

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$); CL = capa leucocitária; DP = desvio padrão

Valores de referência: Hemoglobina = 12-18g/dL (KIRK; BONAGURA, 1992); HCM = 19,5-24,5pg (BUSH, 2004)

Tabela 7. Média dos valores da contagem de plaquetas e dos leucócitos totais dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.

Grupo	Número de animais	N° Animais (+) PCR*		N° Animais (+) CL		Valores	Plaquetas (cél/s/ μ L)			Leucócitos (cél/s/ μ L)		
		Antes	Depois	Antes	Depois		pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28
Azitromicina	13	13	11	2	2	Média	62307 ^a	123076 ^a	-	7438 ^a	8330 ^a	-
						DP	52886	99675	-	2741	2906	-
						Abaixo	11	8	-	3	5	-
						Dentro	2	5	-	10	8	-
						Acima	0	0	-	0	0	-
Enrofloxacina	13	12	11	1	2	Média	46076 ^a	117153 ^b	-	7353 ^a	6092 ^a	-
						DP	27034	91651	-	2597	2112	-
						Abaixo	13	7	-	4	5	-
						Dentro	0	6	-	9	8	-
						Acima	0	0	-	0	0	-
Imidocarb	11	11	9	0	0	Média	75000 ^a	108000 ^a	-	8181 ^a	9300 ^a	-
						DP	49056	52155	-	2359	3002	-
						Abaixo	10	8	-	1	2	-
						Dentro	1	3	-	10	9	-
						Acima	0	0	-	0	0	-
Doxiciclina	12	12	0	1	0	Média	47583 ^a	262333 ^b	258666 ^b	7366 ^a	10433 ^b	10483 ^b
						DP	24057	78818	87888	2804	2364	3649
						Abaixo	12	2	2	5	0	0
						Dentro	0	10	10	7	12	11
						Acima	0	0	0	0	0	1
Oxitetraciclina	16	16	0	2	0	Média	47875 ^a	249687 ^b	251187 ^b	7012 ^a	9281 ^b	12062 ^b
						DP	21528	91873	76051	3071	2469	3888
						Abaixo	16	2	1	7	2	0
						Dentro	0	13	14	9	14	14
						Acima	0	1	1	0	0	2

* - Positivo para *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* e/ou para família Anaplasmataceae

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$); CL = capa leucocitária; DP = desvio padrão
Valores de referência: Plaquetas = 145000-440000/ μ L e Leucócitos = 6000-17000/ μ L (KIRK; BONAGURA, 1992)

Outro ponto importante a se destacar é que devido à trombocitopenia apresentada pelos cães, realizaram-se exames diagnósticos somente para as três espécies de riquetsias já descritas no Brasil parasitando cães, no entanto, sabe-se que outras enfermidades, bem como outros hemoparasitos, podem causar trombocitopenia. E apesar de alguns autores afirmarem que a trombocitopenia não pode ser o único fator para se diagnosticar erliquiose (MACIEIRA et al., 2005; SANTOS et al., 2009), a correlação da ausência de manifestações clínicas bem como, por exemplo, a não identificação da presença de forma evolutivas de outras hemoparasitoses no interior de eritrócitos, reforçaram fortemente a suspeita de erliquiose.

Já em relação à contagem total de leucócitos, vários animais apresentavam-se leucopênicos, achado compatível com erliquiose em sua fase crônica (MYLONAKIS et al., 2004). Sendo assim, após o término do tratamento (dia +28), todos os animais haviam retornado aos valores normais da contagem de leucócitos, reforçando a eficácia dos dois protocolos terapêuticos empregados nos Grupos D (doxiciclina) e E (oxitetraciclina de longa ação).

4.2.4 Bioquímica sérica

Na avaliação das médias das atividades séricas da fosfatase alcalina, valores de referência: 20-150 U/L (MEYER; COLES; RICH, 1995), teve-se os seguintes valores antes do tratamento: Grupo A (86,8±34,1); Grupo B (92,5±124,5); Grupo C (59,9±11,9); Grupo D (90,6±33,8) e Grupo E (68,9±17,1). Todas as médias estiveram dentro da normalidade. No entanto, uma redução significativa pode ser observada no Grupo D (76,6±29,3) (dia +7) e um aumento significativo no Grupo E (94,6±24,5) (dia +7) (Tabela 8).

Com relação à atividade sérica da ALT, valores de referência: 10-88 U/L (MEYER; COLES; RICH, 1995), as médias nos grupos antes do tratamento foram de: Grupo A (31,5±7,7); Grupo B (67,1±110,8); Grupo C (49,5±28,5); Grupo D (31,8±13,7) e Grupo E (33,8±11,6). Apenas no Grupo E (92,7±139,1) foi observada uma elevação significativa (dia +28).

Nos valores obtidos para AST, valores de referência: 10-88 U/L (MEYER; COLES; RICH, 1995), apenas um animal do Grupo E apresentou este parâmetro abaixo da normalidade. Todos os demais apresentaram AST dentro da normalidade. No entanto, elevações significativas nas médias dos grupos foram observadas nos Grupos B (21,2±14,4 para 23,8±16,0) (dia +7) e D (17,6±3,5 para 19,3±3,6) (dia +28) (Tabela 8).

Já com relação à atividade da GGT, valores de referência: 1-10 U/L (MEYER; COLES; RICH, 1995), numa avaliação inicial, apenas um animal apresentava este parâmetro elevado, e os valores médios nos diferentes grupos foram de: Grupo A (1,9±1,0); Grupo B (3,0±2,5); Grupo C (1,8±0,7), Grupo D (2,2±0,7) e Grupo E (0,9±0,7). Apenas o Grupo E (1,7±0,9) (dia +28) teve aumento significativo deste parâmetro, no entanto, a média do grupo estava dentro da normalidade. No grupo B (1,8±2,3) houve uma redução significativa neste parâmetro (dia +7) (Tabela 8).

O aumento significativo na atividade enzimática da ALT, ultrapassando os valores considerados normais para este parâmetro, somente ocorreu no grupo E. Ao se analisar esse parâmetro observou-se que esta elevação na média do grupo ocorreu devido a um único animal. No total, três animais apresentavam este valor elevado, sendo que um único animal apresentou o valor da ALT de 602 U/L, o que indicou uma lesão de origem hepática, tendo em vista a natureza dessa enzima. Ao avaliar os dados deste animal durante o decorrer do tratamento, verificou-se um aumento progressivo no valor deste parâmetro. Outras causas para tal lesão não foram identificadas. No entanto, não foram realizados exames de imagem para uma avaliação morfológica do fígado.

Apesar disso, não se pode deixar de atribuir essa alteração ao uso da oxitetraciclina de longa ação, no entanto, este seria um caso isolado, tendo em vista que nenhum outro animal deste grupo apresentou situação semelhante.

Apesar de na literatura ser encontrado relato de aumento da GGT (HARRUS et al., 1996), no presente estudo apenas um animal apresentou tal parâmetro aumentado.

