

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS E  
ENGENHARIAS - CCAE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**BRENDA FAYLA SECO DE OLIVEIRA**

**EXISTE CONCORDÂNCIA ENTRE O NESTED PCR E O 4DX® PLUS NO  
DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE CANINA?**

**ALEGRE-ES**

**2019**

BRENDA FAYLA SECO DE OLIVEIRA

**EXISTE CONCORDÂNCIA ENTRE O NESTED PCR E O 4DX® PLUS NO  
DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE CANINA?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnostico e Terapêutica das enfermidades clinico-cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Karina Preising Aptekmann.

ALEGRE-ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

O48e Oliveira, Brenda Fayla Seco de, 1993-  
Existe concordância entre o nested PCR e o 4Dx® Plus no  
diagnóstico de Erliquiose canina? / Brenda Fayla Seco de  
Oliveira. - 2019.  
45 f.

Orientadora: Karina Preising Aptekmann.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências  
Agrárias e Engenharias.

1. Biologia molecular. 2. especificidade. 3. sensibilidade. 4.  
Teste imunoenzimático. I. Aptekmann, Karina Preising. II.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 619

---

BRENDA FAYLA SECO DE OLIVEIRA

**EXISTE CONCORDÂNCIA ENTRE O NESTED PCR E O 4DX® PLUS NO  
DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE CANINA?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.


Aprovado em 27 de Fevereiro de 2019.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karina Preising Aptekmann**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientadora**



---

**Prof. Dr. Dirlei Molinari Donatele**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**



---

**Prof. Dr. Marcos Santos Zanini**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

**A Deus.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Instituição Universidade Federal do Espírito Santo.

A Professora Karina por me apoiar e aparar nessa reta final, não deixando que eu desistisse.

Aos meus pais, Aldenir e Silvana pelo apoio me dado desde a graduação sempre me incentivando a seguir meus sonhos.

Ao meu namorado Pedro, por todo apoio dado durante este processo, me acompanhado nas idas e vindas entre Vitória e Alegre.

A Professora Barbara Loureiro por ter aberto as portas do Hospital Veterinário UVV - Prof. Ricardo Alexandre Hippler para realização da coleta para que meu experimento fosse realizado.

A Professora Emy Hiura pelo carinho e ajuda na coleta do material a ser utilizado no atual projeto e a todo conhecimento comigo compartilhado.

Aos amigos, amigas do laboratório, em especial ao Yuri, que sempre me ajudou em todo o processo de realização do PCR, compartilhando comigo toda sua experiência com o método utilizado.

Aos meus amigos mestrandos, em especial a Isabella cosmo e Adriano Stelzer por todo apoio e companheirismo em toda minha trajetória acadêmica.

Ao professor Francisco Careta por ter permitido a utilização do laboratório de cultivo celular e me ajudar sempre que surgiam dividas a respeito do cultivo celular.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão a Bolsa - Código de Financiamento 001.

**“ O primeiro dever da inteligência é desconfiar dela mesma ”.**

**Albert Einstein.**

## RESUMO

FAYLA SECO DE OLIVEIRA, BRENDA. **EXISTE CONCORDÂNCIA ENTRE O NESTED PCR E O 4DX® PLUS NO DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE CANINA?** 2019. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

A erliquiose monocítica canina é uma hemoparasitose causada pela bactéria intracelular *Ehrlichia canis*, que apresenta distribuição mundial, embora tenha maior ocorrência em regiões com climas tropicais e temperados, devido à alta prevalência do seu vetor biológico, o *Rhipicephalus sanguineus*. Em decorrência da alta prevalência da erliquiose em cães, da gravidade dessa enfermidade e da necessidade de um diagnóstico mais preciso, objetivou-se avaliar o valor diagnóstico do teste sorológico (4Dx® Plus) com relação ao nested PCR e correlacionar os achados hematológicos com o nested PCR no diagnóstico de erliquiose monocítica canina. Foram selecionados 83 cães, apresentando suspeita clínica de erliquiose, não podendo ter histórico de hemoparasitoses, há menos de 9 meses. Foi realizada coleta de sangue para realização do hemograma, esfregaço sanguíneo (pesquisa de mórulas de *Ehrlichia*), teste de ELISA (4Dx® Plus) e nested PCR. Das 83 amostras de cães suspeitos, o nested PCR foi positivo para *Ehrlichia canis* em 26 cães (31,33%). A avaliação pelo teste 4Dx® Plus mostrou que 39 cães eram positivos (46,99%) para *Ehrlichia* sp. Observou-se que somente 15 cães (18,07%) apresentaram resultados positivos, tanto no nested PCR quanto no teste 4Dx® Plus. De acordo com a análise de distribuição de probabilidades, observou-se que teste 4Dx® Plus apresentou uma sensibilidade de 57,69%, especificidade de 57,89% com acurácia de 57,83%. Considerando apenas os cães positivos no nested PCR, não houve correlação entre a presença de nenhum parâmetro para *Ehrlichia canis*.

Palavra-chave: *Ehrlichia canis*, erliquiose monocítica canina, ELISA, sensibilidade, especificidade.



## ABSTRAT

FAYLA SECO DE OLIVEIRA, BRENDA. **IS THERE ANY CONSENSUS BETWEEN PCR AND 4DX® PLUS IN THE DIAGNOSIS OF CANINE EHLICHIOSIS? 2019.** 39p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

Canine monocytic ehrlichiosis is a hemoparasitosis caused by the intracellular bacterium *Ehrlichia canis*, which has a worldwide distribution, although it occurs more frequently in regions with tropical and temperate climates due to the high prevalence of its biological vector, the *Rhipicephalus sanguineus*. Due to the high prevalence of ehrlichiosis in dogs, the severity of this disease and the need for a more precise diagnosis, the aim of this study was to evaluate the diagnostic value of the serological test (4Dx® Plus) in relation to the nested PCR and to correlate the hematological findings with the nested PCR in the diagnosis of ehrlichiosis. Eighty-three suspected dogs were selected, without history of previous hemoparasitosis. Hemogram, blood smear (detection of Ehrlichia morulae), ELISA test (4Dx® Plus) and nested PCR were performed. Among 83 samples, nested PCR was positive for Ehrlichia canis in 26 dogs (31.33%). Evaluation by the 4Dx® Plus test showed that 39 dogs were positive (46.99%) for Ehrlichia sp. It was observed that only 15 dogs (18.07%) presented positive results, both in nested PCR and 4Dx® Plus test, presenting a poor agreement. It was observed that 4Dx® Plus test presented a sensitivity of 57.69%, specificity of 57.89%, with an accuracy of 57.83%. There was no correlation between the hematological parameters with the presence of *Ehrlichia canis* diagnosed in the nested PCR. It is concluded that there is a great disagreement between the results obtained in the nested PCR and the 4Dx® Plus and, considering the nested PCR as the gold standard for the diagnosis of ehrlichiosis, a low accuracy, sensitivity and specificity of 4Dx® Plus.

Key-words: *Ehrlichia canis*, canine monocytic ehrlichiosis, ELISA, sensitivity, specificity.

## LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay

g- Força gravitacional

g- Gramas

H<sub>2</sub>- Receptor de histamina

IFA- Imunofluorescência

KHCO<sub>3</sub>- Bicabornato de potássio

M- Molar

µg- Microgramas

mg/Kg- Miligrama por quilograma de peso

mL- Mililitros

µl- Microlitros

NH<sub>4</sub>CL- Cloreto de amônio

PCI- Fenol:Clorofórmio:álcool isoamilico

PCR- Reação em cadeia da Polimerase

RIFI- Reação de imunofluorescência indireta

VPN- Valor preditivo negativo

VPP- Valor preditivo positivo

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1 Agente etiológico .....	12
2.2 Vetor.....	13
2.3 Transmissão .....	13
2.4 Sinais Clínicos .....	13
2.5 Diagnóstico .....	15
2.6 Tratamento .....	17
2.7 Prevenção.....	18
<b>3. Capítulo 1: EXISTE CONCORDÂNCIA ENTRE O NESTED PCR E O 4DX® PLUS NO DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE CANINA? .....</b>	<b>19</b>
Rusmo.....	19
Abstract.....	20
Introdução.....	20
Materiais e métodos .....	21
Resultados.....	23
Discussão.....	24
Conclusão.....	25
Agradecimentos.....	26
Referências.....	26
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>29</b>
<b>5. REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A erliquiose é uma hemoparasitose de distribuição mundial, embora tenha maior ocorrência em regiões com climas tropicais e temperados (Vieira et al., 2011), devido à alta prevalência do seu vetor biológico, o *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres, 2010). Embora tenha uma grande importância em cães, também pode acometer gatos, equinos, ruminantes e humanos (Mundim et al., 2008). Em cães, a *Ehrlichia canis* é a principal responsável por causar a erliquiose monocítica canina que, com frequência, manifesta-se com febre, perda de peso, apatia, linfadenopatia, vasculite, hepatopatia, nefropatia, petéquias e uveíte (Dubie et al., 2014).

O diagnóstico da erliquiose é realizado baseado na sintomatologia clínica do animal e por meio de achados hematológicos, achados citológicos, sorológicos e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Harrus et al., 2004). No esfregaço sanguíneo é possível visualizar corpúsculos elementares; e dentre as anormalidades hematológicas, podem ocorrer anemia, leucopenia e trombocitopenia (Harrus; Warner, 2011).

Métodos sorológicos abrangendo ensaios de imunofluorescência (IFA), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e western blot (WB) são utilizados para a detecção de anticorpos contra *E. canis*, no entanto, não diferenciam infecções existentes de infecções anteriores já tratadas, limitando assim a confiabilidade no diagnóstico da doença (Harrus et al., 2004). Uma vez infectados, os animais podem apresentar altos níveis de anticorpos circulantes durante um longo período de tempo, podendo assim, fornecer uma superestimação da frequência da doença quando realizado o diagnóstico por meio de testes sorológicos (Solano-Gallego et al., 2016). O teste SNAP 4Dx® Plus utiliza reagentes altamente purificados na plataforma ELISA, permitindo a avaliação de anticorpos para *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* e antígeno de *Dirofilaria immitis*. Segundo a IDEXX Laboratorios, Incorporação, o teste possui sensibilidade de 97,1% e especificidade 95,3%, utilizando IFA e ELISA como testes padrão ouro (IDEXX, 2019).

Por conta dos inconvenientes obtidos nas técnicas sorológicas, a biologia molecular vem ganhando cada vez mais espaço e sendo empregada na rotina de diagnósticos de várias doenças. Estudos relataram maior eficiência das técnicas

moleculares, quando comparadas a outras, para confirmação do diagnóstico de erliquiose monocítica canina (Mylonakis et al., 2003; Nakaghi et al., 2008; Baneth et al., 2009; Ramos et al., 2009). A técnica de PCR possui mais especificidade comparada aos outros métodos anteriormente descritos e pode ser empregada nas diferentes fases clínicas da doença (Nakaghi et al., 2008; Harrus e Waner, 2011). O nested PCR é capaz de diferenciar as espécies de Ehrlichia, pela detecção de sequências genômicas do agente (Alves et al., 2005). Assim como também pode ser utilizada para distinguir animais tratados com infecção persistente de animais tratados e curados, mas que apresentam altos níveis de anticorpos (Neer e Harrus, 2006).

Em decorrência da alta prevalência da erliquiose em cães no estado do Espírito Santo, da gravidade dessa enfermidade e da necessidade de um diagnóstico mais preciso, objetivou-se avaliar o valor de diagnóstico do teste sorológico (4Dx® Plus) com relação ao nested PCR e correlacionar os achados hematológicos com o nested PCR no diagnóstico de erliquiose monocítica canina.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Agente etiológico e ciclo biológico**

A erliquiose é causada por bactérias, pleomórficas, gram-negativas do gênero *Ehrlichia*, pertencentes à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae e inclui as espécies *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. ewingii* (DUMLER et al., 2001; ETTINGER; FELDMAN, 2004). Estas formam corpúsculos intracitoplasmáticos nas células mononucleares do sistema fagocitário sejam maduras ou imaturas, se multiplicam até estarem maduras formando mórulas (MAVROMATIS et al., 2006; SILVA et al., 2010).

A denominação da doença é dada segundo a espécie afetada e o tipo de leucócito parasitado. A erliquiose monocítica canina, a mais comum entre os cães, é causada pela *E. canis*, e menos frequentemente, *E. chaffeensis* (OIE, 2019).

A infecção do hospedeiro ocorre durante o período de incubação do agente infeccioso, que varia de 8 a 20 dias até a formação de mórulas nas células do hospedeiro que é constituído de três fases principais: penetração dos corpos elementares nas células, crescimento; multiplicação, com a formação do corpo inicial; e formação das mórulas, que são constituídas por um conjunto de corpos elementares envoltos por uma membrana onde os corpúsculos elementares são fagocitados por células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro, e se multiplicam por fissão binária (GREENE, 2006), uma vez que não a formação do fagolisossomo após ele ser fagocitado (ALMOSNY, 2002).

A *E. canis* além de infectar células mononucleadas, promove uma resposta de hiperestimulação antigênica por meio de alterações na membrana de plaquetas, eritrócitos e leucócitos que desencadeiam alterações do sistema complemento e formação de complexos autoimunes, provocando lise celular e fagocitose das células infectadas (GREGORY; FORRESTER, 1990; NEER et al. 1998).

A resposta celular gerada pelo indivíduo frente a infecção por *Ehrlichia* é mediada por linfócitos T CD4+, com produção de interferon  $\gamma$  e granulomas inflamatórios. Porém, como estes atuam na defesa e patogênese do hospedeiro ainda não é bem elucidada (HASEGAWA et al., 2005).

## 2.2 Vetor

Os carrapatos são transmissores de várias doenças infecciosas, sendo o *Rhipicephalus sanguineus* o principal vetor das erliquiose monocítica canina. Estudos

apontam o *Dermatocenter variabilis* como uma outra espécie de carrapato capaz de transmiti-la (OIE, 2019).

O *R. sanguineus* tem distribuição mundial, por conta da sua capacidade de adaptação a diversos climas. Conhecido popularmente no Brasil como carrapato vermelho ou marrom do cão, este é encontrado principalmente em localidade de clima quente e locais com muitos de cães (OTRANTO; DANTAS, 2010).

### 2.3 Transmissão

A transmissão da erliquiose ocorre durante o repasto sanguíneo, o vetor contrai a bactéria que irá se multiplicar em seu intestino, se disseminar nos hemócitos até chegar as glândulas salivares alojando-se até o próximo repasto (DAGNONE et al., 2001).

No vetor não ocorre a transmissão transovariana, porém, as larvas podem se infectar durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado na fase aguda, mantendo a infecção nos estágios de ninfa e adulto, perpetuando assim a disseminação do agente (NELSON; COUTO, 2015).

Apesar da infecção natural nos cães ocorrer principalmente durante o repasto sanguíneo, a transmissão também pode ocorrer por meio de transfusões sanguíneas de um cão infectado (doador) para cão não infectado (receptor) (BORIN, 2009; SILVA, 2015).