Ainda sobre as avaliações bioquímicas, os valores médios referentes às concentrações séricas de creatinina, valores de referência: 0,5 – 1,5 mg/dL (BUSH, 2004), antes do tratamento foram de: Grupo A ($0,7 \pm 0,2$); Grupo B ($0,8 \pm 0,2$); Grupo C ($0,7 \pm 0,1$); Grupo D ($0,7 \pm 0,2$) e Grupo E ($0,7 \pm 0,2$). Todas as médias estavam e permaneceram dentro da normalidade, numa avaliação individual, somente dois animais, um animal do Grupo D e outro do Grupo E, tiveram concentrações acima da normalidade (dia +7). Permanecendo somente um animal com este valor elevado no Grupo E (dia +28). Apesar do pequeno número de animais fora dos parâmetros de normalidade, reduções significativas nas médias foram observadas nos Grupos B ($0,6 \pm 0,1$) e C ($0,6 \pm 0,1$) (dia +7). Por outro lado, uma elevação significativa na média foi observada no Grupo E ($0,9 \pm 0,2$) (dia +7) e também nos Grupos D ($0,9 \pm 0,1$) e E ($1,0 \pm 0,2$) (dia +28) (Tabela 9).

Analisando as médias das concentrações séricas da ureia, valores de referência = 15-40mg/dL (BUSH, 2004), alguns animais apresentavam esse parâmetro elevado antes do tratamento. No entanto, somente no Grupo B a média estava elevada. Os valores médios de cada grupo antes do tratamento foram de: Grupo A ($31,9 \pm 16,6$); Grupo B ($42,8 \pm 23,4$); Grupo C ($33,5 \pm 7,4$); Grupo D ($37,0 \pm 19,2$) e Grupo E ($36,5 \pm 16,7$). Um aumento significativo somente foi observado no Grupo E ($40,3 \pm 16,0$) (dia +7). Ao avaliar de forma individual percebe-se um aumento no número de animais com os parâmetros elevados no Grupo E (Tabela 9).

As concentrações séricas da ureia e da creatinina se elevaram após 28 dias do início do tratamento no grupo tratado com oxitetraciclina de longa ação, tais achados podem estar relacionados ao medicamento, visto que a oxitetraciclina em altas doses pode ser nefrotóxica (RIVIERE; SPOO, 2003).

Tabela 8. Média dos valores da fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamyl-transferase (GGT) dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.

Grupo	Número de animais	N° Animais (+) PCR*		N° Animais (+) CL		Valores	Fosfatase Alcalina (U/L)			ALT (U/L)			AST (U/L)			GGT (U/L)		
		Antes	Depois	Antes	Depois		pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28
Azitromicina	13	13	11	2	2	Média	86,8 ^a	89,8 ^a	-	31,5 ^a	36,2 ^a	-	22,7 ^a	21,8 ^a	-	1,9 ^a	2,2 ^a	-
						DP	34,1	40,2	-	7,7	13,7	-	8,4	3,4	-	1,0	1,3	-
						Abaixo	0	0	-	0	0	-	0	0	-	1	1	-
						Dentro	13	10	-	13	13	-	13	13	-	12	12	-
						Acima	0	3	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Enrofloxacina	13	12	11	1	2	Média	92,5 ^a	80,1 ^a	-	67,1 ^a	76,7 ^a	-	21,2 ^a	23,8 ^b	-	3,0 ^a	1,8 ^b	-
						DP	124,5	75,4	-	110,8	137,4	-	14,4	16,0	-	2,5	2,3	-
						Abaixo	0	0	-	0	0	-	0	0	-	1	4	-
						Dentro	12	12	-	12	12	-	13	13	-	11	9	-
						Acima	1	1	-	1	1	-	0	0	-	1	0	-
Imidocarb	11	11	9	0	0	Média	59,9 ^a	64,7 ^a	-	49,5 ^a	36,6 ^a	-	19,2 ^a	21,1 ^a	-	1,8 ^a	1,3 ^a	-
						DP	11,9	19,3	-	28,5	13,0	-	4,0	5,1	-	0,7	0,9	-
						Abaixo	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	2	-
						Dentro	11	11	-	10	11	-	11	11	-	11	9	-
						Acima	0	0	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-
Doxiciclina	12	12	0	1	0	Média	90,6 ^a	76,6 ^b	73,5 ^a	31,8 ^a	29,7 ^a	37,1 ^a	17,6 ^a	19,7 ^a	19,3 ^b	2,2 ^a	1,8 ^a	1,8 ^a
						DP	33,8	29,3	20,6	13,7	8,9	15,4	3,5	3,9	3,6	0,7	1,1	1,4
						Abaixo	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
						Dentro	11	11	12	12	12	12	12	12	12	12	11	9
						Acima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxitetraciclina	16	16	0	2	0	Média	68,9 ^a	94,6 ^b	85,9 ^a	33,8 ^a	41,4 ^a	92,7 ^b	19,6 ^a	22,3 ^a	19,3 ^a	0,9 ^a	1,3 ^a	1,7 ^b
						DP	17,1	24,5	33,2	11,6	31,8	139,1	4,1	9,1	5,2	0,7	0,6	0,9
						Abaixo	0	0	1	0	0	0	0	1	1	5	1	1
						Dentro	16	16	14	16	15	12	16	15	14	11	15	14
						Acima	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0

* - Positivo para *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* e/ou para família Anaplasmataceae

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05); CL = capa leucocitária; DP = desvio padrão

Valores de referência: Fosfatase Alcalina = 20-150U/L; ALT = 10-88U/L; AST = 10-88U/L; GGT = 1-10U/L (MEYER; COLES; RICH, 1995)

Tabela 9. Média dos valores da concentração sérica de ureia e creatinina dos animais estudados, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.

Grupo	Número de animais	N° Animais (+) PCR*		N° Animais (+) CL		Valores	Creatinina (mg/dL)			Ureia (mg/dL)		
		Antes	Depois	Antes	Depois		pré	dia +7	dia +28	pré	dia +7	dia +28
Azitromicina	13	13	11	2	2	Média	0,7 ^a	0,7 ^a	-	31,9 ^a	36,1 ^a	-
						DP	0,2	0,2	-	16,6	19,9	-
						Abaixo	0	0	-	0	0	-
						Dentro	13	13	-	12	12	-
						Acima	0	0	-	1	1	-
Enrofloxacina	13	12	11	1	2	Média	0,8 ^a	0,6 ^b	-	42,8 ^a	38,5 ^a	-
						DP	0,2	0,1	-	23,4	19,1	-
						Abaixo	0	0	-	0	0	-
						Dentro	13	13	-	9	10	-
						Acima	0	0	-	4	3	-
Imidocarb	11	11	9	0	0	Média	0,7 ^a	0,6 ^b	-	33,5 ^a	38,1 ^a	-
						DP	0,1	0,1	-	7,4	6,2	-
						Abaixo	0	0	-	0	0	-
						Dentro	11	11	-	8	6	-
						Acima	0	0	-	3	5	-
Doxiciclina	12	12	0	1	0	Média	0,7 ^a	0,7 ^a	0,9 ^b	37,0 ^a	43,9 ^a	35,8 ^a
						DP	0,2	0,3	0,1	19,2	28,8	10,6
						Abaixo	0	0	0	0	0	0
						Dentro	12	11	12	10	6	9
						Acima	0	1	0	2	6	3
Oxitetraciclina	16	16	0	2	0	Média	0,7 ^a	0,9 ^b	1,0 ^b	36,5 ^a	40,3 ^b	45,8 ^a
						DP	0,2	0,2	0,2	16,7	16,0	17,1
						Abaixo	0	0	0	0	0	0
						Dentro	16	15	14	13	11	7
						Acima	0	1	1	3	5	8

* - Positivo para *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* e/ou para família Anaplasmataceae

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$); CL = capa leucocitária; DP = desvio padrão
Valores de referência: Creatinina = 0,5-1,5mg/dL e Ureia = 15-40mg/dL (BUSH, 2004)

Com relação à creatinina quinase (CK), tendo em vista que esta é um indicador de lesão muscular, optou-se por avaliar os resultados desta enzima somente nos animais do Grupo E, a fim de verificar possíveis alterações musculares provenientes da aplicação e do mecanismo de ação da oxitetraciclina de longa ação por via intramuscular. A média entre os animais foram de 95,7±30,2 (pré-tratamento); 154,9±86,4 (dia +7) e de 81,8±21,3 (dia +28). Aumento significativo só foi observado com sete dias após o início do tratamento (Tabela 10).