### 2.4 Sinais clínicos

A doença pode se apresentar nas formas aguda, subclínica e crônica havendo variação na duração e severidade (NAKAGHI et al., 2008). Podem ser observados sintomas como febre, perda de peso, apatia, linfadenopatia, a vasculite, que ocorre por conta da migração de células infectadas para os pequenos vasos (NELSON; COUTO, 2015), e uveíte (PANCIERA; EWING; CONFER, 2001).

Exames hematológicos de cães experimentalmente ou naturalmente infectados com *E. canis* apontam a trombocitopenia como a anormalidade hematológica mais comum encontrada em cães. Diferentes estágios da doença atribuem a diminuição do

número de plaquetas a diferentes mecanismos implicados na patogênese da trombocitopenia. Na fase aguda da doença, o aumento do consumo de plaquetas, relacionada a inflamação do endotélio vascular (vasculites), aumento do sequestro de plaquetas pelo baço e destruição imunomediada, que resulta em redução significativa da duração de vida das plaquetas (HARRUS et al., 1998).

No hemograma, na fase aguda, é possível verificar uma anemia normocítica normocrômica acompanhada de trombocitopenia. (MENDONÇA et al., 2005). A trombocitopenia ocorre entre 10 e 20 dias pós-infecção e um aumento no número de plaquetas imaturas circulantes, que persiste por toda a doença na maioria dos animais (GREENE, 2006).

Na fase subclínica os sinais clínicos são mínimos, mas acompanhados de uma contagem de células sanguíneas baixa. Nesta fase encontra-se uma alta quantidade de anticorpo contra *Ehrlichia canis* em cães (MENDONÇA et al., 2005).

Cães imunocompetentes podem eliminar o agente durante a fase subclínica, mas isto quase não acontece devido a persistência da forma intracelular, resultando na fase crônica da infecção. Podendo ser observado sinais de hemorragias, edema periférico, emagrecimento, distúrbios neurológicos, aumento de volume das articulações, hepatomegalia e esplenomegalia (NELSON; COUTO, 2015; QUINN et al., 2005). Entretanto o quadro pode reagudizar em casos de imunossupressão do hospedeiro (SILVA, 2015).

Na fase crônica os sintomas são similares aos observados na fase aguda, entretanto com maior gravidade. Encontrando ainda pancitopenia, anemia aplásica, neutropenia e trombocitopenia com variados graus de supressão da série eritróide, mielóide e megacariocítica devido a hipoplasia medular causada pela infecção crônica do agente (WANER; HARRUS, 2000; BREITSCHWERDT, 2004).

## 2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose pode ser realizado por meio da observação em lâminas de esfregaço sanguíneo, aspirados de medula óssea ou papas leucocitárias contendo células infectadas com corpúsculos elementares. Entretanto, é demorado e



de difícil visualização, pode-se observar corpúsculos de elementares em cerca de 4% das lâminas, uma vez que a mesma não é encontrada em todas as fases da doença, o maior sucesso é na fase aguda (UENO et al., 2009). Esfregaços realizados a partir de aspirados de medula óssea 34%, possuem uma sensibilidade maior. Ainda, pode-se fazer separação da camada leucocitária do sangue com a utilização de anticoagulante e centrifugação, podendo aumentar assim a sensibilidade do exame em 66% dos casos (MYLONAKIS et al., 2003). Na fase crônica dificilmente encontra-se inclusões de mórulas de *Ehrlichia* (MACHADO, 2004). Outros exames, que confirmem o agente etiológico devem ser utilizados como a citologia, sorologia e métodos moleculares (CAPRARIS et al., 2011).

A *Ehrlichia* induz soro conversão em poucas semanas após infecção, gerando resposta humoral específica, possibilitando assim a realização de exames sorológicos. (OTRANTO et al., 2009). Importantes principalmente na fase subclínica, estes podem estabelecer a ocorrência da doença. (SOUZA et al., 2012).

Dentre alguns testes sorológicos passíveis de serem realizados, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), pesquisa-se anticorpos anti-*Ehrlichia* sp. Além do teste de RIFI, é usado o teste de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) no diagnóstico da doença, que é comercialmente encontrado e bem aceito, de rápida execução e leitura (HARRUS et al., 2002).

A sorologia tem um papel importante nas fases subclínica e crônica da erliquiose monocítica canina (Nakaghi et al., 2008). O ensaio SNAP 4Dx® PLUS (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME) é um ELISA rápido na clínica que foi validado extensivamente para detecção de anticorpos contra *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis*, *E. ewingii*, *B. burgdorferi* e Antígeno de *D. immitis* (Stillman, 2014; Goldstein, 2014). Apesar do emprego de testes sorológicos serem comuns, eles são passíveis de muitas reações cruzadas, uma vez que várias espécies de *Ehrlichia* dividem antígenos em comum (AGUIAR et al., 2007).

Além destes problemas encontrados nos testes sorológicos, não é possível distinguir o hospedeiro que está cursando a doença de outros que foram expostos a doença porém não cursam mais a mesma (AGUIAR et al., 2007). Dentre alguns inconvenientes que os testes sorológicos possuem, o elevado diagnóstico de falsos-positivos em áreas endêmicas é comum, por conta de cães que já cursaram a doença apresentarem Imunoglobulina G (BULLA et al., 2004). Em cães, é comum a infecção

de vários hemoparasitas concomitantes a erliquiose canina, como o *Anaplasma* sp. (MOREIRA et al., 2003; DAGNONE et al., 2009), *Babesia* sp. (TRAPP et al., 2006; BORIN et al., 2009), *Hepatozoon* sp. (MUNDIM et al., 2008) e *Mycoplasma* sp. (MOREIRA et al., 2003).

Por conta dos inconvenientes obtidos nas técnicas sorológicas, a biologia molecular vem ganhando cada vez mais espaço e sendo empregada na rotina de diagnósticos de várias doenças. Assim, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) por possuir mais sensibilidade e especificidade comparando aos outros métodos anteriormente descritos, além de poder ser empregado nas diferentes fases clínicas da doença está sendo cada vez mais utilizada (NAKAGHI et al., 2008; HARRUS; WANER, 2010).

A PCR é capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia*, pela detecção de sequências genômicas do agente. Ensaios de PCR para *E. canis* tem como alvo mais comum o gene 16S (ALVES et al., 2005; PINYOOWONG et al., 2008). Cepas de origens geográficas diferentes, apresentam diferenças genotípicas, mas também similaridade com a sequência do RNA ribossomal 16S. Estas cepas são de *E. canis*, e foram isoladas e caracterizadas geneticamente como: “Flórida” (M73226), “Oklahoma” (M73221) e “Israelí” (U26740) (DAGNONE et al., 2001)

O nested PCR é uma das técnicas mais difundidas para a detecção de *E. canis* em condições experimentais e naturais (AGUIRRE et al., 2008; NAKAGHI et al., 2010). As infecções por *E. canis* são de difícil detecção in vivo pois normalmente apresentam uma baixa bacteremia (SANTOS et al., 2009, HARRUS; WANER, 2010). O PCR deve ser empregado principalmente nos primeiros estágios de infecção uma vez que ensaios sorodiológicos não distinguem entre infecção e antecedentes exposição (Harrus e Waner, 2010). Além disso, testes sorológicos podem reação cruzada, especialmente entre membros do mesmo gênero (NAKAGHI et al., 2008).

O cultivo in vitro de *E. canis* pode ser realizado em células DH82, entretanto esse método apenas é usado em pesquisa (WELLMAN et al., 1988).

Em casos suspeitos de erliquiose devem-se utilizar diagnósticos diferenciais de outros hemoparasitas como para babesiose, a febre maculosa das montanhas, leishmaniose e anaplasmanose (TILLEY; SMITH; FRANCIS, 2003).

## 2.6 Tratamento

Com o tratamento é almejado a cura dos pacientes enfermos e a prevenção da transmissão da doença por meio dos portadores assintomáticos. Após o tratamento, é necessária realização de teste de diagnóstico adequado e o monitoramento com contagem plaquetária para a comprovação da cura do paciente (TORRES et al., 2002). A doxiciclina é o antibiótico de eleição para o tratamento de erliquiose canina independente da fase da doença que o hospedeiro esteja cursando. A dose de 10 mg / kg de peso corporal por dia, durante 28 dias, é recomendada pelo Consensus Statement from the Infectious Disease Study Group of the American College of Veterinary Internal Medicine (HARRUS et al., 2004), por atingir o tecidos e fluidos corporais de forma mais rápida e eficaz (SILVA, 2015).

Este antimicrobiano é bacteriostático altamente lipossolúvel, absorvido de forma rápida e eficaz atingindo concentrações séricas e intracelulares, mais satisfatórias, comparado a outras drogas do mesmo grupo das tetraciclinas, como a oxitetraciclina e o cloridrato de tetraciclina logo estes fatores são altamente importantes na eliminação de parasitas intracelulares (SPINOSA et al., 2017).

A terapia de suporte deve ser realizada de acordo com o demais sintomas e necessidades de cada paciente. Podendo ser realizado fluidoterapia principalmente em casos crônicos e que o mesmo se encontra desidratado, corticoides para animais em quadros de trombocitopenia grave e até mesmo transfusão sanguínea quando o animal apresentar alterações hematológicas graves e redutores da acidez estomacal (inibidores de H<sub>2</sub> ou inibidores da bomba de prótons). Em casos de erliquiose canina subclínica alguns autores ainda indicam o prolongamento do tratamento por mais seis semanas além dos dois dias indicados. (VIGNARD; ALVES; BLECH, 2001; SILVA, 2015).

É importante ainda saber e orientar o proprietário sobre os riscos de reinfecção, uma vez que o animal não adquire imunidade sobre o agente. Assim para evitar uma nova contaminação é necessário o uso de medidas profiláticas (ALMOSNY et al., 2002).

## 2.7 Prevenção

A erliquiose é uma doença que confere memória imunológica ao hospedeiro por apenas alguns meses. Assim, a prevenção é a melhor forma de evitar o contágio. Existem diversas drogas para o combate e prevenção do vetor que podem ser utilizadas, tais como a aplicação de produtos de uso tópico, como o uso de coleiras impregnadas, medicamentos spot on e pour on, medicamentos de uso oral, troca de lençóis, cobertas e outros objetos que estão em contato constante com os animais. Deve-se ainda evitar a concentração de animais e a utilização constante destes para o controle (SILVA, 2009).

## CAPÍTULO 1

Artigo a ser submetido para a revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Qualis A2)*

### EXISTE CONCORDÂNCIA ENTRE O NESTED PCR E O 4DX® PLUS NO DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE CANINA?

IS THERE ANY CONSENSUS BETWEEN PCR AND 4DX® PLUS IN THE DIAGNOSIS OF CANINE EHLICHIOSIS?

B. F. S. Oliveira, Y.V. Almeida, E. Hiura, K.P. Aptekmann

#### Resumo

Objetivou-se avaliar o valor diagnóstico do teste sorológico (4Dx® Plus) com relação ao nested PCR e correlacionar os achados hematológicos com o nested PCR no diagnóstico da erliquiose monocítica canina. Foram selecionados 83 cães suspeitos da doença, sem histórico prévio de hemoparasitoses há pelo menos nove meses. Foi realizado hemograma, esfregaço sanguíneo (pesquisa de corpúsculo elementar de *Ehrlichia*), teste de ELISA (4Dx® Plus) e nested PCR. Das 83 amostras de cães suspeitos, o nested PCR foi positivo para *Ehrlichia canis* em 26 cães (31,33%). A avaliação pelo teste 4Dx® Plus mostrou que 39 cães eram positivos (46,99%) para *Ehrlichia sp.* Observou-se que somente 15 cães (18,07%) apresentaram resultados positivos, tanto no nested PCR quanto no teste 4Dx® Plus, apresentando uma fraca concordância. Observou-se que teste 4Dx® Plus apresentou uma sensibilidade de 57,69%, especificidade de 57,89%, com acurácia de 57,83%. Não houve correlação entre os parâmetros hematológicos com a presença de *Ehrlichia canis* diagnosticada no nested PCR. Conclui-se que existe uma grande discordância entre os resultados obtidos no nested PCR e o no 4Dx® Plus e, considerando o nested PCR como padrão-ouro para o diagnóstico de erliquiose, observou-se uma baixa acurácia, sensibilidade e especificidade do 4Dx® Plus.

Palavras chaves: *Ehrlichia canis*, erliquiose monocítica canina, ELISA, sensibilidade, especificidade.

## 35 Abstract

36 The aim of this study was to evaluate the diagnostic value of the serological test (4Dx® Plus)  
37 in relation to the nested PCR and to correlate the hematological findings with the nested PCR  
38 in the diagnosis of ehrlichiosis. Eighty-three suspected dogs were selected, without history of  
39 previous hemoparasitosis. Hemogram, blood smear (detection of *Ehrlichia morulae*), ELISA  
40 test (4Dx® Plus) and nested PCR were performed. Among 83 samples, nested PCR was positive  
41 for *Ehrlichia canis* in 26 dogs (31.33%). Evaluation by the 4Dx® Plus test showed that 39 dogs  
42 were positive (46.99%) for *Ehrlichia sp.* It was observed that only 15 dogs (18.07%) presented  
43 positive results, both in nested PCR and 4Dx® Plus test, presenting a poor agreement. It was  
44 observed that 4Dx® Plus test presented a sensitivity of 57.69%, specificity of 57.89%, with an  
45 accuracy of 57.83%. There was no correlation between the hematological parameters with the  
46 presence of *Ehrlichia canis* diagnosed in the nested PCR. It is concluded that there is a great  
47 disagreement between the results obtained in the nested PCR and the 4Dx® Plus and,  
48 considering the nested PCR as the gold standard for the diagnosis of ehrlichiosis, a low  
49 accuracy, sensitivity and specificity of 4Dx® Plus.

50

51 Key-words: *Ehrlichia canis*, canine monocytic ehrlichiosis, ELISA, sensitivity, specificity.

52

## 53 Introdução

54 A erliquiose é uma hemoparasitose de distribuição mundial, embora tenha maior ocorrência em  
55 regiões com climas tropicais e temperados (Vieira *et al.*, 2011), devido à alta prevalência do  
56 seu vetor biológico, o *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres, 2010). Embora tenha uma  
57 grande importância em cães, também pode acometer gatos, equinos, ruminantes e humanos  
58 (Mundim *et al.*, 2008). Em cães, a *Ehrlichia canis* é a principal responsável por causar a  
59 erliquiose monocítica canina que, com frequência, manifesta-se com febre, perda de peso,  
60 apatia, linfadenopatia, vasculite, hepatopatia, nefropatia, petéquias e uveíte (Dubie *et al.*,  
61 2014).