Apesar de ter sido evidenciado um aumento significativo nesse parâmetro com sete dias de tratamento, este permaneceu dentro dos valores considerados normais, descartando-se assim, qualquer sinal de lesão muscular decorrente da aplicação de oxitetraciclina de longa ação.

Tabela 10. Média dos valores da concentração sérica da creatinina quinase dos animais tratados com oxitetraciclina, correlacionados aos resultados da PCR e do exame da capa leucocitária, antes e depois do tratamento.

Grupo	Número de animais	Nº Animais (+) PCR*		Nº Animais (+) CL		Valores	Creatinina Quinase (CK) (U/L)		
		Antes	Depois	Antes	Depois		pré	dia +7	dia +28
Oxitetraciclina	16	16	0	2	0	Média	95,7 ^a	154,9 ^b	81,8 ^a
						DP	30,2	86,4	21,3
						Abaixo	0	0	0
						Dentro	16	16	15
						Acima	0	0	0

* - Positivo para *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys* e/ou para família Anaplasmataceae

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05)

CL = capa leucocitária; DP = desvio padrão;

Valores de referência: CK= 0-460 U/L (KIRK; BONAGURA, 1992)

4.3 Eficácia dos Tratamentos

Quando avaliamos os resultados das PCR tem que se ressaltar que a avaliação para os grupos tratados com azitromicina, enrofloxacino e dipropionato de imidocarb foram realizadas com sete dias após o início do tratamento, no entanto dois animais no Grupo A, um animal no Grupo B e dois animais no Grupo C, os quais eram positivos para *E. canis* antes do tratamento, apresentaram resultados negativos após os mesmos. Tais resultados sugerem algum nível de eficácia na utilização desses protocolos terapêuticos, no entanto, apenas uma pequena parcela de animais respondeu ao tratamento. Apesar disso, fica a dúvida se um período mais longo na administração de tais fármacos poderia levar ao sucesso na eliminação de *E. canis*. Ressalta-se ainda que um fármaco que demora mais de uma semana para apresentar efeitos quanto à melhora clínica e laboratorial dos animais, não tem boa aceitação junto aos veterinários e proprietário.

Outro fator que pode ser atribuído a esses resultados é o fato de que o parasito, frente a uma concentração plasmática elevada de um fármaco, pode sair da circulação sanguínea se albergando em órgãos como baço ou medula óssea como proposto por alguns autores (HARRUS et al., 2008c). Por esse motivo, Harrus e colaboradores (2008c) propuseram que para uma completa avaliação do animal, deve ser incluído no diagnóstico, PCR de amostras de aspirado esplênico e de medula óssea. Neste estudo, todas as PCR realizadas foram baseadas em amostras de sangue periférico.

Para o autor, a proposta de coleta de amostras de outros órgãos do paciente, com certeza aumentaria as possibilidades de diagnóstico. No entanto, entende-se que esta seria uma avaliação experimental, tendo em vista as dificuldades de implementação dessa rotina no dia a dia do clínico veterinário.

Outro fato é que esta metodologia também não é totalmente eficaz, tendo em vista que Harrus e colaboradores (2008b), não detectaram DNA em tecido esplênico nem na medula óssea do animal, enquanto o mesmo apresentava-se positivo para *E. canis* em sangue periférico.

Com relação aos grupos tratados com doxiciclina e oxitetraciclina de longa ação, todos os animais tiveram resultados das PCR negativos para a presença de *E. canis* ou mesmo para membros da Família Anaplasmataceae após 28 dias de tratamento, demonstrando a eficácia dos mesmos. Este fato foi reforçado quando correlacionamos os achados da PCR com os hematológicos, no qual todos os parâmetros associados à erliquiose monocítica canina voltaram aos valores normais, principalmente as plaquetas que são um indicativo importante da recuperação do animal (HARRUS et al., 1998b). Portanto, ficou comprovada a eficácia da doxiciclina, corroborando outros autores (NEER et al., 2002; SCHAEFER et al., 2008), apesar de Harrus e colaboradores (1998b) sugerirem que a doxiciclina (10mg/kg VO SID 6 semanas) pode não ser suficiente em eliminar *E. canis*. No presente trabalho foi utilizado doxiciclina na dosagem de 20mg/kg (VO SID) por 28 dias. A escolha por esse regime foi porque no Brasil, utiliza-se amplamente o regime de 10mg/kg (VO BID), portanto optou-se por utilizar o dobro da dose em uma única administração visando facilitar o manejo. Também ficou comprovada a eficácia da oxitetraciclina de longa ação, corroborando Ogunkoya e colaboradores (1985). Entretanto, os referidos autores utilizaram a oxitetraciclina LA em intervalos de quatro dias e no presente trabalho o intervalo foi de sete dias, reduzindo a frequência de aplicações e minimizando o estresse do animal.

Apesar de alguns autores relatarem eficácia do dipropionato de imidocarb (SAINZ et al., 2000; NEER et al., 2002), o que pode justificar dois animais deste grupo terem apresentados resultados negativo na PCR após os sete dias de tratamento, os parâmetros hematológicos, principalmente o número de plaquetas, não normalizaram decorridos sete dias de tratamento, o que em animais tratados com a doxiciclina (terapêutica de escolha)

normalmente é observado em 24 a 48 horas (NEER et al., 2002). Se compararmos com o Grupo D (doxiciclina), quase todos os animais já apresentavam valores hematológicos dentro da normalidade após sete dias de tratamento. Apesar de Sainz e colaboradores (2000) relatarem demora no retorno dos parâmetros hematológicos em animais tratados com o dipropionato de imidocarb quando comparados com animais tratados com doxiciclina, optou-se pela intervenção imediata temendo a saúde dos animais. Até mesmo porque os dois animais que vieram a óbito durante o experimento, não apresentavam manifestações clínicas significativas, somente valores hematológicos reduzidos, assim como os demais animais.

Não foi possível estabelecer com precisão em que fase da doença os animais se encontravam, principalmente devido à falta de manifestações clínicas compatíveis e os achados laboratoriais variados.

Os achados observados no presente estudo demonstram a eficácia dos protocolos empregados, doxiciclina na dose de 20mg/Kg (VO SID 28 dias) e oxitetraciclina LA 10mg/Kg (IM) em intervalos de sete dias por 28 dias, na remissão da doença. Portanto, abrem-se novas perspectivas, com protocolos terapêuticos mais práticos, para a utilização em canis onde existem elevados níveis de desafio ambiental frente ao carrapato *R. sanguineus* e consequentemente também *E. canis*.

5 CONCLUSÕES

O enrofloxacino, o dipropionato de imidocarb e a azitromicina não apresentaram uma resposta terapêutica adequada quando comparados com a doxiciclina e a oxitetraciclina.

O enrofloxacino, o dipropionato de imidocarb e a azitromicina foram consideradas ineficazes no tratamento da erliquiose monocítica canina.