62 O diagnóstico da erliquiose é realizado baseado na sintomatologia clínica do animal e por meio  
63 de achados hematológicos, achados citológicos, sorológicos e reação em cadeia da polimerase  
64 (PCR) (Harrus *et al.*, 2004). No esfregaço sanguíneo é possível visualizar corpúsculos  
65 elementares; e dentre as anormalidades hematológicas, podem ocorrer anemia, leucopenia e  
66 trombocitopenia (Harrus e Warner, 2011).

67 Métodos sorológicos abrangendo ensaios de imunofluorescência (IFA), ensaio de  
68 imunoabsorção enzimática (ELISA) e *western blot* (WB) são utilizados para a detecção de

69 anticorpos contra *E. canis*, no entanto, não diferenciam infecções existentes de infecções  
70 anteriores já tratadas, limitando assim a confiabilidade no diagnóstico da doença (Harrus *et al.*,  
71 2004). Uma vez infectados, os animais podem apresentar altos níveis de anticorpos circulantes  
72 durante um longo período de tempo, podendo assim, fornecer uma superestimação da frequência  
73 da doença quando realizado o diagnóstico por meio de testes sorológicos (Solano-Gallego *et*  
74 *al.*, 2016). O teste SNAP 4Dx® Plus utiliza reagentes altamente purificados na plataforma  
75 ELISA, permitindo a avaliação de anticorpos para *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia*  
76 *burgdorferi* e antígeno de *Dirofilaria immitis*. Segundo a IDEXX Laboratórios, Incorporação,  
77 o teste possui sensibilidade de 97,1% e especificidade 95,3%, utilizando IFA e ELISA como  
78 testes padrão ouro (INDEXX, 2019).

79 Por conta dos inconvenientes obtidos nas técnicas sorológicas, a biologia molecular vem  
80 ganhando cada vez mais espaço e sendo empregada na rotina de diagnósticos de várias doenças.  
81 Estudos relataram maior eficiência das técnicas moleculares, quando comparadas a outras, para  
82 confirmação do diagnóstico de erliquiose monocítica canina (Mylonakis *et al.*, 2003; Nakaghi  
83 *et al.*, 2008; Baneth *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009). A técnica de PCR possui mais  
84 especificidade comparada aos outros métodos anteriormente descritos e pode ser empregada  
85 nas diferentes fases clínicas da doença (Nakaghi *et al.*, 2008; Harrus e Waner, 2011). O nested  
86 PCR é capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia*, pela detecção de sequências genômicas  
87 do agente (Alves *et al.*, 2005). Assim como também pode ser utilizada para distinguir animais  
88 tratados com infecção persistente de animais tratados e curados, mas que apresentam altos  
89 níveis de anticorpos (Neer e Harrus, 2006).

90 Em decorrência da alta prevalência da erliquiose em cães, da gravidade dessa enfermidade e da  
91 necessidade de um diagnóstico mais preciso, objetivou-se avaliar o valor de diagnóstico do teste  
92 sorológico (4Dx® Plus) com relação ao nested PCR e correlacionar os achados hematológicos  
93 com o nested PCR no diagnóstico de erliquiose monocítica canina.

94

## 95 **Materiais e Métodos**

96 O estudo foi realizado segundo aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA –  
97 UFES, protocolo n. 42-2017). Os animais utilizados no estudo eram oriundos do atendimento  
98 clínico no Hospital Veterinário da Universidade de Vila Velha - Prof. Ricardo Alexandre  
99 Hippler. Foram selecionados 83 cães, com idade variando de 2 meses a 18 anos ( $71 \pm 47$  meses),  
100 sendo 38 machos e 45 fêmeas, das seguintes raças: mestiço (58), Poodle (7), Chow chow (3),

101 Labrador (3), Spitz Alemão (2), Beagle (2), Pinscher (2), Bord Colie (1), Husky Siberiano (1),  
102 Daschund (1), Pastor Alemão (1), Akita (1), Fila Brasileiro (1).

103 Para a seleção dos cães, estes deveriam apresentar suspeita clínica de erliquiose, com sinais  
104 clínicos sugestivos da doença. Os cães não poderiam ter histórico de hemoparasitoses, tratadas  
105 ou não, há menos de 9 meses.

106 Os cães selecionados foram contidos fisicamente para coleta de aproximadamente 2 ml de  
107 sangue total. O sangue foi coletado da veia jugular ou cefálica dos animais, após tricotomia e  
108 antissepsia do local, utilizando-se seringa e agulha descartáveis. O sangue foi armazenado em  
109 tubos contendo anticoagulante (EDTA) para posterior realização do hemograma, esfregaço  
110 sanguíneo, teste de ELISA (4Dx® Plus - IDEXX Laboratories, Inc. Wszelkie prawa  
111 zastrzeżone) e nested PCR.

112 Os parâmetros hematológicos foram obtidos por meio do analisador de hematologia compacto  
113 BC-2800VET automático e por meio da leitura de esfregaços sanguíneos em lâminas de  
114 microscopia coradas em reagente panótico. Todos os resultados obtidos no analisador foram  
115 conferidos manualmente e realizado pesquisa de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo. A  
116 partir dos resultados obtidos, determinou-se a presença ou não de anemia, trombocitopenia e  
117 leucopenia. Os valores de referência utilizados para a classificação de anemia foram eritrócitos  
118 abaixo de 5.500.000/ $\mu$ L; trombocitopenia para valores de plaquetas abaixo de 175.000 / $\mu$ l; e  
119 leucopenia para valores de leucócitos totais abaixo de 6.000/ $\mu$ L (Trall, 2007). A partir dos  
120 esfregaços sanguíneos confeccionados, foi realizada a pesquisa de corpúsculos elementares de  
121 *Ehrlichia*.

122 O ELISA foi realizado por meio do teste de 4Dx® Plus, segundo as orientações do fabricante,  
123 para detecção de anticorpos de *Ehrlichia sp.* (*E. canis* ou *E. ewingii*). Qualquer surgimento de  
124 cor nos poços de amostra indicou positividade do teste. Para este estudo, foram consideradas  
125 positivas somente as amostras reagentes no poço de *Ehrlichia sp.*

126 Para a realização do nested PCR, o sangue total coletado em tubos com anticoagulante foi  
127 centrifugado a 940 g por 5 minutos e retirado o plasma. Em seguida o sangue concentrado foi  
128 homogeneizado e adicionado 1mL de tampão de hemólise (8,26g NH<sub>4</sub>Cl; 1g KHCO<sub>3</sub>; 0,037g  
129 EDTA; q.s.p. água destilada para 1 litros de solução), homogeneizado por inversão por 3  
130 minutos e centrifugado novamente por 940 g por 5 minutos. Posteriormente foi retirado o  
131 sobrenadante, e assim foi possível observar um pellet de leucócitos de coloração acinzentada  
132 ao fundo do tubo. Foi repetido o processo de adição do tampão de hemólise, homogeneização  
133 e centrifugação, até a obtenção de um pellet de coloração branca. Este pellet foi transferido para



134 um tubo de plástico descartável de 1,5 mL em 1mL de PBS e centrifugado a 940 g por 5 minutos  
135 e retirar o sobrenadante e conservado a -20°C. A partir do pellet de leucócitos obtido após o  
136 processo de hemólise de hemácias e separação de leucócitos, foi realizado a extração do DNA  
137 genômico com Fenol- Clorofórmico-isoamilíco (25:24:1), e a então o nested PCR, segundo  
138 técnica descrita por Murfy (1998).