A doxiciclina na dose de 20 mg/kg administrada por via oral, uma única vez ao dia por 28 dias foi eficaz no tratamento da erliquiose monocítica canina.

A oxitetraciclina na dose de 20 mg/kg IM em quatro aplicações com intervalo de sete dias por 28 dias foi eficaz no tratamento da erliquiose monocítica canina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTARDANESH, B.; GHANBARPOUR, R.; SHARIFI, H. Comparative study of doxycycline and rifampin therapeutic effects in subclinical phase of canine monocytic ehrlichiosis. **Comparative Clinical Pathology**, v.20, n.5, p.461-465, 2011.

ALMOSNY, N.R.P. **Ehrlichia canis (DONATIEN & LESTOQUARD,1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. 1998. 200p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1998.

BAKER, D.C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S.D.; CORSTVET, R.E. Acute *Ehrlichia platys* Infection in the Dog. **Veterinary Pathology**, v.24, n.5, p.449-453, 1987.

BEALL, M.J.; CHANDRASHEKAR, R.; EBERTS, M.D.; CYR, K.E.; DINIZ, P.P.; MAINVILLE, C.; HEGARTY, B.C.; CRAWFORD, J.M. REITSCHWERDT, E.B. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n.4, p.455-464, 2008.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.566-571, 2009

BOWMAN, D.; LITTLE, S.E.; LORENTZEN, L.; SHIELDS, J.; SULLIVAN, M.P.; CARLIN, E.P. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1-2, p.138-148, 2009.

BROWN, G.K.; MARTIN, A.R.; ROBERTS, T.K.; AITKEN, R.J. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.79, n.8, p.554-558, 2001.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; HANCOCK, S.I. Doxycycline treatment and challenge infection with two *Ehrlichia canis* strains. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.11, n.2, p.132, 1997. American College of Veterinary Internal Medicine - Abstract

BUSH, B.M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. 1ed. São Paulo: ROCA, 2004, 376p.

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

CARLOS, R.S.A.; CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; ALMONSY, N.R.P.; ALBUQUERQUE, G.R. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.3, p.210-214, 2011.

CARRADE, D.D.; FOLEY, J.E.; BORJESSON, D.L.; SYKES, J.E. Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, n.5, p.1129-1141, 2009.

CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.C.T.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.1, p.73-86, 2004.

CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S.; WALKER, D.H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.3, p.589-595, 1994.

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

COUTO C.G. Doenças Rickettsiais In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais** 1ed.São Paulo: ROCA, 1998. p.139-142.

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, n.2 p.199-200, 1973.

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

COSTA-JR, Livio Martins. **Aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no Estado de Minas Gerais: utilização de métodos de diagnóstico direto, indireto e molecular**. 2007. 94p. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2007

DAVOUST, B.; MARIÉ, J.L.; MERCIER, S.; BONI, M.; VANDEWEGHE, A.; PARZY, D.; BEUGNET, F. Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v.112, n.1-2, p.91-100, 2003.

DAVOUST, B.; KEUNDJIAN, A.; ROUS, V.; MAURIZI, L.; PARZY, D. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n.3-4, p.279-283, 2005)

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

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, 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, p.2145-2165, 2001.

EDDLESTONE, S.M.; NEER, T.M.; GAUNT, S.D.; CORSTVET, R.; GILL, A.; HOSGOOD, G.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E.B. Failure of Imidocarb Dipropionate to Clear Experimentally Induced Ehrlichia canis Infection in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, n.4, p.840-844, 2006.

EDDLESTONE, S.M.; GAUNT, S.D.; NEER, T.M.; BOUDREAUX, C.M.; GILL, A.; HASCHKE, E.; CORSTVET, R.E. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. **Experimental Parasitology**, v.115, n.2, p.205-210, 2007.

EGENVALL, A.E.; HEDHAMMAR, A.A.; BJOERSDORFF, A.I. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. **Veterinary Record**, v.140, n.9, p.222-226, 1997.

FOGGIE, A. Studies on tick-borne fever. **Journal of General Microbiology**. III: Proceedings, v-vi. 1949.

FOLEY, J.E.; FOLEY, P.; MADIGAN, J.E. Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.10, p.1599-1605, 2001.

GAL, A.; HARRUS, S.; ARCOH, I.; LAVY, E.; AIZENBERG, I.; MEKUZAS-YISASCHAR, Y.; BANETH, G. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v.48, n.6, p.619-622, 2007.

GLAZE, M.B.; GAUNT, S.D. Uveitis associated with Ehrlichia platys infection in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.189, n.8, p.916-917, 1986.

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

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

HARRUS, S.; WARIER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v.66, n.3-4, p.241-249, 1996.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BAR, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record** v.141, n.10, p.247-250, 1997a.

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v.141, p.360-363, 1997b

HARRUS, S.; OFRI, R.; AIZEMBERG, I.; WANER, T. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by Ehrlichia canis infection. **Veterinary Parasitology**, v.78, n.2, p.155-160, 1998a.

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

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, 1998c.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A.W. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.9, p.2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of Simultaneous Splenic Sample PCR with Blood Sample PCR for Diagnosis and Treatment of Experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.11, p.4488-4490, 2004.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v.187, p.292-296, 2011.

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

HOSKINS, J.D.; BREITSCHWERDT, E.B.; GAUNT, S.D.; FRENCH, T.W.; BURGDORFER, W. Antibodies to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys*, and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.2, n.2, p.55-59, 1988.

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; AMYX, H.L.; FERGUSON, J.A. Epizootiology of Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of Wildlife Diseases**, v.6, n.4, p.220-225, 1970.

INOKUMA, H.; FUJII, K.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M.; ONISHI, T. Demonstration of Anaplasma (*Ehrlichia*) *platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.110, n.1-2, p.145-152, 2002.

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

JENSEN, J.; SIMON, D.; ESCOBAR, H.M.; SOLLER, J.T.; BULLERDIEK, J.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; NOLTE, I. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. **Zoonoses and Public Health**, v.54, n.2, p.94-101, 2007.

KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Current Veterinary Therapy XI: Small Animal Practice**. ed. Philadelphia: Saunders. 1992, 1349p.

KIRTZ, G.; MELI, M.; LEIDINGER, E.; LUDWIG, P.; THUM, D.; CZETTEL, B.; KÖLBL, S.; LUTZ, H. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: Identifying the causative agent using PCR. **The Journal of Small Animal Practice**, v.46, n.6, p.300-303, 2005.

KOMNENOU, A.A.; MYLONAKIS, M.E.; KOUTI, V.; TENDOMA, L.; LEONTIDES, L.; SKOUNTZOU, E.; DESSIRIS, A.; KOUTINAS, A.F.; OFRI, R. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n.3, p.137-142, 2007.

KOHN, B.; GALKE, D.; BEELITZ, P.; PFISTER, K. Clinical features of canine granulocytic ehrlichiosis in 18 naturally infected dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, n.6, p.1289-1295, 2008.

KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; SOUTHWICK, K.L.; COLITZ, C.M.; HANCOCK, S.I.; BRADLEY, J.M.; RUMBOUGH, R. McPHERSON, J.T.; MacCORMACK, J.N. Coinfection with Multiple Tick-Borne Pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2631-2638, 1999

LABARTHE, N.; PEREIRA, M. C.; BARBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi* Infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**. 4 (1): 67- 75, 2003.