139 Para a análise estatística, foi considerado o nested PCR como padrão ouro para o diagnóstico  
140 de erliquiose monocítica canina, sendo calculado o coeficiente *Kappa* e a distribuição de  
141 probabilidades do teste 4Dx® Plus na realização do diagnóstico. Para correlacionar os achados  
142 hematológicos com o nested PCR foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Os testes  
143 foram realizados com nível de significância de 5%. Foi realizada a descrição da presença ou  
144 não do corpúsculo elementar nos esfregaços sanguíneos.

145

## 146 **RESULTADOS**

147 Das 83 amostras de cães suspeitos, 26 cães (31,33%) foram positivos para *Ehrlichia canis* no  
148 Nested PCR e 39 cães (46,99%) foram positivos para *Ehrlichia sp* no teste 4Dx® Plus.

149 Observou-se que somente 15 cães (18,07%) apresentaram resultados positivos, tanto no nested  
150 PCR quanto no teste 4Dx® Plus. Ao realizar o coeficiente de concordância *Kappa* foi observada  
151 uma fraca concordância entre os testes ( $K=0,208$ ;  $p = 0,039$ ). De acordo com a análise de  
152 distribuição de probabilidades, observou-se que teste 4Dx® Plus apresentou uma sensibilidade  
153 do 57,69%, especificidade de 57,89%, valor preditivo positivo (VPP) de 38,46%, valor  
154 preditivo negativo (VPN) de 75% e acurácia de 57,83%.

155 Na avaliação dos esfregaços sanguíneos, foi encontrada a presença de corpúsculos elementares  
156 em monócitos, sugestivos de *E. canis*, em três amostras sanguíneas (3,61%), porém, somente  
157 uma amostra foi positiva no nested PCR.

158 A anemia foi um achado presente em 34 amostras do total de amostras analisadas (40,9%); a  
159 leucopenia em 17 (20,4%) e a trombocitopenia em 40 (48,1%) amostras. Considerando apenas  
160 os cães positivos no nested PCR (n=26), 9 cães (34,6%) apresentaram anemia, 5 (19,2%)  
161 apresentaram leucopenia e 13 (50%) apresentaram trombocitopenia. Não houve correlação  
162 entre a presença de qualquer parâmetro hematológico com o nested PCR positivo para *Ehrlichia*  
163 *canis* (anemia:  $rs=-0,02$ ,  $p=0,83$ ; leucopenia:  $rs=0,02$ ,  $p=0,86$ ; trombocitopenia:  $rs=0,10$ ,  
164  $p=0,35$ ).

165

## 166 **DISCUSSÃO**

167 A discordância dos resultados encontrados no nested PCR e 4DX® Plus é esperada por se  
168 tratarem de dois testes com métodos de detecção diferente. O nested PCR é um teste molecular,  
169 que visa a detecção do material genético da *E.canis*, podendo sofrer interferência de acordo  
170 com o grau de parasitemia clínica, havendo possibilidade de resultados falsos negativos devido  
171 ao sequestro de células mononucleares infectadas pelo sistema mononuclear fagocitário. Dessa  
172 forma, pode ocorrer baixas concentrações de células infectadas na corrente sanguínea de cães  
173 com erliquiose monocítica canina (Mylonakus *et al.*, 2003). O 4Dx® Plus utiliza a técnica de  
174 ELISA, que é um teste sorológico para a detecção de anticorpos, que pode falhar no diagnóstico  
175 de infecções iniciais, apresentando resultados falsos-negativos caso o animal tenha contraído a  
176 doença em menos de 1 a 3 semanas. Testes sorológicos, como o 4DX® Plus, ainda podem  
177 apresentar resultados falsos-positivos, pois antígenos diversos podem gerar respostas  
178 imunológicas semelhantes por apresentarem proteínas ortólogas, como as de 200 e 140 KDa,  
179 presentes na *E. canis*, que compartilha o mesmo ancestral que as presentes na *E. chaffeensis*,  
180 estimulando respostas imunológicas parecidas (Mc Bride *et al.*, 2003).

181 Ao compararmos os resultados obtidos no teste 4Dx® Plus, de acordo com a análise de  
182 distribuição de probabilidades, observou-se que a sensibilidade é baixa, apresentando um alto  
183 número de falsos negativos. A especificidade também foi baixa, demonstrando um alto número  
184 de resultados falsos positivos. Existe uma baixa probabilidade (VPP baixo) de que amostras  
185 que apresentarem resultado positivo no 4Dx® Plus realmente sejam positivas no nested PCR;  
186 e uma alta probabilidade de que os resultados negativos no 4Dx® Plus serem realmente  
187 negativos (VPN alto). A acurácia do teste 4Dx® Plus foi baixa, havendo uma baixa correlação  
188 com o Nested PCR. Apesar do fabricante indicar uma alta sensibilidade e especificidade do  
189 4Dx® Plus (IDEXX, 2019), divergindo dos resultados encontrados neste estudo, o mesmo  
190 utilizou outros testes sorológicos, como ELISA e IFA convencional como padrão ouro,  
191 conseguindo assim esses altos valores de sensibilidade (57,69%) e especificidade (57,89%)  
192 (IDEXX, 2019).

193 Os iniciadores utilizados no nested PCR realizado neste estudo foram específicos para *E. canis*,  
194 constituindo-se de resultados mais específicos e confiáveis do que os resultados encontrados  
195 nos demais métodos de diagnósticos utilizados no atual estudo. Desta forma, no presente estudo,  
196 as duas amostras positivas no esfregaço sanguíneo, que se apresentaram negativas no nested  
197 PCR, foram considerados falso positivos na avaliação do esfregaço. Considera-se que outras  
198 espécies da família *Anaplasmataceae* possam apresentar estruturas semelhantes à *Ehrlichia*  
199 *canis* no esfregaço sanguíneo (Ferreira *et al.*, 2007). Da mesma forma, inclusões celulares

200 podem ser resultantes da ativação celular nos processos inflamatórios, podendo ser confundidas  
201 com inclusões parasitárias (Ramos *et al.*, 2009).

202 No presente estudo poucas amostras foram positivas (18%) em ambos os testes (nested PCR e  
203 4Dx® Plus), assim como observado em outros estudos na Índia (Parmar *et al.*, 2013) e nos  
204 Estados Unidos (Hegarty *et al.* 2009), que utilizaram o teste sorológico 3Dx®, que também  
205 detecta *Ehrlichia* pelo método de ELISA. Parmar *et al.* (2013) encontrou positividade no nested  
206 PCR e 3Dx® em 8 de 20 cães (20%); e Hegarty *et al.* (2009) obtiveram 12 de 86 amostras  
207 (13,9%) positivas no 3Dx® e PCR para *Ehrlichia*, sendo somente sete para *E. canis*. Segundo  
208 Hegarty *et al.* (2009), os resultados positivos de PCR mais baixos comparado ao 3Dx® poderia  
209 estar relacionado ao fato do PCR ser realizado principalmente para detecção de infecções ativas.  
210 Os resultados hematológicos observados neste estudo não demonstraram correlação com  
211 amostras positivas no nested PCR, apesar da literatura referir que ocorram alterações  
212 hematológicas em cães parasitados por *E. canis* (Harrus *et al.*, 2002; Shipooov, 2008). Estes  
213 resultados são semelhantes aos encontrados por Sousa *et al.* (2010), que também não  
214 observaram resultados hematológicos com diferenças significativas entre cães positivos e  
215 negativos no nested PCR.

216 As alterações hematológicas como anemia, leucopenia, trombocitopenia, ou até mesmo  
217 pancitopenia, são frequentes na erliquiose monocítica canina, entretanto estas se mostram  
218 inconstantes e inespecíficas (Harvey *et al.*, 2012). Gaunt *et al.* (2010) observou trombocitopenia  
219 severa em cães com erliquiose, entretanto, afirmam que outros agentes transmitidos pelo vetor  
220 *R. Sanguineos* poderiam causar esta alteração. A trombocitopenia pode ser causada por  
221 deficiência imunológica, diminuição da meia vida das plaquetas, sequestro pelo sistema  
222 mononuclear fagocitário e até mesmo consumo elevado das mesmas, e não necessariamente  
223 ocorre na erliquiose (Bulla *et al.*, 2004). A anemia e a leucopenia encontrada no hemograma de  
224 cães infectados por *E. canis* podem ocorrer devido a hipoplasia medular, prejudicando a  
225 produção de precusores hematopoiéticos (Gould *et al.*, 2000; Moore e Bender 2000).  
226 Entretanto, a anemia ainda pode ser decorrente de fatores nem sempre relacionados a erliquiose,  
227 como estado nutricional, reserva de ferro e infecções concomitantes (Parmar *et al.*, 2013).

228

## 229 **Conclusões**

230 Conclui-se que existe uma grande discordância entre os resultados obtidos no nested PCR e o  
231 no 4Dx® Plus e, considerando o nested PCR como padrão-ouro para o diagnóstico de erliquiose  
232 monocítica canina, observou-se uma baixa acurácia, sensibilidade e especificidade do 4Dx®

233 Plus. Apesar dos resultados, o 4Dx® Plus ainda continua sendo uma opção para o diagnóstico  
234 de erliquiose monocítica canina devido a sua praticidade e rapidez na demonstração do  
235 resultado, não demonstrada por nenhum outro método presente no mercado. Achados  
236 hematológicos, como anemia, trombocitopenia e leucopenia, apesar de muito frequentes em  
237 cães infectados por *E. canis*, não devem ser utilizados como critério diagnóstico para erliquiose  
238 monocítica canina.

239

#### 240 **Agradecimentos**

241 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
242 de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

243

#### 244 **Referências**

245 ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T. *et al.* Avaliação de iniciadores e  
246 protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.6,  
247 p. 49-54, 2005.

248 BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S. *et al.* Longitudinal quantification of Ehrlichia  
249 canis in experimental infection with comparison to natural infection. *Vet. Microbiol.*, v.136,  
250 p.321–325, 2009.

251 BULLA, C.; KIOMI, T. R; PESSOA, A. J. JR.; *et al.* The relationship between the degree of  
252 thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet. Res.*, v. 35, p.  
253 141-146, 2004.

254 DANTAS-TORRES F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*.  
255 *Parasit. Vectors.*, v.3, p.2-10, 2010.

256 DUBIE, T., MOHAMMED, Y., TEREFE, G. *et al.* An insight review on canine ehrlichiosis  
257 with emphasis on its epidemiology and pathogenesis importance. *Global J. Vet. Med. Res.*, v.2,  
258 p.059–067, 2014.

259 FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; PEREIRA, A. M. *et al.* *Anaplasma platys*  
260 diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *Intern. J. Appl. Res.*  
261 *Vet. Med.*, v.5, p.113-119, 2007.

262 GAUNT, S. D.; BEALL, M. J., STILLMAN, B. A. *et al.* Experimental infection and co-  
263 infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and  
264 molecular findings. *Parasit. Vectors.*, v.3, p.33, 2010.

- 265 GOULD, D. J.; MURPHY, K.; RUDORF, H.; CRISPIN, S. M. Canine monocytic ehrlichiosis  
266 presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *J. Small Anim. Pract.*,  
267 v.41, n.6, p.263-265, 2000.
- 268 INDEXX L. Accuracy of the SNAP 4Dx® Plus Test. 2016. Disponível em:  
269 <<https://www.idexx.com.br/files/snap-4dx-plus-test-accuracy.pdf>>. Acesso em: 20 de março  
270 de 2019.
- 271 HARRUS, S.; KENNY M.; MIARA L. *et al.* Comparison of simultaneous splenic sample PCR  
272 with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection.  
273 *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.48, p. 4488–4490, 2004.
- 274 HARRUS S.; ALLEMAN A. R.; BARK H. *et al.* Comparison of three enzyme-linked  
275 immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of  
276 canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet. Microbiol.*, v.86, p.361-368, 2002
- 277 HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*):  
278 An overview. *Vet. J.*, v.187, p. 292-296, 2011.
- 279 HEGARTY, B. C.; DINIZ, P. P. P.; BRADLEY, J. M. *et al.* Clinical relevance of annual  
280 screening using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (SNAP 3Dx) for canine  
281 ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 45, p. 118–124, 2009.
- 282 MCBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; *et al.* Kinetics of antibody response to  
283 *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 2516–2524, 2003.
- 284 MOORE, F. M.; BENDER, H. S. Neutropenia. In: FELDMAN, B.F. *et al.* Schalm's veterinary  
285 hematology. (5 Ed). Canadá: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.350-355.
- 286 MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L.C. *et al.* Molecular and serologic survey  
287 of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet.*  
288 *Parasitol.*, v.79, p. 325-339, 1998.
- 289 MUNDIM, A. V.; MORAES, I. A.; TAVERES M., *et al.* Clinical and hematological signs  
290 associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon sp.* and with other hematozoa: a  
291 retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.153, p.3-8, 2008.
- 292 MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C. *et al.* Evaluation of cytology in the  
293 diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between  
294 five methods. *Vet. Microbiol.* v.91, p.197–204, 2003.
- 295 NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T. *et al.* Canine Ehrlichiosis: clinical,  
296 hematological, serological and molecular aspects. *Cienc. Rural.*, v.38, p.766–770, 2008.

- 297 NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettiosis (*E. canis*,  
298 *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* Infections). In: GREENE, C. E. (3Ed).  
299 Infectious diseases of the dog and cat. Saunders Elsevier, St. Louis: Missouri, 2006, p. 203–  
300 216.
- 301 PARMAR, C.; PEDNEKAR, R.; JAYRAW, A. *et al.* Comparative diagnostic methods for  
302 canine ehrlichiosis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* v. 37, p. 282-290, 2013.
- 303 RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R. *et al.* Comparação de nested-PCR com  
304 o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Rev. Bras.*  
305 *Parasitol. Vet.*, v.18, p.58–62, 2009.
- 306 SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER L. *et al.* Prognostic indicators for canine  
307 monocytic ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.*, v.153, p.131-138, 2008.
- 308 SOLANO-GALLEGO, L.; SAINZ, A.; ROURA, X. *et al.* A review of canine babesiosis: The  
309 European perspective A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasit.*  
310 *Vectors.*, v.9, p.336–354, 2016.
- 311 TRALL, M. A. *et al.* Hematologia e bioquímica clínica Veterinária. São Paulo, p.78-122, 2007.
- 312 SOUSA, V.; AMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A. *et al.* Avaliação clínica e molecular de  
313 cães com erliquiose. *Cienc. Rural.*, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.
- 314 VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W. A.; GUIMARÃES, A. M. S., *et al.* Ehrlichiosis in Brazil.  
315 *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.20, p.1–12, 2011.
- 316

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Conclui-se que existe uma grande discordância entre os resultados obtidos no nested PCR e o no 4Dx® Plus e, considerando o nested PCR como padrão-ouro para o diagnóstico de erliquiose monocítica canina, observou-se uma baixa acurácia, sensibilidade e especificidade do 4Dx® Plus. Apesar dos resultados, o 4Dx® Plus ainda continua sendo uma opção para o diagnóstico de erliquiose monocítica canina devido a sua praticidade e rapidez na demonstração do resultado, não demonstrada por nenhum outro método presente no mercado. Achados hematológicos, como anemia, trombocitopenia e leucopenia, apesar de muito frequentes em cães infectados por *E. canis*, não devem ser utilizados como critério diagnóstico para erliquiose monocítica canina.