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

LESTER, S.J.; BREITSCHWERDT, E.B.; COLLIS, C.D.; HEGARTY, B.C. Anaplasma phagocytophilum infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. **The Canadian Veterinary Journal**; v.46, n.9, p.825-827, 2005.

MACHADO, R.Z.; DUARTE, J.M.B.; DAGNONE, A.S.; SZABO, M.P.J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v.139, n.1-3, p.262-266, 2006

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

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

MARTIN, A.R.; BROWN, G.K.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, v.109, n.3, p.176-180, 2005.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.G. Comparison of PCR Assays for Detection of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.717-722, 2003.

MATHEW, J.S.; EWING, S.A.; MURPHY, G.L.; KOCAN, K.M.; CORSTVET, R.E.; FOX, J.C. Characterization of a new isolate of *Ehrlichia platys* (Order Rickettsiales) using electron microscopy and polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.68, n.1-2, p.1-10, 1997.

MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Erliquiose Canina: Alterações Hematológicas em Cães Domésticos Naturalmente Infectados. **Bioscience Journal**, v.21, n.1, p.167-174, 2005.

MEYER D.J., COLES E.H., RICH L.J. **Medicina de laboratório veterinária: Interpretação e diagnóstico**. 1ed. São Paulo: ROCA, 1995, 320p.

M'GHIRBI, Y.; GHORBEL, A.; AMOURI, M.; NEBAOUI, A.; HADDAD, S.; BOUATTOUR, A. Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. **Parasitological Research**, v.104, n.4, p.767-774, 2009.

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

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

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; BILLINIS, C.D.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.S. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.40, n.3, p.174-184, 2004.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects, **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.766-770, 2008.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; FERRO, J.A.; LABRUNA, M.B.; CHRYSSEAFIDIS, A.L.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.2, p 75-79, 2010.

NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16,n.3, p.309-315, 2002.

NEER, T.M.; EDDLESTONE, S.M.; GAUNT, S.D.; CORSTVET R.E. Efficacy of Enrofloxacin for the treatment of Experimentally Induced *Ehrlichia canis* Infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, n.5, p.501-504, 1999.

OGUNKOYA, A.B.; ADEYANJU, J.B.; ABDUHLLAHI, R. Experimental and clinical trials of long acting oxytetracycline in the treatment of canine ehrlichiosis. **The Veterinary Quarterly**, v.7, n.2, p.158-161, 1985.

OLIVEIRA, L.S.; OLIVEIRA, K.A.; MOURÃO, L.C.; PESCATORE, A.M.; ALMEIDA, M.R.; CONCEIÇÃO, L.G.; GALVÃO, M.A.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, n.2, p.55-56, 2009.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; TESTINI, G.; LATROFA, M.S.; WEIGL, S.; CANTACESSI, C.; MENCKE, N.; CAPRARIIS, D.; PARISI, A.; CAPELLI, G.; STANNECK, D. Application of 10% imidacloprid/ 50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 3-4, p.320-328, 2008.

PEREZ M.; RIKIHISA Y.; WEN B. *Ehrlichia canis*-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and Genetic Characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2133–2139, 2006

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG C.; XIONG Q.; RIKIHISA, Y Human Infection with *Ehrlichia canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1078, p.110-117, 2006.

POITOUT, F.M.; SHINOZAKI, J.K.; STOCKWELL, P.J.; HOLLAND, C.J.; SHUKLA, S.K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.796-801, 2005.

RIVIERE, J.E.; SPOO, J.W. Antibióticos Tetraciclínicos In: ADAMS, H.R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária** 8ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2003. P.692-702.

SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M.A. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n.4, p.382-384, 1999.

SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.A.; OLIVEIRA, L.P.; ROBERTO, P.G.; BENEDETTI, R.B.R.; ZUCOLOTO, L.B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia spp.* In dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v.179, n.1, p.145-148, 2009.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.4, p.770-774, 2011.

SAINZ, A.; TESOURO, M.A.; AMUSATEGUI, I.; RODRÍGUEZ, F.; MAZZUCHELLI, F.; RODRÍGUEZ, M. Prospective Comparative Study of 3 Treatment Protocols Using Doxycycline or Imidocarb Dipropionate in Dogs with Naturally Occurring Ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, n.2, p.134-139, 2000.

SALGADO, Fabiana Pessoa. **Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do centro de controle de zoonoses de Campo Grande Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2006. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, MS, 2006.

SCHAEFER, J.J.; KAHN, J.; NEEDHAM, G.R.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; STICH, R.W. Antibiotic Clearance of *Ehrlichia canis* from Dogs Infected by Intravenous Inoculation of Carrier Blood. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.263-269, 2008

SHAW, S.E.; DAYB, M.J.; BIRTLESC, R.J.; BREITSCHWERD, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v. 17, p.74-80, 2001.

SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER, L.; WANER, T.; HARRUS, S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v.153, n.1-2, p.131-138, 2008.

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 Of Veterinary Research**, v.52, n.9, p.1537-1541, 1991.

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

SPARAGANO, O.A.E.; de VOS, A.P. PAOLETTI, B.; CAMMÀ, C.; de SANTIS, P.; OTRANTO, D.; GIANGASPERO, A. Molecular evaluation of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, n.6, p.527-534, 2003.

STOCKHAM, S.L.; SCHMIDT, D.A.; CURTIS, K.S.; et al. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi*. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.1, p.63-68, 1992.

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

TENG, C.H.; PALANIAPPAN, R.U.M.; CHANG, Y.F. Cloning and characterization of an *Ehrlichia canis* gene encoding a protein located to the morula membrane. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 4, p.2218-2225, 2003.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle. **Veterinary Parasitology**, v.69, n.3-4, p.307-317, 1997.

WANER, T.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis (CME) In: Recent Advances in Canine Infectious Disease. 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/waner/ivis.pdf>. Acesso em: 19 de março de 2012.

WANER, T.; STRENGER, C.; KEYSARY, A.; HARRUS, S. Kinetics of serologic cross-reaction between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.66, n.3-4, p.237-243, 1998.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial Diseases of Dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, n.1, p.75-98, 1991.

VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; SANTO, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.V.P.; MORAIS, H.A.; MESSIK, J.B.; LABRUNA, M.B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.1, p.1-12, 2011.

ZHANG, L.; LIU, Y.; NI, D.; LI, Q.; YU, Y.; YU, X.J.; WAN, K.; LI, D.; LIANG, G.; JIANG, X.; JING, H.; RUN, J.; LUAN, M.; FU, X.; ZHANG, J.; YANG, W.; WANG, Y.; DUMLER, J.S.; FENG, Z.; REN, J.; XU, J. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. **The Journal of the American Medical Association**, v.300, n.19, p.2263-2270, 2008.

7 ANEXOS

ANEXO A. Tampão para Eletroforese TAE (10X)

Reagentes

48,4g de TRIS base tris(hidroximetil)aminometano;

11,4mL de ácido acético glacial (17.4 M);

3,7g de solução de EDTA dissódico;

Água destilada;

ANEXO B. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo A (azitromicina), antes do tratamento

Grupo A (Azitromicina) - Pré-Tratamento (Dia - 3)															
Animal	Leuc. (/μL)	He (x10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/μL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
409813	6000	3.51	7.6	22.4	63.8	21.7	33.9	2000	46	33	18	104	3	1.2	88
044269	6600	4.34	10.2	31.7	73.0	23.5	32.2	12000	136	36	21	140	2	0.6	22
035582	5200	4.82	9.4	30.4	63.1	19.5	30.9	15000	91	37	22	173	1	0.6	20
080625	3300	5.76	11.6	36.1	62.7	20.1	32.1	12000	69	30	16	71	0	0.6	30
044364	8300	6.42	12.6	40.7	63.4	19.6	31.0	30000	92	28	21	239	2	0.6	27
035710	7700	5.47	11.0	34.5	63.1	20.1	31.9	30000	82	17	26	226	2	0.6	21
044170	8600	5.97	12.1	37.2	62.3	20.3	32.5	86000	142	39	27	274	3	0.6	31
298497	6900	5.83	11.7	35.8	61.4	20.1	32.7	77000	48	21	20	129	2	0.6	29
044103	4300	5.42	11.3	35.2	64.9	20.8	32.1	29000	97	46	23	145	1	0.8	32
044210	8800	6.04	12.4	37.8	62.6	20.5	32.8	161000	87	27	17	168	1	0.6	28
035811	9900	5.65	11.8	35.5	62.8	20.9	33.2	136000	45	26	21	88	2	0.7	27
044298	8500	6.96	13.8	43.0	61.8	19.8	32.1	153000	142	40	49	1662	4	0.7	32
416929	14700	5.46	11.5	34.9	63.9	21.1	33.0	149000	52	30	14	140	2	0.6	28

ANEXO C. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo A (azitromicina), após sete dias de tratamento

Grupo A (Azitromicina) - Pós-Tratamento (Dia + 7)															
Animal	Leuc. (/µL)	He (x10 ⁶ /µL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/µL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
409813	5800	3,87	8,4	24,5	63,3	21,7	34,3	41000	42	71	27	*	1,2	2	104
044269	4500	5,31	11,1	34,6	65,2	20,9	32,1	4000	157	33	21	*	0,6	3	29
035582	5300	5,44	10,7	34,6	63,6	19,7	30,9	27000	83	28	20	116	0,6	0	31
080625	5600	5,66	11,1	34,3	60,6	19,6	32,4	49000	68	28	15	66	0,6	2	28
044364	13000	6,19	12,5	39,0	63,0	20,2	32,1	172000	62	29	20	218	0,6	1	27
035710	5900	5,54	11,2	35,3	63,7	20,2	31,7	13000	108	23	23	128	0,7	1	34
044170	11700	7,07	14,3	43,6	61,7	20,2	32,8	227000	151	60	28	227	0,6	5	37
298497	8300	5,80	11,5	35,8	61,7	19,8	32,1	90000	66	24	19	75	0,6	2	27
044103	10000	6,29	12,8	39,8	63,3	20,3	32,2	331000	74	37	22	*	0,6	2	30
044210	8000	6,76	14,1	42,2	62,4	20,9	33,4	274000	105	43	22	181	0,6	4	29
035811	10100	5,86	12,1	37,0	63,1	20,6	32,7	108000	44	27	21	*	0,6	2	33
044298	6800	7,25	14,2	44,4	61,2	19,6	32,0	151000	155	34	26	480	0,6	3	36
416929	13300	5,71	11,9	36,9	64,6	20,8	32,3	113000	52	33	19	110	0,6	1	24

* Amostra perdida

ANEXO D. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo B (enrofloxacino), antes do tratamento

Grupo B (Enrofloxacino) - Pré-Tratamento (Dia - 3)															
Animal	Leuc. (/µL)	He (x10 ⁶ /µL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/µL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
274848	4500	4,23	8,8	27,8	65,7	20,8	31,7	1000	50	73	22	89	3	0,7	27
415434	9800	4,68	9,8	31,1	66,5	20,9	31,5	12000	37	24	17	158	2	0,6	33
028106	7900	7,13	14,5	44,2	62,0	20,3	32,8	34000	41	34	14	70	2	0,8	38
044309	6800	6,57	12,9	40,3	61,3	19,6	32,0	49000	64	38	21	107	3	0,6	24
393540	4900	3,55	7,2	22,0	62,0	20,3	32,7	44000	23	26	12	85	0	1,4	115
247112	7400	5,57	11,5	34,9	62,7	20,6	33,0	79000	49	40	20	85	4	0,7	35
035762	4200	6,72	13,7	42,9	63,8	20,4	31,9	58000	76	32	18	95	3	0,8	62
251534	7200	5,62	11,3	35,2	62,6	20,1	32,1	12000	81	43	15	72	2	0,8	46
300020	4200	5,96	12,6	38,2	64,1	21,1	33,0	158000	64	11	14	91	2	0,7	36
281310	14500	4,86	10,4	33,3	68,5	21,4	31,2	83000	53	58	16	81	2	0,7	36
261090	6600	5,36	11,3	35,6	66,4	21,1	31,7	88000	519	447	70	241	11	0,7	25
411429	8400	4,52	9,3	28,6	63,3	20,6	32,5	31000	51	26	17	76	2	1	52
044422	5400	6,42	13,2	40,3	62,8	20,6	32,8	42000	94	20	20	186	3	0,6	27

ANEXO E. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo B (enrofloxacino), após sete dias de tratamento

Grupo B (Enrofloxacino) - Pós-Tratamento (Dia + 7)															
Animal	Leuc. (/µL)	He (x10 ⁶ /µL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/µL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
274848	3100	4,82	10,0	31,2	64,7	20,7	32,1	14000	38	65	22	98	2	0,7	38
415434	2500	4,99	10,4	32,3	64,7	20,8	32,2	17000	63	26	17	122	1	0,5	28
028106	7900	8,20	16,4	49,1	59,9	20,0	33,4	281000	48	43	18	66	3	0,7	35
044309	6500	7,27	14,6	43,7	60,1	20,1	33,4	245000	85	38	19	109	3	0,6	37
393540	4200	3,22	7,1	21,4	66,5	22,0	33,2	22000	36	23	17	89	0	0,9	96
247112	7700	5,80	12,1	36,5	62,9	20,9	33,2	82000	51	26	18	89	1	0,7	40
035762	3700	7,00	14,5	45,1	64,4	20,7	32,2	38000	69	69	29	108	1	0,7	58
251534	9300	5,56	11,7	36,1	64,9	21,0	32,4	20000	74	37	18	85	1	0,6	25
300020	5000	6,36	13,2	40,2	63,2	20,8	32,8	152000	69	14	18	84	0	0,6	28
281310	6500	5,45	11,4	37,2	68,3	20,9	30,6	102000	52	61	20	124	2	0,6	41
261090	7900	5,56	11,7	36,8	66,2	21,0	31,8	163000	337	549	78	131	9	0,6	25
411429	6400	5,64	11,8	36,1	64,0	20,9	32,7	148000	55	29	16	79	0	0,6	30
044422	8500	7,93	16,3	49,4	62,3	20,6	33,0	239000	64	17	20	124	0	0,5	19

ANEXO F. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo c (dipropionato de imidocarb), antes do tratamento

Grupo C (Dipropionato de Imidocarb) - Pré-Tratamento (Dia - 3)															
Animal	Leuc. (/µL)	He (x10 ⁶ /µL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/µL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
389049	6500	4,65	9,7	30,6	65,8	20,9	31,7	11000	55	47	26	67	2	0,7	38
419842	10600	3,99	8,2	26,0	65,2	20,6	31,5	5000	57	25	21	85	1	1	40
258090	5500	4,16	8,8	28,5	68,5	21,2	30,9	13000	74	28	15	162	1	0,7	29
261153	6400	5,16	10,7	33,3	64,5	20,7	32,1	16000	58	43	20	88	1	0,7	45
291310	10500	5,93	12,5	38,2	64,4	21,1	32,7	82000	62	28	13	81	2	0,6	25
417245	7800	5,65	11,8	36,0	63,7	20,9	32,8	37000	64	34	19	118	2	0,7	27
414249	9800	5,36	11,8	36,3	67,7	22	32,5	80000	50	46	18	148	2	0,8	23
397470	6900	5,18	10,5	32,6	62,9	20,3	32,2	64000	55	46	23	147	1	0,9	44
419834	8100	5,69	11,9	35,5	62,4	20,9	33,5	114000	42	46	14	60	3	0,6	32
267388	14100	5,38	10,8	33,9	63,0	20,1	31,9	138000	44	62	23	82	2	0,7	34
290901	9400	3,97	8,1	25,3	63,7	20,4	32,0	45000	77	49	23	69	4	1,2	125
260688	6400	5,63	12,5	37,3	66,3	22,2	33,5	116000	79	30	23	220	1	0,6	42
415998	8000	5,99	11,8	35,6	59,4	19,7	33,1	154000	76	134	17	110	3	0,7	30

ANEXO G. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo C (dipropionato de imidocarb), após sete dias de tratamento

Grupo C (Dipropionato de Imidocarb) - Pós-Tratamento (Dia + 7)															
Animal	Leuc. (/μL)	He (x10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/μL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
389049	9700	5,25	10,9	33,8	64,4	20,8	32,2	27000	60	60	25	115	1	0,6	35
419842**															
258090	8500	5,90	12,6	38,3	64,9	21,4	32,9	208000	60	22	16	90	2	0,6	44
261153	5400	5,52	11,8	36,3	65,8	21,4	32,5	61000	59	44	23	126	0	0,7	45
291310	10900	5,94	12,6	38,0	64,0	21,2	33,2	125000	102	32	22	88	0	0,6	39
417245	9000	5,35	11,2	35,3	66,0	20,9	31,7	64000	66	23	15	70	2	0,5	27
414249	11900	5,74	12,7	38,1	66,4	22,1	33,3	73000	71	34	28	192	1	0,7	32
397470	5800	6,19	12,6	38,4	62,0	20,4	32,8	68000	63	56	31	149	1	0,8	48
419834	9200	6,25	13,3	39,9	63,8	21,3	33,3	127000	34	27	16	66	3	0,7	42
267388	16500	5,71	11,4	35,7	62,5	20,0	31,9	154000	38	50	21	107	1	0,6	41
290901**															
260688	6200	5,36	11,8	36,6	68,3	22,0	32,2	113000	95	31	18	106	1	0,5	34
415998	9200	5,08	10,1	31,6	62,2	19,9	32,0	168000	64	24	17	70	2	0,6	32

** Óbito

ANEXO H. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo D (doxiciclina), antes do tratamento

Grupo D (Doxiciclina) - Pré-Tratamento (Dia - 3)															
Animal	Leuc. (/µL)	He (x10 ⁶ /µL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/µL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
035700	6900	4,50	9,1	30,3	67,3	20,2	30,0	152000	129	45	26	255	2	0,6	17
020412	2900	5,04	10,8	34,1	67,7	21,4	31,7	29000	72	20	15	93	2	0,6	24
044482	5400	5,47	11,2	35,2	64,4	20,5	31,8	15000	135	62	14	72	3	0,6	23
044066	9100	6,34	13,6	42,0	66,2	21,5	32,4	49000	133	48	21	131	2	0,5	36
035514	12000	5,82	12,8	39,3	67,5	22,0	32,6	60000	97	26	22	301	3	0,8	39
044319	8800	7,01	13,6	41,8	59,6	19,4	32,5	54000	112	16	13	75	3	0,9	36
390944	8800	3,81	8,6	26,2	68,8	22,6	32,8	70000	63	27	20	152	1	0,8	31
414618	9100	4,62	9,6	30,0	64,9	20,8	32,0	89000	16	17	19	93	2	1	84
421754	13300	6,56	13,1	39,4	60,1	20,0	33,2	119000	54	26	20	100	2	0,9	71
044083	4100	4,52	9,9	30,6	67,7	21,9	32,4	16000	110	30	13	90	3	0,8	21
281410	5200	5,27	11,7	36,5	69,3	22,2	32,1	47000	114	48	17	120	2	0,5	24
044279	4700	4,96	10,9	35,2	71,0	22,0	31,0	57000	74	23	14	114	1	0,5	23
035700	6900	4,50	9,1	30,3	67,3	20,2	30,0	152000	107	38	23	178	2	0,5	32

ANEXO I. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo D (doxiciclina), após sete dias de tratamento

Grupo D (Doxiciclina) - Pós-Tratamento (Dia + 7)															
Animal	Leuc. (/µL)	He (x10 ⁶ /µL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/µL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
035700	14000	3,71	7,6	24,4	65,8	20,5	31,1	212000	93	53	26	*	3	0,6	30
020412	6200	5,80	12,1	38,0	65,5	20,9	31,8	319000	90	23	24	*	1	0,6	49
044482	9400	6,43	12,9	40,5	63,0	20,1	31,9	364000	78	35	16	76	2	0,5	22
044066	13700	6,65	14,3	44,4	66,8	21,5	32,2	193000	98	37	22	*	2	0,6	29
035514	10100	6,54	14,3	42,3	63,7	21,9	33,8	311000	85	38	23	*	2	0,6	42
044319	12600	7,42	14,5	45,4	61,2	19,5	31,9	278000	86	29	22	116	4	0,7	47
390944	10600	4,39	10,0	31,3	71,3	22,8	31,9	327000	55	25	17	*	1	0,7	30
414618	10000	4,15	8,8	27,8	67,0	21,2	31,7	133000	17	15	19	71	0	1,8	134
421754	11000	5,39	11,0	33,9	62,9	20,4	32,4	230000	43	25	19	97	1	0,6	45
044083	11700	6,45	13,6	41,4	64,2	21,1	32,9	364000	77	22	13	70	3	0,6	28
281410	6300	6,40	14,4	44,7	69,8	22,5	32,2	128000	131	47	21	*	3	0,6	30
044279	9600	6,13	13,3	41,7	68,0	21,7	31,9	289000	53	22	14	*	1	0,6	23
035700	14000	3,71	7,6	24,4	65,8	20,5	31,1	212000	106	38	26	232	1	0,6	48

* Amostra perdida

ANEXO J. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo D (doxiciclina), após 28 dias de tratamento

Grupo D (Doxiciclina) - Pós-Tratamento (Dia + 28)															
Animal	Leuc. (/µL)	He (x10 ⁶ /µL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (cél/s/µL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
035700	11500	5,71	11,4	35,8	62,7	20,0	31,8	402000	98	42	23	287	3	0,8	30
020412	7900	6,40	13,3	40,8	63,8	20,8	32,6	381000	73	21	19	179	2	1,0	39
044482	8400	7,04	13,8	43,1	61,2	19,6	32,0	323000	78	34	16	116	1	0,8	20
044066	11600	6,64	14,2	43,8	66,0	21,4	32,4	249000	80	38	23	244	0	0,8	38
035514	6100	6,75	15,3	46,4	68,7	22,7	33,0	120000	85	81	23	199	3	0,9	41
044319	17700	7,28	14,8	44,7	61,4	20,3	33,1	303000	60	26	17	101	4	0,9	28
390944	9200	4,03	9,4	28,6	71,0	23,3	32,9	195000	66	47	24	181	3	0,9	28
414618	7400	5,36	11,3	35,0	65,3	21,1	32,3	198000	35	25	20	100	0	0,9	63
421754	12400	5,99	12,5	38,2	63,8	20,9	32,7	268000	54	32	21	261	2	0,7	36
044083	16900	5,61	11,9	35,6	63,5	21,2	33,4	319000	82	39	13	160	0	1,0	42
281410	6100	6,75	15,3	46,4	68,7	22,7	33,0	120000	117	44	20	202	4	0,9	30
044279	10600	6,10	13,1	40,3	66,1	21,5	32,5	226000	56	23	13	97	1	0,8	25
035700	11500	5,71	11,4	35,8	62,7	20,0	31,8	402000	96	35	22	242	1	0,9	39

ANEXO K. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo E (oxitetraciclina LA), antes do tratamento

Grupo E (Oxitetraciclina LA) - Pré-Tratamento (Dia - 3)															
Animal	Leuc. (/μL)	He (x10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (célis/μL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
035582	4800	5,01	9,9	31,8	63,5	19,8	31,1	25000	82	27	22	177	1	0,7	35
080625	7300	6,5	12,7	38,9	59,8	19,5	32,6	67000	85	30	21	93	0	0,7	32
035710	7300	5,76	11,4	36,2	62,8	19,8	31,5	56000	98	24	25	102	1	0,8	30
274848	3700	4,96	10,3	31,8	64,1	20,8	32,4	12000	34	65	25	86	2	0,7	26
415434	2800	4,87	10,2	31,5	64,7	20,9	32,4	23000	62	25	21	116	0	0,6	26
393540	3500	3,54	7,4	23,0	65,0	20,9	32,2	23000	35	20	11	72	1	1,3	95
035762	5300	7,08	14,8	45,6	64,4	20,9	32,5	60000	67	48	24	92	1	0,7	49
251534	11300	5,36	11,2	34,7	64,7	20,9	32,3	47000	73	38	16	122	0	0,5	23
389049	4400	3,20	6,7	20,9	65,3	20,9	32,1	18000	77	47	22	97	0	0,6	37
261153	6000	5,98	12,5	39,5	66,1	20,9	31,6	65000	63	35	22	120	1	0,7	43
291310	11700	5,96	12,8	38,3	64,3	21,5	33,4	88000	73	30	15	55	2	0,6	36
417245	9800	5,69	12,0	37,4	65,7	21,1	32,1	61000	64	25	14	51	2	0,8	22
414249	12900	5,36	11,9	35,2	65,7	22,2	33,8	75000	69	34	22	122	1	0,7	27
397470	5300	5,50	11,2	34,0	61,8	20,4	32,9	46000	53	42	20	74	1	0,8	40
260688	6300	6,01	13,5	40,5	67,4	22,5	33,3	56000	85	30	21	93	0	0,7	35
415998	9800	5,10	10,3	31,8	62,4	20,2	32,4	44000	63	35	22	120	1	0,7	28

ANEXO L. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo E (oxitetraciclina LA), após sete dias de tratamento

Grupo E (Oxitetraciclina LA) - Pós-Tratamento (Dia + 7)															
Animal	Leuc. (/μL)	He (x10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (célis/μL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
035582	12000	5,38	10,5	33,8	62,8	19,5	31,1	196000	84	36	30	186	2	0,8	36
080625	9400	6,00	11,5	35,7	59,5	19,2	32,2	478000	104	29	19	100	1	0,8	32
035710	9900	5,92	11,8	37,1	62,7	19,9	31,8	369000	134	25	47	398	0	1,0	31
274848	5000	4,98	10,2	31,7	63,7	20,5	32,2	309000	64	44	20	85	2	0,9	31
415434	8100	5,91	12,0	38,5	65,1	20,3	31,2	155000	56	28	22	169	1	0,8	34
393540	6400	3,84	8,1	24,5	63,8	21,1	33,1	319000	52	18	12	90	2	1,7	92
035762	6400	6,65	13,8	42,5	63,9	20,8	32,5	193000	93	51	24	152	1	0,9	55
251534	12600	6,00	12,2	37,3	62,2	20,3	32,7	258000	101	38	17	87	1	0,8	26
389049	10600	4,93	10,3	31,9	64,7	20,9	32,3	98000	110	158	27	305	2	0,7	35
261153	5800	5,60	11,7	36,5	65,2	20,9	32,1	246000	82	45	21	76	2	0,9	34
291310	12100	5,96	12,5	38,3	64,3	21,0	32,6	239000	134	33	23	183	2	0,7	34
417245	11300	6,04	12,7	39,3	65,1	21,0	32,3	133000	80	31	23	195	1	0,9	24
414249	11600	5,14	11,2	34,6	67,3	21,8	32,4	195000	90	27	21	144	1	1,0	33
397470	6800	5,93	12,1	37,1	62,6	20,4	32,6	242000	103	55	29	150	1	1,0	47
260688	9000	5,58	12,2	37,7	67,6	21,9	32,4	242000	131	25	19	76	1	0,9	44
415998	11500	5,20	10,8	32,5	62,5	20,8	33,2	323000	96	20	2	83	1	0,9	35

ANEXO M. Resultado dos parâmetros hematológicos dos animais do Grupo E (oxitetraciclina LA), após 28 dias de tratamento

Grupo E (Oxitetraciclina LA) - Pós-Tratamento (Dia + 28)															
Animal	Leuc. (/μL)	He (x10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaq. (célis/μL)	Fosfatase Alcalina	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
035582	22100	5,18	10,6	32,5	62,7	20,5	32,6	231000	77	46	19	107	1	0,9	35
080625	16400	6,62	13,0	39,3	59,4	19,6	33,1	464000	103	38	17	52	2	0,9	46
035710	12800	5,86	11,8	37,1	63,3	20,1	31,8	250000	111	18	24	85	3	1,0	35
274848	7200	5,27	10,7	33,2	63,0	20,3	32,2	257000	49	41	20	108	2	0,9	28
415434	10700	6,36	12,8	40,8	64,2	20,1	31,4	184000	*	*	*	*	*	*	*
393540	10100	3,79	8,1	24,7	65,2	21,4	32,8	282000	41	17	9	46	2	1,8	97
035762	9000	6,88	14,2	44,2	64,2	20,6	32,1	213000	6	74	22	89	2	1,1	63
251534	15000	6,12	12,6	38,1	62,3	20,6	33,1	211000	96	59	13	70	1	1,2	41
389049	8500	5,02	10,6	33,0	65,7	21,1	32,1	127000	117	602	33	94	3	0,8	42
261153	9600	5,96	12,3	38,5	64,6	20,6	31,9	287000	93	52	20	86	0	0,8	49
291310	17200	6,12	13,2	39,7	64,9	21,6	33,2	147000	119	42	19	119	1	1,0	49
417245	12400	5,94	12,5	38,6	65,0	21,0	32,4	245000	86	47	15	56	2	1,1	34
414249	12900	5,18	11,6	34,9	67,4	22,4	33,2	253000	94	45	19	105	1	1,0	39
397470	7700	6,31	12,8	38,9	61,6	20,3	32,9	261000	83	72	23	69	1	1,3	64
260688	9000	6,18	13,6	41,6	67,3	22,0	32,7	253000	143	124	18	70	1	0,9	35
415998	12400	5,92	12,0	36,8	62,2	20,3	32,6	354000	70	113	19	72	3	1,0	30

* Amostra perdida