## 5. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M., et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**. v. 37, p. 796-802, 2007.

AGUIRRE, E., et al., Comparison between different polymerase chain reaction methods for the diagnosis of *Ehrlichia canis* infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008. P.118-120.

ALMOSNY, N.R.P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. F Rio de Janeiro: NDL.F. Livros, 2002.

ALVES, L. M. et al. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.

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 Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.566-571, 2009.

BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Revista veterinária**. v. 35, p. 141-146, 2004.

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

CAPRARIS, D. et al. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. **Veterinary Microbiology**, p. 206-212. 2011.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 191-201, 2001.

DAGNONE, A.S. et al. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.

DUMLER, J.S. et al. 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.

ETTINGER, S.; FELDMAN, E. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2004.



Goldstein, R.; Eberts, M.; Beall, M. et al. Performance comparison of SNAP® 4Dx® Plus and AccuPlex®4 for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Intern J Appl Res Vet Med* 12:142-147, 2014

GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3 Ed., St. Louis, Elsevier, p. 1387, 2006.

GREGORY, C.; FORRESTER S. **Infections of dog and cat**. Editora W.B.Saunders 1990. p. 404-414.

HARRUS, S. et al. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*, v. 86, n. 4, p. 361-368, 2002.

HARRUS, S.; et al. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, p.15-27, 1998.

HARRUS, S. et al. 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, p.4488- 4490, 2004

HARRUS,S.; WANER, T. Diagnoses of canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview the veterinary journal, 2010.

HASEGAWA, M.Y. et al. Evaluation of neutrophil oxidative metabolism in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Clinic Pathology**, v.34, p. 213-217, 2005.

MACHADO, R.Z. Erliquiose Canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, p. 53-57, 2004.

MAVROMATIS, K., et al. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.4015-23. 2006

MENDONÇA, C.S. et al. Erliquiose canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**. v.21, n.1, p.167-174, 2005.

MOREIRA, S.M. et al. Retrospective study (1998–2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia**, v.55, p.141-147, 2003.

MUNDIM, A.V; et al. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon sp.* and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.153, p. 2008

MYLONAKIS, M.E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, London, v, 19, p. 197-204, 2003.

NAKAGHI, A.C., et al. 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, p.75-79, 2010.

NAKAGHI, A.C.H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**. v.38, p.766-770, 2008.

NEER, T.M. et al. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p.501-504, 1999.

NELSON, R. W. e COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. Elsevier Editora, Amsterdam. 2015.

NEER, T. M. et al. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 16, p. 309-315, 2002.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* Infections). In: GREENE, C. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 2006. p. 203 – 216.

OIE. Center for Food Security and Public Health. Ehrlichiosis. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=ehrlichiosis&lang=en>> . Acessado em: 10 de janeiro de 2019.

OTRANTO, D.; DANTAS, F. T. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. **Parasites Vectors**. v.3, n.2,P.1-12, 2010.

OTRANTO, D.; DANTAS, F. T.; BREITSCHWERDT, E. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 157-163, 2009.

PANCIERA, R., EWING, S., CONFER, A. Ocular histopathology of ehrlichial infections in the dog. **Veterinary Pathology**. v.38, p.43-46. 2001

PINYOOWONG, D., et al. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution**. v.8, p.433-438, 2008.

QUINN, P. J.; et al. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

SANTOS, F., et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The veterinary Journal**. v.179,p.145-148, 2009.

SILVA, A.C.S. Zoonoses transmitidas por carrapatos: aspectos regionais e vigilância no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. Dissertação de mestrado. Faculdade de Saúde Pública. 2009.

SILVA, J.N. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-ehrlichia canis em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p.108-111, 2010.

SILVA, I.P.M. Erliquiose canina – Revisão de Literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, ano XIII, n.24, 2015.

SPINOSA, E. S. et al. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 420-424, 2017.

STILLMAN B.A., et al. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **Journals American Veterinary Medical Association**. p.80–86, 2014

SOUZA, D.M.B. et al. Erliquiose transmitida aos cães pelo carrapato marrom (*Rhipicephalus sanguineus*). **Ciência veterinária tropical**. v. 15, p. 21 - 31, 2012.

SOUSA, V.R.F. Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2006.

TILLEY, L., SMITH J., FRANCIS, K. **Consulta Veterinária em 5 minutos: espécie canina e felina**. Editora Manole, ed. 2, 2003.

TORRES, H. M. et al. Isolamento e propagação da *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** v.9, n.2, p.77-82, 2002.

TRAPP S.M., et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.223-230, 2006.

UENO, T. E. H. et al. Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009..

VIGNARD, K.; ALVES, F.R.; BLEICH, I. Erliquiose canina. **Cães e Gatos, Sorocaba**, n. 96, p. 25-28, 2001.

WANER, T.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis (CME). **Recent Advances in Canine Infectious Disease**. p. 01-05, 2000.

WELLMAN, M.L. et al. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.24, p.223-229, 1988.

WOODY, B.; HOSKINS, J. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America**. v.21, p.75-98. 1991.

## **ANEXOS**

**ANEXO A-** Tabela de resultados de 85 amostras testadas para diagnóstico de erliquiose canina no teste sorológico 4Dx® e no PCR.

Amostra	Nested PCR	4Dx® ( <i>E. Canis</i> e/ou <i>E. ewigii</i> )	4DX® ( <i>A. platys</i> e/ou <i>A. phagocytophilum</i> )	Esfregaço sanguíneo
1	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
6	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
11	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
13	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
14	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
15	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
16	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
18	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
19	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
20	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
21	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
22	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
23	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
26	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
27	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
29	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
30	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
31	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
32	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
33	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
34	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
35	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
36	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
37	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
38	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
39	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
41	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Amostra	Nested PCR	4Dx® ( <i>E. Canis</i> e\ou <i>E. ewigii</i> )	4DX® ( <i>A. platys</i> e\ou <i>A. phagocytophilum</i> )	Esfregaço sanguíneo
42	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
43	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
44	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
46	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
47	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
48	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
49	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
50	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
51	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
52	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
53	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
54	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
55	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
56	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
57	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
58	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
59	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
60	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
61	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
62	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
63	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
64	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
65	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
66	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
67	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
68	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
69	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
70	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
71	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
72	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
73	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
74	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
75	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
76	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
77	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
78	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
79	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
80	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
81	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
82	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
83	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Anexo B – Tabela de Resultados de 85 amostras testadas para diagnóstico de erliquiose canina no Esfregaço Sanguíneo e Nested PCR.

Amostra	Nested PCR	Anemia	Leucopenia	Trombocitopenia
1	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
6	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
7	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
10	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
11	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
12	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
13	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
14	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
15	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
16	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
17	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
18	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
19	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
20	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
21	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
22	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
23	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
27	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
29	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
30	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
31	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
32	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
33	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
34	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
35	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
36	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
37	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
38	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
39	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
40	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
41	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO



Amostra	Nested PCR	Anemia	Leucopenia	Trombocitopenia
42	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
43	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
44	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
46	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
47	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
48	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
49	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
50	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
51	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
52	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
53	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
54	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
55	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
56	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
57	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
58	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
59	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
60	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
61	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
62	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
63	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
64	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
65	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
66	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
67	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
68	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
69	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
70	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
71	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
72	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
73	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
74	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
75	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
76	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
77	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
78	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
79	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
80	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
81	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
82	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
83	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO