

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MARA RÚBIA ROCHA PEREIRA SALES

**PREVALÊNCIA DE *Ehrlichia canis* PELA TÉCNICA DE NESTED-
PCR E CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA DE MÓRULA E
TROMBOCITOPENIA EM CÃES DE ALEGRE-ES**

ALEGRE – ES

2012

MARA RÚBIA ROCHA PEREIRA SALES

PREVALÊNCIA DE *Ehrlichia canis* PELA TÉCNICA DE NESTED-PCR E CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA DE MÓRULA E TROMBOCITOPENIA EM CÃES DE ALEGRE-ES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias 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.

Orientador: Prof^o. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Karina Preising Aptekmann

ALEGRE – ES

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S163p Sales, Mara Rúbia Rocha Pereira, 1984-
Prevalência de *Ehrlichia canis* pela técnica de nested-PCR e correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães de Alegre-ES / Mara Rúbia Rocha Pereira Sales. – 2012.
73 f. : il.

Orientador: Olavo dos Santos Pereira Júnior.
Coorientadora: Karina Preising Aptekmann.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Cão. 2. Diagnóstico de laboratório. 3. Medicina veterinária – Alegre (ES). I. Pereira Júnior, Olavo dos Santos. II. Aptekmann, Karina Preising. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 619

MARA RÚBIA ROCHA PEREIRA SALES

PREVALÊNCIA DE *Ehrlichia canis* PELA TÉCNICA DE NESTED-PCR E CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA DE MÓRULA E TROMBOCITOPENIA EM CÃES DE ALEGRE-ES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias 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.

Aprovada em 26 de junho de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^o. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Karina Preising Aptekmann
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof^a. Dr^a. Mariana Drummond Costa Ignacchiti
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Élio Hideo Babá
Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR)
Fiocruz – Belo Horizonte

Dedico aos meus queridos pais Cleuza das
Dores Rocha e Agripino Pereira Sales Neto e
em especial a mim.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que colaboraram de forma direta e indireta para a realização deste projeto, em especial agradeço a Deus, pela saúde, força e inteligência fornecida para concluir esta etapa.

Ao Professor Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior, pela agradável surpresa em tê-lo conhecido como aluna especial, e em seguida por ter me acolhido e apoiado como aluna regular, mas principalmente pela confiança e paciência.

À querida Professora Dr^a. Mariana Drummond Costa Ignacchiti, pelo seu incentivo. Ela é realmente parte fundamental deste trabalho.

Aos Professores, Dr^a. Lenir Cardoso Porfirio, Dr^a. Karina Preising Aptekmann e Dr^a. Juliana Di Giorgio Giannotti e demais professores, pelo valoroso conhecimento que me transmitiram e, muito especialmente pela colaboração e simpatia que me receberam nesta instituição.

Ao meu amado noivo Fábio Barbosa Barbirato pelo carinho, amor, cumplicidade e, principalmente, pela paciência nos momentos em que passei sem lhe dar a merecida atenção em virtude dos estudos.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial à Carlos Cesar Jorden Almança, Rafael Motta, Maria Aparecida da Silva, Maria Cecília Cabral Rampe e Cíntia das Chagas Bernardo, pela amizade e auxílio nos trabalhos.

A meus queridos pais Cleuza das Dores Rocha e Agripino Pereira Sales Neto, a minha Tia Vera Lúcia Sales Pires, e Professora Aldinéa Silva Amorim, pelo incentivo para que continuasse sempre a estudar. Ao meu irmão André Luis Rocha Pereira Sales, pelo auxílio e por constantemente me substituir no serviço, e aos meus chefes Rosemere Teodoro Fraboni e Marcos Rodrigues de Abreu, por me liberarem do serviço quando necessário.

À Universidade Federal do Espírito Santo e todos os envolvidos neste estudo, em especialmente ao técnico de laboratório Jorge Pinto da Silva Filho, e aos alunos da graduação Aguinaldo Francisco Mendes Junior e Weslem Garcia Suhett, que também contribuíram enormemente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

“Caminhante não há caminho, faz-se caminho ao andar.”
 (“Caminante no hay camino, se hace camino al andar.”)

Antonio Machado
(apud OPAS, 2002).

RESUMO

Objetivou-se com este estudo determinar por meio da nested-PCR a prevalência da *Ehrlichia canis* em cães da região de Alegre-ES, e avaliar sua correlação com a presença de mórulas e trombocitopenia. Para isso, foram colhidas amostras sanguíneas de 85 cães, independente de raça, sexo, idade e estado de saúde. Com estas, foram confeccionadas lâminas para a pesquisa de mórulas, trombocitopenia, e execução da técnica de nested-PCR. Foi verificada uma prevalência de 1,17% ao pesquisar a presença de mórulas, 5,6% ao utilizar a técnica da nested-PCR, e foi verificada que 17,64% dos hemogramas apresentavam trombocitopenia. No entanto, somente 40% das amostras positivas pela nested-PCR, apresentaram trombocitopenia. Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a introdução de técnicas de diagnóstico molecular como a nested-PCR é um método importante para o auxílio no diagnóstico precoce de patologias.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*. mórulas. nested-PCR. trombocitopenia.

ABSTRACT

The aim of this study was determined by nested-PCR the presence of *Ehrlichia canis* in dogs located in the municipality of Alegre-ES and evaluate its correlation with morulae and thrombocytopenia. For this purpose blood samples were collected from 85 dogs, regardless of race, age, sex or health status. With these, slides were obtained for the detection of morulae, thrombocytopenia, and execution of nested-PCR technique. We verified a prevalence of 1.17% to investigated the presence of morulae, 5.6% when using the technique of nested-PCR, and was verified that 17.64% of the CBCs were thrombocytopenia. However, only 40% of positive samples by nested-PCR showed thrombocytopenia. The results presented in this study demonstrate that the introduction of molecular diagnostic techniques such as nested-PCR is an important method to aid in the early diagnosis of diseases.

Key words: *Ehrlichia canis*. morulae. nested-PCR. thrombocytopenia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo do desenvolvimento de *Ehrlichia canis* dentro de monócito. 24
- Figura 2 – Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*, demonstrando seus estágios de ovo, larva, ninfa e adulto com seus respectivos intervalos de desenvolvimento..... 27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Comparação dos mecanismos de evasão de bactérias extra e intracelulares.....	18
Quadro 2 –	Características das espécies causadoras de erliquiose monocítica canina.....	21

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

CCA –	Centro de Ciências Agrárias
CME –	<i>Canine Monocytic Ehrlichiosis</i>
DNA –	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP –	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EDTA –	Ácido Etilenodiamino Tetra-Ácético
<i>E. canis</i> –	<i>Ehrlichia canis</i>
<i>E. chaffeensis</i> –	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>
<i>E. ewingii</i> –	<i>Ehrlichia ewingii</i>
<i>E. muris</i> –	<i>Ehrlichia muris</i>
<i>E. ruminantium</i> –	<i>Ehrlichia ruminantium</i>
ELISA –	Ensaio Imunoenzimático
EMC –	Erliquiose Monocítica Canina
ES –	Espírito Santo
Fc –	Porção Cristalizável
HOVET–	Hospital Veterinário
IFN- γ –	Interferon- γ
IgA –	Imunoglobulina A
IgG –	Imunoglobulina G
IgM –	Imunoglobulina M
IL-2 –	Interleucina-2
KCl –	Cloreto de Potássio
LPS –	Lipopolissacarídeo
m –	Metro
mA –	Mille ampère
μ g –	Micrograma
MgCl ₂ –	Cloreto de Magnésio
MHC –	Complexo de Histocompatibilidade Principal
μ l –	Microlitro
mL –	Mililitro
μ m –	Micrômetro
mM –	Milimolar

μmol –	Micromol
MS –	Ministério da Saúde
NO –	Óxido Nítrico
nPCR –	nested-PCR
p –	Probabilidade de ocorrência de erro tipo I
pb –	Pares de Base
PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase
q.s.p –	Quantidade Suficiente Para
RIFI –	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA –	Ácido Ribonucléico
rRNA –	Ácido Ribonucléico ribossômico
<i>R. sanguineus</i> –	<i>Rhiphcephalus Sanguineus</i>
SVS –	Secretária de Vigilância em Saúde
Taq –	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE –	Tris-Borato-EDTA
TCD4 ⁺ –	Linfócito T <i>helper</i> ou auxiliar
TCD8 ⁺ –	Linfócito T citotóxico ou citolítico
Tm –	<i>Melting Temperature</i>
UFES –	Universidade Federal do Espírito Santo
V –	Volt
WB –	<i>Western blotting</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

$(=)$ – É igual a

$(<)$ – Menor que

(x) – Vezes

$(\%)$ – Percentagem

$(-)$ – Menos

e – exponencial

$(/)$ – Dividido por

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	BACTÉRIAS.....	18
2.1.1	<i>Ehrlichia sp.</i>	20
2.1.1.1	<i>Ehrlichia canis</i>	23
2.2	VETOR DE <i>Ehrlichia canis</i>	25
2.2.1	Ciclo Biológico do <i>R. sanguineus</i>	26
2.3	ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA	28
2.3.1	Aspectos Clínicos	29
2.3.1.1	Fase Aguda.....	29
2.3.1.2	Fase Subclínica.....	30
2.3.1.3	Fase Crônica.....	31
2.4	DIAGNÓSTICO	32
2.4.1	Diagnóstico Hematológico	32
2.4.2	Diagnóstico Parasitológico	33
2.4.2.1	Exame do esfregaço sanguíneo.....	33
2.4.2.2	Cultivo Celular.....	34
2.4.3	Diagnóstico Molecular	34
2.4.3.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	34
2.4.3.2	<i>Western blotting</i> (WB).....	36
2.4.4	Diagnóstico Sorológico	36
2.4.4.1	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	36
2.4.4.2	Ensino Imunoenzimático (ELISA).....	37
2.5	PREVENÇÃO E TRATAMENTO	37
	CAPÍTULO 1	38
3	Cap. 1 – Prevalência de <i>Ehrlichia canis</i> pela técnica molecular de nested-PCR e correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito	

	Santo	39
3.1	RESUMO.....	39
3.2	ABSTRACT.....	40
3.3	INTRODUÇÃO.....	40
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.6	CONCLUSÕES.....	46
3.7	AGRADECIMENTOS.....	46
3.8	REFERÊNCIAS.....	46
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
5	REFERÊNCIAS GERAIS.....	53

1. INTRODUÇÃO

O microrganismo do gênero *Ehrlichia* foi descrito, pela primeira vez, por Donatien e Lestoquard (1935), pesquisadores do Instituto Pasteur, da Argélia. Eles observaram organismos nas células mononucleares circulantes de um cão Pastor Alemão, infestado com o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, que desenvolviam ocasionalmente, uma acentuada doença febril. No Brasil, o primeiro relato da doença foi em Belo Horizonte (COSTA et al., 1973).

O gênero *Ehrlichia* atualmente compreende cinco espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*. As espécies que mais naturalmente infectam os cães são: *E. canis*, *E. chaffeensis*, e *E. ewingii*. Entre estas, a *E. canis* é, entre as outras espécies do gênero, a de maior prevalência e virulência entre os cães (DUMLER et al., 2001).

E. canis, o principal agente da erliquiose monocítica canina (EMC), é uma bactéria estritamente intracelular, que reside e se multiplica em monócitos e macrófagos, formando inclusões citoplasmáticas, chamadas mórulas. Excepcionalmente, podem parasitar plaquetas e neutrófilos (DUMLER et al., 2001).

Considerada uma das doenças infecciosas mais importantes para os cães, a prevalência da EMC tem relação direta com os vetores ixodídeos, os quais são dependentes das populações de hospedeiros susceptíveis à infestação e das condições climáticas de temperatura e umidade (DAGNONE et al., 2001; MACHADO, 2004).

O período de incubação da EMC pode variar de 8 a 20 dias (CASTRO et al., 2004; NEER; HARRUS, 2006), e a doença apresenta-se sob três formas clínicas: aguda, subclínica e, em alguns casos, crônica (HARRUS et al., 2002). A fase aguda tem como principais alterações hematológicas: a trombocitopenia, anemia e leucopenia (SILVA, 2001). Na fase subclínica, são observados altos títulos de anticorpos, com alterações hematológicas discretas, no entanto, sem sintomatologia (NAKAGHI et al., 2008). Já a fase crônica da infecção, apresenta alterações clínicas e laboratoriais mais severas (MENESES et al., 2008).

Como os sinais clínicos associados com a doença são inespecíficos, o diagnóstico clínico torna-se dificultado (WOODY; HOSKINS, 1991). Assim, o diagnóstico laboratorial da infecção causada por *E. canis* é de grande importância e pode ser realizado por meio da visualização de mórulas do parasito em células mononucleares, detecção de anticorpos contra *E. canis*, e mais recentemente pelo diagnóstico molecular por meio da PCR técnica que visa a amplificação de uma porção do genoma do parasito (NEER; HARRUS, 2006).

O diagnóstico sorológico e molecular da EMC já foi relatado em estudos realizados no Estado de São Paulo (OLIVEIRA et al., 2000; CASTRO et al., 2004; BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2006; NAKAGHI et al., 2008; SANTOS et al., 2009), Goiás (ALVES et al., 2005), Rio de Janeiro (MACIEIRA et al. 2005), Paraná (DAGNONE et al., 2003) e Mato Grosso do Sul (DAGNONE et al., 2006). Aproximadamente 20% da população de cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias das regiões nordeste, sudeste, sul e centro-oeste são infectados pela *E. canis* (LABARTHE et al., 2003; MOREIRA et al., 2003; BULLA et al., 2004; TRAPP et al., 2006).

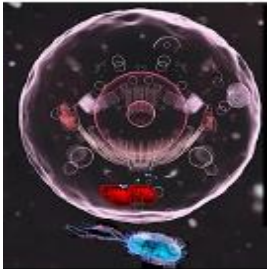
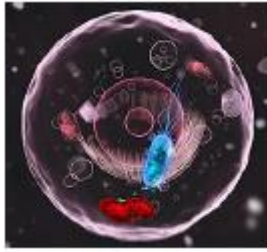
Em virtude, de a EMC ser uma doença encontrada mundialmente, de importância tanto em saúde pública quanto animal, e se tratar de uma infecção de difícil diagnóstico, realizou-se este trabalho com o objetivo de determinar a prevalência de *E. canis* através da técnica molecular de nested-PCR e avaliar sua correlação com a presença de mórulas e trombocitopenia em amostra populacional de cães da região de Alegre-ES.

Estruturalmente, esta dissertação foi dividida em uma introdução geral, revisão da literatura e um capítulo: "Prevalência de *Ehrlichia canis* pela técnica molecular de nested-PCR e correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES", que será submetido de acordo com as normas para publicação no periódico de escolha, após considerações da Banca Examinadora.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BACTÉRIAS

Bactérias patogênicas, usualmente, são classificadas em primárias e oportunistas. As primárias causam infecções em indivíduos normais e as oportunistas afetam indivíduos com o sistema imunológico comprometido (DELEO et al., 2009). Os principais mecanismos envolvidos na infecção bacteriana são: contato com as células do hospedeiro, proliferação, invasão do tecido e indução de lesões teciduais, principalmente por liberação de toxinas (HERMAN et al., 1991; PAUL, 2008). Para a resposta imune, as bactérias são classificadas em duas categorias conforme sua localização: bactérias intracelulares e extracelulares (TRABULSI et al., 2005; CLINTON et al., 2010) (Quadro 1).

Tipo de Bactéria	Mecanismo de evasão do sistema imune
<p>Extracelular</p> 	<p>Varredura dos intermediários reativos do oxigênio</p> <p>Variação antigênica</p> <p>Inibição da ativação do sistema complemento</p>
<p>Intracelular</p> 	<p>Inibição da formação do fagolisossomo</p> <p>Varredura dos intermediários reativos do oxigênio</p> <p>Ruptura da membrana do fagossoma com escape para o citoplasma</p>

Quadro 1. Comparação dos mecanismos de evasão de bactérias extra e intracelulares (adaptado de <http://www.research.a-star.edu.sg/research/6222>). Acesso em: 12 dez 2011.

As bactérias intracelulares são capazes de se replicarem no interior das células do hospedeiro como, nos fagossomos e no citoplasma (HERMAN et al., 1991; PAUL, 2008). Algumas bactérias, desse grupo, são classificadas como

intracelulares obrigatórias, pois necessitam das moléculas sintetizadas pelas células, sendo vantajoso. Sua localização permite que sejam protegidas de anticorpos, da fagocitose e de alguns antimicrobianos. Já as bactérias intracelulares facultativas podem viver tanto dentro quanto fora das células (TRABULSI et al., 2005; CLINTON et al., 2010, GERIA et al., 2010).

A característica principal das bactérias intracelulares é a resistência à fagocitose, sendo difíceis de erradicar (KAUFMAN, 1993). A imunidade celular possibilita a morte das bactérias fagocitadas e lise das células infectadas. Essas bactérias penetram nos macrófagos e estimulam, tanto as células TCD4⁺, através da expressão de antígeno associado a moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), como também células TCD8⁺, através da expressão de antígenos associados a moléculas do MHC classe I. A ativação de células TCD4⁺ leva à secreção da citocina interferon- γ (IFN- γ). Que, por sua vez, ativa os macrófagos promovendo à produção aumentada de óxido nítrico (NO) e morte das bactérias fagocitadas. As células TCD8⁺ citolíticas participam cooperativamente do mecanismo de defesa, produzindo mais IFN- γ e destruindo os macrófagos infectados (HERMAN et al., 1991; BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Outros tipos de bactérias são extracelulares. Para sobreviver no ambiente extracelular essas bactérias desenvolveram técnicas de sobrevivência que lhes permitem burlar o sistema de defesa do indivíduo infectado (TRABULSI et al., 2005; GERIA et al., 2010). As bactérias extracelulares são capazes de se replicar fora das células do hospedeiro, ou seja, na circulação, nos tecidos conjuntivos extracelulares e nos espaços de tecidos, tais como as vias aéreas, o trato geniturinário e os lumens intestinais. Com base nesta localização, os mecanismos imunológicos envolvidos no combate as infecções bacterianas também variam, sendo que, em geral, as bactérias extracelulares são eliminadas por mecanismos envolvendo principalmente o sistema complemento e anticorpos que neutralizam as toxinas liberadas (HERMAN et al., 1991; PAUL, 2008).

As bactérias extracelulares causam doença por dois mecanismos principais. Primeiro, induzem inflamação, que resulta em destruição do tecido no sítio da infecção. Segundo, muitas destas bactérias produzem toxinas que exercem diversos efeitos patológicos. Existem endotoxinas, que são componentes das paredes

celulares bacterianas, e exotoxinas, que são ativamente secretadas pelas bactérias (HERMAN et al., 1991). A endotoxina das bactérias gram-negativas, também chamada lipopolissacarídeo (LPS), é um potente estimulador da produção de citocina pelos macrófagos (IMAGAWA et al., 1997; PRAHALAD et al., 2001; PINTO et al., 2003).

A imunidade humoral, defesa através de anticorpos, desempenha importante papel na defesa contra as bactérias extracelulares, sendo esta a principal resposta imune (HERMAN et al., 1991). Os anticorpos executam várias funções para erradicar as bactérias, estes podem exercer suas ações por meio de três mecanismos: 1) opsonização seguido de fagocitose, 2) ativação do sistema complemento pela via clássica, 3) neutralização de bactérias ou de seus produtos (HERMAN et al., 1991; TU et al., 1994).

As bactérias extracelulares são rapidamente destruídas quando são revestidas por anticorpos do tipo IgG (opsonização) e fagocitadas por neutrófilos, monócitos e macrófagos teciduais, através de receptores para a porção Fc da imunoglobulina presente nessas células. Na ausência de anticorpos, a ativação do sistema complemento é coadjuvante na destruição de bactérias. A ativação do complemento por algumas bactérias promove a produção de anticorpos específicos (IgG e IgM), e a secreção da IL-2 pelos macrófagos é crítica para o desenvolvimento da imunidade mediada pela célula. Por meio do mecanismo de neutralização, os anticorpos (IgG e IgA), ligam-se a toxinas produzidas por bactérias. A ligação dos anticorpos com estruturas bacterianas interfere na capacidade do patógeno em interagir com os receptores celulares, neutralizando a ação e, com isso, impedindo que as mesmas se fixem nas mucosas, como no trato respiratório e no trato intestinal (HERMAN et al., 1991; CAILLE et al., 2004).

2.1.1 *Ehrlichia sp.*

A *Ehrlichia sp.* é uma bactéria intracelular obrigatória, cocóide, gram-negativa pequena (0.5 - 0.9µm) e pleomórfica (WANER; HARRUS, 2000), que parasita leucócitos de muitas espécies de animais, inclusive o homem (GALVÃO et al., 2002; COHN, 2003; SILVA; GALVÃO, 2004). A bactéria se localiza nas células do sistema

retículoendotelial do fígado, baço e linfonodos, sendo as células mononucleares o ponto inicial de sua multiplicação (HARRUS et al., 1998; MUNHÓZ; BABO, 1998; ANDEREG; PASSOS, 1999).

O gênero *Ehrlichia* inclui as espécies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ruminantium* e *Ehrlichia ewingii* (BRENNER et al., 2004). Em geral, a espécie de *Ehrlichia* pode ser diferenciada pelo tipo de célula que infecta. A *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis* infectam monócitos, provocando a chamada erliquiose monocítica canina (EMC) (VARELA, 2003). A *Ehrlichia canis* é caracterizada por uma doença febril (URQUHART et al., 1998). A *Ehrlichia ruminantium* é frequentemente identificada em células endoteliais, neutrófilos e macrófagos (RIKIHISA, 1991; DUMLER et al., 2001). A *Ehrlichia ewingii* invade neutrófilos, produzindo a erliquiose granulocítica (VARELA, 2003) (Quadro 2).

Espécie	Nome Comum da Doença	Principal Vetor	Principal Célula Infectada	Principal Hospedeiro Secundário	Distribuição Geográfica
<i>E. canis</i>	Erlíquiose monocítica canina	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Células mononucleares	Cães, lobos e chacais	Mundial
<i>E. chaffeensis</i>	Erlíquiose monocítica humana (HME)	<i>Amblyomma americanum</i>	Células mononucleares	Cães, coiotes e cabra	EUA, Ásia, Europa
<i>E. muris</i>	Infeção sistêmica em camundongos imunocomprometidos	<i>Haemaphysalis spp.</i>	Células mononucleares	Roedores	Japão
<i>E. ruminantium</i>	Cowdriose	<i>Amblyomma variegatum</i> ; <i>Amblyomma hebraum</i>	Células endoteliais, neutrófilos e macrófagos	Ruminantes domésticos e silvestres	África, Madagascar e Ilhas Caribenhas
<i>E. ewingii</i>	Erlíquiose granulocítica canina	<i>Amblyomma americanum</i>	Granulócitos	Cães	EUA, Camarões

Quadro 2. Características das espécies causadoras de erliquiose (VARELA et al., 2003; YU et al., 2007; adaptada).

O reconhecimento da erliquiose, como potencial causa de doença em humanos, na década de 80, estimulou as pesquisas desse agente. A detecção de outras espécies, combinada com a aplicação cada vez maior de técnicas de biologia molecular, culminou num maior número de publicações e descobertas, que resultaram na reclassificação do gênero *Ehrlichia* (COHN, 2003). Este foi reclassificado e, se encontram dentro do Reino das Bactérias, Filo das Proteobactérias, Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae e gênero *Ehrlichia* (DUMLER et al., 2001).

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

No gênero *Ehrlichia* todas as espécies apresentam uma similaridade de cerca de 97,7% na sequência do gene 16S rRNA. Entre a *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis* e a *Ehrlichia ewingii* a similaridade é maior que 98,0% (ANDERSON et al., 1992; DUMLER et al., 2001). A acentuada homologia genética das espécies do gênero *Ehrlichia* é a causa do repertório antigênico semelhante que compartilham, contribuindo para a ocorrência de reações cruzadas nos testes sorológicos. Apesar da utilidade do gene 16S rRNA para a identificação de espécies bacterianas; por ser altamente conservado, este gene demonstra limitada variabilidade entre os isolados de uma mesma espécie, não permitindo serem diferenciados ou classificados dentro de subtipos ou cepas (OLIVE; BEAN, 1999). Desta forma, outros marcadores moleculares são necessários para a tipagem de indivíduos de uma mesma espécie.

As espécies de *Ehrlichia*, em geral, não induzem a uma severa reação inflamatória nos tecidos (RIKIHISA, 1991). As espécies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* podem causar a infecção natural em cães. Não há relatos de infecção natural por *Ehrlichia ruminantium* em cães e, nos animais infectados experimentalmente não ocorrem anormalidades clínicas (BREITSCHWERDT et al., 1998).

A *Ehrlichia sp.* têm sido crescente objeto de estudo na clínica veterinária e na saúde pública, uma vez que pode causar doenças de importância veterinária e é responsável por duas zoonoses emergentes, erliquioses monocítica e granulocítica humana (THOMAS et al., 2009; DOUDIER et al., 2010).

No Brasil, pouco se conhece sobre erliquiose humana, seus agentes etiológicos ou prevalência. Porém, sabe-se da presença de espécies de *Ehrlichia* circulando entre cães e seus ectoparasitos (GALVÃO et al., 2002; DAGNONE et al., 2003; AGUIAR et al., 2007). O parasitismo humano por *R. sanguineus*, vetor da infecção, foi descrito no Brasil por Dantas-Torres et al. (2006).

2.1.1.1 *Ehrlichia canis*

A *E. canis* é uma bactéria intracelular obrigatória, pequena, gram-negativa, imóvel, cocóide e eipsoidal, com parede celular de estrutura não protéica que se localiza nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e nódulos linfáticos, replicando-se na membrana citoplasmática dos leucócitos circulantes do hospedeiro por difusão binária, no interior dos monócitos, linfócitos e raramente neutrófilos (CORRÊA; CORRÊA, 1992; DUMLER et al., 2001; RIKIHISA, 2006).

A prevalência de *E. canis* é dependente da distribuição do seu vetor, *R. sanguineus*, o carrapato marrom do cão, que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais (JOHNSON et al., 1998). Porém, hoje, é evidente um incremento destas enfermidades em climas temperados e ambientes urbanos de todo o mundo (SHAW et al., 2001). A *E. canis* se multiplica nos hemócitos e nas células da glândula salivar do carrapato, propiciando, portanto, a transmissão transtadial, que é a transmissão da bactéria presente nas larvas, para as fases de ninfa e adulto (VIGNARD-ROSEZ et al., 2001). Em contra partida, a transmissão transovariana, transmissão para ovos e larvas, provavelmente não ocorre (VIGNARD-ROSEZ et al., 2001), é rara ou inexistente (ANDERG; PASSOS, 1999). No momento da transmissão da erliquiose, o carrapato poderá transmitir outros agentes tais como: *Babesia*, *Hepatozoon* e *Hemobartonella canis* (SOUSA et al., 2004; PEREIRA, 2006).

Ao contrário das demais riquetsias, as *Ehrlichias* se replicam dentro de fagossomos da célula hospedeira (McDADE, 1990). Nyindo et al. (1971) observaram que o ciclo de desenvolvimento da *E. canis* em monócitos caninos possui três estágios: corpúsculos elementares, corpos iniciais e mórulas (Figura 1). A princípio são observados os corpúsculos elementares com 0,2 a 0,4µm (QUINN et al., 1997)

que são endocitados pelos monócitos onde permanecem em crescimento por aproximadamente 2 dias (GREGORY; FORRESTER, 1990; DAVOUST, 1993), tornando difícil a visualização à microscopia óptica (McDADE, 1990). A fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, permitindo aos corpos elementares crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo. A multiplicação ocorre por fissão binária. Três a cinco dias pós-infecção um pequeno número de corpos elementares em agrupamentos, denominados corpúsculos ou corpos iniciais são observados como inclusões pleomórficas. No sétimo ou até o décimo segundo dia subsequente, ocorre crescimento adicional e multiplicações, os corpos iniciais desenvolvem-se para inclusões maduras, chamadas mórulas e que medem 1 a 2µm (NYINDO et al., 1971; RISTIC et al., 1981; CORRÊA; CORRÊA, 1992; DAGNONE et al., 2001; LI; WINSLOW, 2003; ZHANG et al., 2004; RIKIHISA, 2006) e cada mórula contém vários corpos elementares. As mórulas são vacúolos citoplasmáticos delimitados por uma membrana simples que contém em seu interior microcolônias de pequenos corpos elementares em números e tamanhos variados (YU et al., 2007). Os corpúsculos elementares deixam as células brancas por exocitose ou rompimento das mesmas, indo parasitar novas células (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

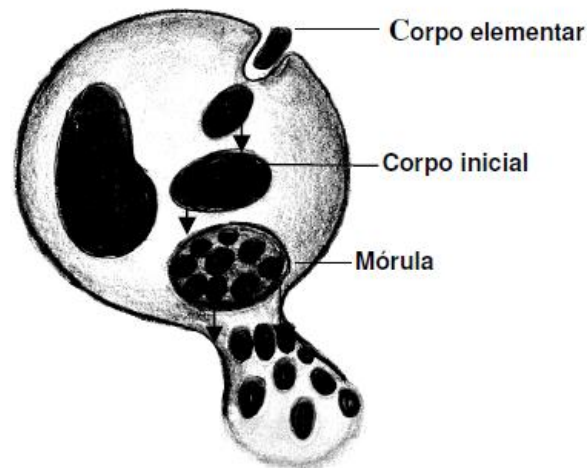


Figura 1. Ciclo do desenvolvimento de *Ehrlichia canis* dentro de monócito (DAVOUST, 1993).

Como não existem hospedeiros intermediários, e por ser uma doença de caráter hematológico, a *E. canis* pode ser veiculada por transfusões sanguíneas de um doador infectado (MUNHOZ; BABO, 1998; SHERDING, 1998) para um cão

susceptível, podendo ocorrer a partir de cães com até cinco anos de infecção crônica (SWANGO et al., 1992).

A infecção por *E. canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos, que podem ser observados na circulação sanguínea 7 dias (IgM) a 15 dias (IgG) após a infecção (WANER et al., 2001). Inicialmente os títulos de IgG são relativamente baixos, mas à medida que a infecção progride, o aumento do título é evidente. Os cães que se recuperam da fase aguda da doença ou aqueles que recebem tratamento inadequado progridem para a fase de infecção inaparente. Nestes, o título de anticorpos se mantém em altos patamares, em geral de 2.560 a 20.480 (HARRUS et al., 1997; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999). Os achados hematológicos na infecção por *Ehrlichia* são bem evidentes. Pode ocorrer leucopenia ou leucocitose de acordo com evolução clínica. A trombocitopenia ocorre tanto na infecção por *E. canis* quanto por *Anaplasma platys* e pode ser imunomediada (RIKIHISA, 1991; HARRUS et al., 1996; BULLA et al., 2004).

2.2 VETOR da *Ehrlichia canis*

O principal vetor e reservatório de *E. canis* é o carrapato marrom *R. sanguineus*, caracterizado como o mais importante ectoparasito de cães, que ao exercer hematofagismo, pode acarretar a transmissão dos parasitos (LABRUNA; PEREIRA, 2001; COUTO, 2003). O *R. sanguineus* é classificado: Filo: Arthropoda, Classe: Arachnida, Ordem: Acarina, Subordem: Ixodides, Família: Ixodidae, Gênero: *Rhipicephalus*, Espécie: *Rhipicephalus sanguineus* (COSTA; BOTELHO, 2005).

O carrapato *R. sanguineus* contamina-se ao ingerir sangue com leucócitos parasitados de animais doentes. Isto geralmente ocorre na segunda ou terceira semana de infecção do cão, uma vez que na fase aguda da infecção existe maior porcentagem de leucócitos infectados (WOODY; HOSKINS, 1991; LEGATZI; JORGE, 2002).

No Brasil, *R. sanguineus* é usualmente encontrado em cães tanto na zona urbana como na zona rural (DANTAS-TORRES et al., 2006). Adaptado ao ambiente urbano, este carrapato geralmente é encontrado em cerca de 30% dos cães. Por

estarem bem adaptados aos ambientes urbanos, estes carrapatos possuem hábitos nidícolas, entocados nas frestas dos abrigos de seus hospedeiros (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Fato semelhante pode ocorrer com cães confinados na área rural, aumentando a chance de infestação, enquanto que naqueles criados livre, as infestações podem ser menos significativas, devido a menor incidência do vetor em ambiente silvestre (GROVES et al., 1975; LEWIS et al., 1977; MURPHY et al., 1998; LABRUNA, PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES, 2008).

2.2.1 Ciclo Biológico do *R. sanguineus*

Este exige três hospedeiros diferentes para completar o ciclo (trioxeno). Para que ocorra a transmissão é necessário que o artrópode permaneça aderido ao hospedeiro, no mínimo 4 a 6 horas (SVS/MS, 2005). De acordo com Sherding (1998) e Quinn et al. (1997), por pelo menos cinco meses pós-ingurgitamento o *R. sanguineus* pode transmitir os microrganismos.

Primeiramente, as fêmeas após destacarem do hospedeiro, repletas de sangue, vão para o solo procurar um abrigo e após um período de pré-postura iniciam a oviposição (LABRUNA, 2004), onde podem colocar no ambiente cerca de 1000 a 4000 ovos, que depois de incubados por algumas semanas dão origem as larvas (LABRUNA; PEREIRA, 2001; FORTES, 2004). O período de ovipostura dura de 8 a 67 dias (NEVES, 2005). As larvas possuem 3 pares de patas (hexapodes) e, ao eclodir do ovo (19 a 142 dias), vão procurar abrigo em arbustos e frestas das paredes até que parasitem o hospedeiro novamente. Após sugar sangue do hospedeiro a larva cai ao solo, sofre ecdise e se transforma no estágio seguinte, que é a ninfa. Este processo dura entre 3 a 7 dias (LABRUNA, 2004). A ninfa é octopoda (4 pares de patas) e após alguns dias ocorre enrijecimento do tegumento, ingurgita-se novamente de sangue do seu hospedeiro, dando origem posterior ao adulto, entre 12 a 129 dias (LABRUNA, 2004). O ciclo biológico do *R. sanguineus* está representado na figura 2.

Nas áreas urbanas, a disponibilidade de habitat para as fases de vida livre do *R. sanguineus* é abundante, uma vez que a espécie tem por habitat penetrar em pequenos buracos ou frestas em superfícies de cimento ou madeira (LABRUNA; PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES, 2008). Na África do Sul, estudos realizados

com *R. sanguineus* demonstraram que a maioria das larvas ingurgitadas se desprendem de cães domésticos em períodos diurno, ao passo que a grande maioria das ninfas e fêmeas ingurgitadas se desprenderam durante o período de noturno (JACOBS et al., 2004).

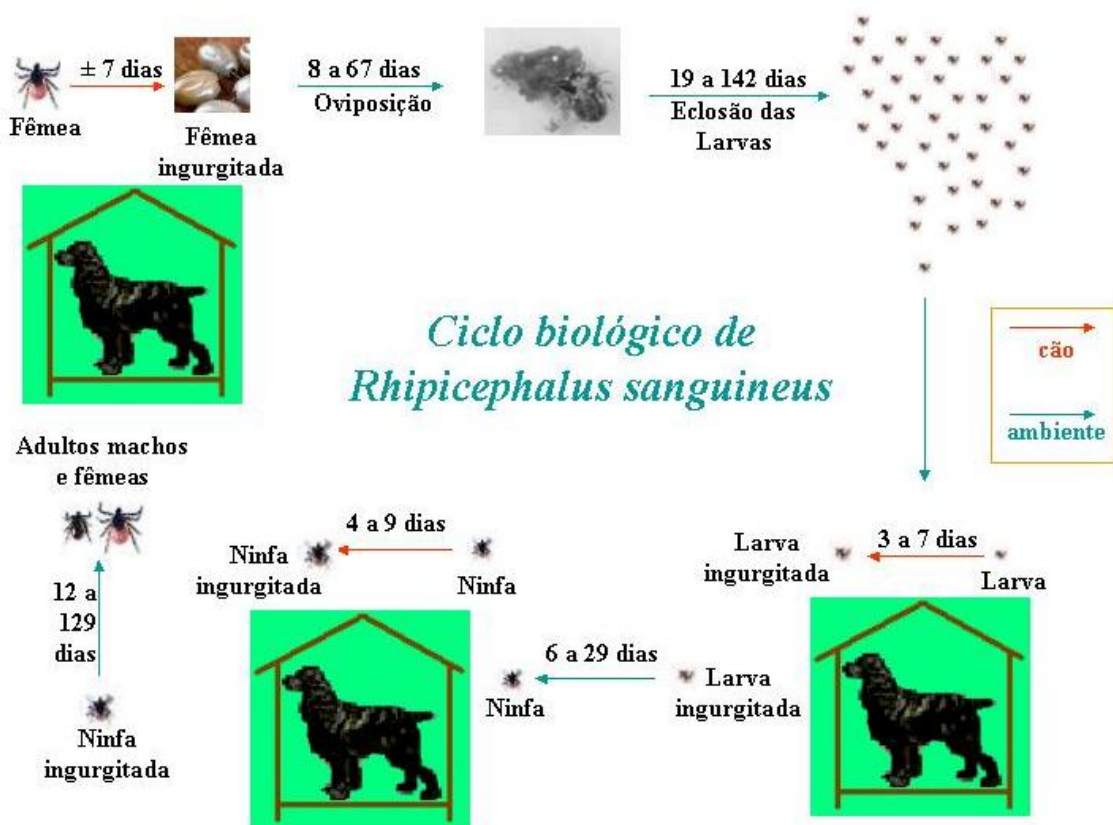


Figura 2. Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*, demonstrando seus estágios de ovo, larva, ninfa e adulto com seus respectivos intervalos de desenvolvimento (Fonte: <<http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2001/ixodidae/Rhipicephalus.html>>). Acesso em: 01 nov 2011.

As condições de temperatura influenciam muito no desenvolvimento do ovo até adulto, no qual a temperatura ótima para postura de *R. sanguineus* se situa entre 20 e 30°C (SWEATMAN, 1967), geralmente em baixas temperaturas ocorrem situações de retardamento dos estágios de desenvolvimento (KOCH; TUCK, 1986; BELLATO; DAEMON, 1997; CARNEIRO; DAEMON, 2003).

A transmissão da *Ehrlichia* ocorre por via transestadial, enquanto que a via transovariana não está comprovada. Os estágios de larva, ninfa e adulto, são capazes de transmitir a *E. canis* ao hospedeiro. Os carrapatos sobrevivem como adulto sem se alimentar de 155 a 568 dias e essa capacidade de transmissão pode prolongar-se até 155 dias pós-infecção (GROVES et al., 1975; LEWIS et al., 1977; GREENE; HARVEY, 1984; HARRUS et al., 1997).

O cão é infectante apenas na fase aguda da doença, quando existe uma quantidade importante de hemoparasitas no sangue. O carrapato poderá permanecer infectante por um período de aproximadamente um ano, visto que a infecção poderá ocorrer em qualquer estágio do ciclo (WOODY; HOSKINS, 1991). Apesar da capacidade de parasitar outros hospedeiros, o *R. sanguineus* prefere o cão como hospedeiro para a sua nutrição (DAVOUST, 1993; SLOSS et al., 1999). Bremer et al. (2005) experimentalmente demonstraram que machos adultos de *R. sanguineus*, sem a presença da fêmea, podem se infectar e transmitir (transmissão intraestadial) a doença a diferentes cães de um mesmo local.

2.3 ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA

A EMC é uma doença relativamente comum à cães, e confirmada como zoonose (SHERDING, 2008). Os sinônimos característicos incluem Doença do Cão Rastreador, Pancitopenia Canina Tropical, Febre Hemorrágica Canina e Tifo Canino, sendo que, os agentes etiológicos da erliquiose monocítica canina são a *Ehrlichia canis* (cepa mononuclear), *Ehrlichia equi* (cepa neutrofílica), *Ehrlichia platys* (cepa plaquetária) e *Ehrlichia risticii* (cepa mononuclear) (COUTO, 2003). No entanto, apenas a infecção por *E. canis* possui importância epidemiológica, por levar a um quadro clínico mais severo (WANER et al., 1995).

A EMC foi descrita em 1935, por Donatien e Lestoquard no Instituto Pasteur da Argélia, onde foi observado que cães experimentais da raça Pastor Alemão, em especial os infestados com o carrapato *R. sanguineus*, desenvolviam uma acentuada doença febril. Tais manifestações foram atribuídas a um microrganismo transmitido pelo carrapato, denominada previamente como *Rickettsia canis*. O parasito foi observado no interior de células mononucleadas circulantes de cães infestados por carrapatos (GREENE; HARVEY, 1984; RIKIHISA, 1991). Em 1945, Moshkovskii renomeou-a de *Ehrlichia canis* em homenagem ao bacteriologista alemão Paul Ehrlich, ganhador do prêmio Nobel de Medicina em 1908. Nas décadas de 1940 e 1950 foram relatadas infecções em cães por *E. canis* na África, Índia e Antilhas Holandesas. Na década de 1960 a erliquiose foi diagnosticada em Singapura, Vietiname, Estados Unidos e países europeus (EWING, 1969; KEEFE et al., 1982). Durante a guerra do Vietiname a EMC, conhecida na época como a

pancitopenia tropical canina, foi responsável pela elevação da mortalidade entre cães de guerra americanos, os quais apresentavam principalmente emaciação e hemorragia (BAVARRO et al., 2005). A partir disso, diversos casos de EMC passaram a ser descritos com frequência em outras partes do mundo (EWING, 1969; RIKIHISA, 1991).

Fatores epidemiológicos relacionados às condições climáticas, distribuição do vetor, população sob estudo, comportamento animal e habitat, assim como a metodologia empregada na investigação do agente, podem afetar os níveis de prevalência de EMC (DAGNONE et al., 2001). No Brasil, a EMC é de ampla ocorrência, principalmente em áreas urbanas, devido à alta prevalência do *R. sanguineus* (AGUIAR et al., 2007). A primeira descrição da doença causada por *E. canis* foi feita em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais por Costa et al. (1973), quando os autores observaram a inclusão citoplasmática típica de *E. canis* em linfócitos. Logo depois foi descrita por Carrillo et al. (1976), em cães militares do Estado do Rio de Janeiro. Atualmente apresenta distribuição mundial, particularmente em áreas tropicais e subtropicais (WEN et al., 1997), e no Brasil já foi identificada em todas as regiões do país (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

A doença é caracterizada por ser multissistêmica e apresenta a primeira manifestação clínica após o período de incubação do microrganismo, e pode progredir para três estágios de infecção: aguda, subclínica e crônica (MOREIRA et al., 2003).

2.3.1 Aspectos Clínicos

2.3.1.1 Fase Aguda

A fase aguda começa após 8 a 20 dias após à inoculação do parasito através do carrapato infectado e dura de 5 a 8 semanas (SKOTARCZAK, 2003), período o qual é caracterizado por alta parasitemia, quando as mórulas ou corpúsculos de inclusão são mais facilmente observados (WOODY; ROSKINS, 1991).

Os achados clínico-patológicos mais comuns são hipertemia (39,5 – 41,5°C), depressão, anorexia, linfadenopatia, emaciação, esplenomegalia, hepatomegalia, palidez de mucosas, dispneia, estertores pulmonares, cianose, secreção ocular e nasal mucopurulenta, vasculite, sinais neurológicos, musculares e de poliartrite (WOODY; HOSKINS, 1991; WANER et al., 1997; DAGNONE et al., 2001; CASTRO et al., 2004; MENESES et al., 2008). Podem apresentar tendências a sangramento, principalmente petéquias e equimoses (SOUSA et al., 2010).

Os achados hematológicos nesta fase podem incluir anemia normocítica normocrômica, leucopenia com um desvio para a esquerda (MOREIRA et al., 2003, 2005; CASTRO et al., 2004; BORIN et al., 2009), trombocitopenia (MOREIRA et al., 2003, 2005; CASTRO et al., 2004; BORIN et al., 2009; XAVIER et al., 2009), presença de mórulas em leucócitos (MURPHY et al., 2001). O achado comum a todas as fases da EMC é a trombocitopenia (NEER, 1998).

Na maioria dos casos, a fase aguda pode não ser evidente, passando despercebida pelo proprietário dos animais, e os sinais clínicos desaparecem sem tratamento dentro de uma a quatro semanas, e o cão entra na fase subclínica (DAGNONE et al., 2001; NELSON; COUTO, 2006).

2.3.1.2 Fase Subclínica

A fase subclínica instala-se quando o cão sobrevive à fase aguda e é caracterizada pela diminuição dos sintomas clínicos e elevados níveis de anticorpos séricos (WANER et al., 1997). Ocorre entre 6 a 9 semanas após inoculação do parasito (BREITSCHWERDT, 2004). Em áreas enzoóticas, esta fase pode durar anos, e cães imunocompetentes podem eliminar o parasito e recuperar-se da infecção sem tratamento (DAGNONE et al., 2001; NELSON; COUTO, 2006).

São poucas as alterações clínicas nesta fase, podendo o animal apresentar anemia não regenerativa (MOREIRA et al., 2003, 2005; ORIÁ et al., 2008; BORIN et al., 2009), leucopenia e trombocitopenia (DAGNONE et al., 2003; BULLA et al., 2004; MOREIRA et al., 2005; ORIÁ et al., 2008; SANTOS et al., 2009; XAVIER et al., 2009).

Durante esta fase há uma normalização do peso do cão, da temperatura e o cão parece normal clinicamente (WOODY; HOSKINS, 1991). O diagnóstico da doença nesta fase é um desafio ao Médico Veterinário, porém quando é reconhecido precocemente está relacionada a um bom prognóstico da doença, antes que o animal passe para a fase crônica (WANER, HARRUS, 2000).

2.3.1.3 Fase Crônica

A instalação da fase crônica varia de leve a extremamente severa, sendo que é dependente de fatores como idade, imunocompetência, virulência da cepa, infecções concomitantes, alimentação e características individuais (WOODY; HOSKINS, 1991; QUINN et al., 1997). Os sinais clínicos da fase crônica da EMC são diagnosticados por ocasião da pesquisa de outras doenças (BREITSCHWERDT, 2004).

A forma crônica leve é caracterizada por sinais clínicos vagos como apatia, depressão e perda de peso. Esta forma geralmente não é fatal e responde bem ao tratamento, já a forma crônica grave é frequentemente fatal, caso não seja devidamente tratada (DAGNONE et al., 2001).

Os achados clínico-patológicos nesta fase podem incluir febre, emaciação e edemas periféricos, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia. Os sinais são exacerbados, e incluem pneumonia, apatia, caquexia, sangramentos, tosses, equimoses, poliartrites e hematúria. Lesões oculares como hifema, hemorragias sub-retinal, uveítes, descolamento de retina e cegueira podem ocorrer, estando relacionadas às vasculites, ao aumento da pressão oncótica e às plaquetopenias. Alterações neurológicas como ataxia, disfunção motora, hiperestesia localizada e tremores podem ser ocasionadas por meningites, hemorragias nas meninges, no parênquima cerebral ou na medula espinhal. Existem ainda relatos de ooforite e orquite-epididimite em cães infectados com *E. canis* (HARRUS et al., 1997, 1998, 1999; NASCIMENTO; SANTOS, 2003; CASTRO et al., 2004; WALKER et al., 2008).

A trombocitopenia é um achado hematológico que nesta fase crônica é mais grave, por haver supressão da medula óssea (HARRUS et al., 1999; NELSON; COUTO, 2006; GREENE, 2006). A monocitose, linfocitose, leucopenia e anemia

mais severa, também são características proeminentes (WOODY; HOSKINS, 1991; DAGNONE et al., 2001).

Os cães que se recuperam da doença permanecem portadores, podendo manter a infecção por períodos superiores a 5 anos (ANDEREG; PASSOS, 1999). De tal forma, a EMC tem sido motivo de grande interesse, tanto para pesquisas em medicina veterinária, quanto para saúde pública (STICH et al., 2008).

2.4 DIAGNÓSTICO

A erliquiose é uma “zoonose emergente” (COUTO, 2003), cujo reconhecimento precoce é importante. As técnicas de diagnóstico utilizadas são as mesmas para todas as espécies conhecidas até o momento.

A detecção direta de *E. canis* é difícil (ALBERNAZ et al., 2007; BORIN et al., 2009), pois as espécies do gênero *Ehrlichia* apresentam dificuldades para o diagnóstico, já que os sinais clínicos associados com a doença são inespecíficos (WOODY; HOSKINS, 1991). O diagnóstico da EMC é baseado na combinação dos sinais clínicos, anormalidades hematológicas, achados citológicos, que incluem a identificação de mórulas intracelulares em esfregaço sanguíneo, sorológicos, que incluem a detecção de anticorpos específicos contra o agente infectante, sendo mais recentemente a reação em cadeia da polimerase incorporada ao plano diagnóstico (McBRIDE et al., 1996; KEYSARY et al., 2001; DAGNONE et al., 2001; WANER et al., 2001; BULLA et al., 2004; HARRUS et al., 2004; MACIEIRA et al., 2005; TRAPP et al., 2006; NEER; HARRUS, 2006; AGUIAR et al., 2007). O cultivo da *E. canis* de sangue e tecidos também é utilizado como método de diagnóstico (DAGNONE et al., 2001).

2.4.1 Diagnóstico Hematológico

Na fase aguda pode ocorrer anemia, trombocitopenia, pancitopenia, linfocitose granular e leucopenia leve. Na fase crônica é comum haver trombocitopenia, leucopenia, monocitose, linfocitose e anemia mais severa (DAGNONE et al., 2001; MENDONÇA et al., 2005).

Apesar das diversas descrições demonstrando a forte associação da trombocitopenia com cães infectados por *E. canis*, este fator não pode ser considerado como único critério diagnóstico, uma vez que infecções com outros hemoparasitos também provocam essa alteração. Contudo, a trombocitopenia no quadro clínico de cães de áreas endêmicas para erliquiose deve ser considerada como diagnóstico presuntivo dessa enfermidade (BULLA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2005).

O número de monócitos pode variar muito entre cães, sendo a monocitose um achado frequente e indicativo da possibilidade de erliquiose mesmo antes da observação de mórulas, que comumente são observadas nas altas parasitemias, características de fase aguda (PAGANI et al., 2000).

2.4.2 Diagnóstico Parasitológico

2.4.2.1 Exame do esfregaço sanguíneo

A pesquisa de mórulas intracitoplasmáticas características de *E. canis* em lâminas de esfregaço de sangue periférico é uma opção viável, simples, barata e fornece um registro permanente (UENO et al., 2009; FRITZ, 2009). No entanto, as mórulas de *E. canis* são difíceis de serem detectadas porque a riquetsia está presente em baixas concentrações, raramente ultrapassa 1% de células infectadas (DAGNONE et al., 2001; ALBERNAZ et al., 2007). A visualização de mórulas provê um diagnóstico definitivo (VARELA, 2003), embora a ausência do microrganismo no sangue não exclui a possibilidade de infecção e torna frequente o resultado falso-negativo (HOSKINS, 1991). A presença de mórulas em leucócitos ou plaquetas é mais frequentemente observada na fase aguda, embora apenas em uma pequena parcela de cães (DAGNONE et al., 2001; BULLA et al., 2004).

Esta técnica requer apenas um microscópio óptico para a leitura dos esfregaços sanguíneos, o que torna essa técnica acessível podendo ser realizada no próprio consultório veterinário (FARIA et al., 2010).

2.4.2.2 Cultivo Celular

A utilização do isolamento do microrganismo em cultura celular para a detecção de *E. canis* em amostras sanguíneas de cães infectados é sensível e específica. Entretanto, necessita de profissional habilitado, possui alto custo e requer uma a dez semanas para a obtenção do resultado, limitando sua eficiência como uma ferramenta de diagnóstico rápido (McBRIDE et al., 1996; HARRUS; WANER, 2011).

2.4.3 Diagnóstico Molecular

2.4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase, conhecida pela sigla PCR - “Polimerase Chain Reaction”, é um método que revolucionou a prática da Biologia Molecular. Foi inicialmente descrito por Saiki, Mullis et al., em 1985, na revista Science (SAIKI et al., 1985). O princípio da técnica da PCR é simples e baseia-se em ciclos de síntese de DNA, onde cada ciclo é constituído por três passos: 1) desnaturação da fita dupla de DNA, da amostra que servirá como molde, o que é obtido por incubação rápida (de 30 segundos a 1 minuto) a 95°C, 2) Ligação dos oligonucleotídeos iniciadores com a sequência-alvo do DNA, o que é obtido a uma temperatura com valores ideais entre 55°C a 65°C, com o tempo de aproximadamente 1 minuto. Para o cálculo dessa temperatura consideram-se o tamanho e a composição de bases dos oligonucleotídeos, e 3) Extensão dos oligonucleotídeos iniciadores, com o auxílio da enzima *taq*-DNA-polimerase, realizado a uma temperatura de 70°C a 72°C, durante um intervalo de tempo de um a três minutos. Um ciclo faz tipicamente 3-5 minutos e é repetido 20-40 vezes. Um tubo da reação de PCR contém uma mistura tampão, dNTPs, oligonucleotídeos iniciadores, enzima (*taq*-DNA-polimerase) e ácido nucléico do espécime de interesse (SCHOCHETMAN et al., 1988). É uma ferramenta muito utilizada para amplificar seletivamente regiões específicas da molécula de DNA (INNIS et al., 1995; BROWN, 2003).

A PCR é uma técnica altamente sensível e específica, e vem sendo utilizada como alternativa ao diagnóstico microbiológico de doenças infecciosas (RIKIHISA,

1994; HARRUS et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008). A PCR é capaz de detectar um único fragmento de DNA em uma amostra, distinguindo se um cão soropositivo é portador ou não da *E. canis*, visto que a soropositividade pode manter-se mesmo em animais livres do parasito (IQBAL; RIKIHISA, 1994; HARRUS et al., 1998; BREITSCHWERDT et al., 1998; KORDICK et al., 1999; SUKASAWAT et al., 2000). La Scola e Raoult (1997) relataram que a PCR é técnica de eleição para o diagnóstico da EMC, pois pode detectar o agente mesmo antes da formação de mórulas ou de soroconversão. A técnica visa amplificar apenas um segmento comum ao gênero, o gene 16S rRNA (HIRATA; HIRATA, 1997), devido a alta conservação do mesmo entre as espécies de *Ehrlichia* (FOX et al., 1992). Já foi detectado DNA erliquial em amostras de sangue periférico, aspirados de baço e medula óssea (HARRUS et al., 2004), soro sanguíneo (MYLONAKIS et al., 2009), como também a partir de tecidos macerados oriundos do cérebro, cerebelo, coração, pulmão, fígado, baço, estômago, intestinos, rins, linfonodos, medula óssea e vesícula biliar (RUNGSIPIPAT et al., 2009).

A identificação da espécie deve ser feita com a PCR tipo "NESTED", que é uma variação da técnica de PCR tradicional, por incluir na sua execução uma etapa de re-amplificação do produto (WEN et al., 1997). O produto de amplificação gerado na primeira PCR serve de molde para a segunda reação (ABATH et al., 2006; MELO et al., 2006). Portanto, na nested-PCR ocorrem duas reações de amplificação simples consecutivas, pois uma única amplificação do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* geralmente não é sensível o suficiente para detectar baixas parasitemias no sangue e nos tecidos de animais infectados não diferenciando as espécies (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998; SEAMAN et al., 2004).

Devido a sua alta sensibilidade a nested-PCR é recomendada para o diagnóstico no início da infecção, identificando a espécie de *Ehrlichia sp.* envolvida (NAKAGHI et al., 2008). Esta técnica, utilizando um oligonucleotídeo iniciador genérico e outro específico, demonstrou 100% de especificidade na amplificação de um fragmento de 398 pares de bases do gene 16S rRNA para *E. canis* (ALVES et al., 2005). Uma importante característica da técnica, aplicada ao diagnóstico de *E. canis* é sua capacidade de amplificar o DNA deste parasito antes que a sorologia seja capaz de detectar anticorpos anti-*E. canis*, o que mostra sua superioridade no diagnóstico da erliquiose na fase aguda.

2.4.3.2 Western Blotting (WB)

O WB ou immunoblotting tem sido caracterizado como técnica auxiliar no diagnóstico de *Ehrlichias*, podendo ser utilizado para confirmar resultados da imunofluorescência (IQBAL et al., 1994; IQBAL; RIKIHISA, 1994). É considerada uma técnica menos eficaz do que a PCR na detecção precoce do parasito (DAGNONE et al., 2001).

2.4.4 Diagnóstico Sorológico

2.4.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A prova de RIFI é considerada mais aceitável e o teste sorológico mundialmente utilizado para o diagnóstico de EMC (WANER; HARRUS, 2000; VARELA, 2003). É uma técnica sensível, detectando anticorpos anti-*E. canis* a partir do sétimo dia após infecção (SHERDING, 1998). A positividade não indica a fase da doença na qual o cão se encontra, mas apenas comprova se o animal teve contato com o agente etiológico, pois anticorpos séricos podem ser detectáveis por longos períodos (NEER et al., 2002).

A maior desvantagem da RIFI é o grande número de reações inespecíficas originadas por antígenos comuns a outros agentes do mesmo grupo de *Ehrlichias* (RIKIHISA et al., 1991; DUMLER et al., 1995; WANER; HARRUS, 2000). Há uma forte reação cruzada entre *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia sennetsu* (RISTIC et al., 1981; RIKIHISA, 1991) e *Ehrlichia chaffeensis*, tornando impossível a realização do diagnóstico preciso entre essas três espécies pela RIFI. Estas reações cruzadas são comuns entre as espécies de *Ehrlichias*, e por tal razão a identificação da espécie pode não ser alcançada, evidenciando a importância de se utilizar técnicas de biologia molecular no auxílio do diagnóstico e classificação do parasito (WEN et al., 1997; NEER et al., 2002). Isso se deve pela dificuldade em distinguir o agente etiológico específico, a baixa reprodutibilidade e a falta de um procedimento padronizado que garanta a não variabilidade dos resultados inter e intra-laboratórios (AGUIRRE et al., 2004; CÁRDENAS et al., 2007). A RIFI segundo Waner et al.

(2001) requer equipamentos caros e necessita de pessoal treinado, o que pode dificultar a sua utilização.

2.4.4.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O teste de ELISA apresenta como vantagens alta sensibilidade, e custo relativamente baixo e a não necessidade de equipamentos de alto custo (MADRUGA et al., 2001). Os resultados são de fácil leitura e proporcionam um registro permanente (LEGATZKI; JORGE, 2002). Waner et al. (2001) concluíram que o teste de ELISA e RIFI são igualmente sensíveis na detecção de anticorpos IgG contra *E. canis*.

2.5 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

A prevenção desta doença gira em torno da minimização da exposição. O controle do carrapato é fundamental, para a prevenção eficaz da infecção por *Ehrlichia*. Vários produtos disponíveis no mercado são altamente eficazes para aplicação direta no cão, e para pulverização das instalações com intuito de diminuir a população de carrapato no ambiente do cão (COHN, 2003). Ainda não existem no mercado vacinas disponíveis para a prevenção da EMC (VIGNARD-ROSEZ et al., 2001; NEER et al., 2002).

A localização intracelular de alguns microrganismos é um fator limitante na eficácia da terapia antibacteriana dificultando a erradicação destes parasitos de hospedeiros infectados (TZIPORI; WARD, 2002). O tratamento da erliquiose monocítica canina é feito com o uso de drogas como tetraciclina, doxiciclina (NEER et al., 2002) e dipropionato de imidocarb (MATTHERWMAN et al., 1994). Sendo a doxiciclina mais usual devido à sua baixa toxicidade, na dose de 10 mg/Kg uma vez ao dia (SID) via oral (VO) por 28 dias, considerado o tratamento de eleição (NEER et al., 2002). O tratamento com o dipropionato de imidocarb é feito na dose de 5 mg/Kg via subcutânea (SC) em duas aplicações em intervalo de 15 dias (MATTHERWMAN et al., 1994).

CAPÍTULO 1

Prevalência de *Ehrlichia canis* pela técnica molecular de *nested*-PCR e correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo

Cap. 1 – Prevalência de *Ehrlichia canis* pela técnica molecular de *nested*-PCR e correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo

Prevalence of *Ehrlichia canis* using the *nested*-PCR molecular technique and correlation with the presence of morulae and thrombocytopenia in dogs treated in Veterinary Hospital of the Federal University of Espirito Santo

Mara Rúbia Rocha Pereira Sales¹ Mariana Drummond Costa Ignacchiti³
Aguinaldo Francisco Mendes Junior² Weslem Garcia Suhett² Lenir Cardoso
Porfírio³ Mozart Marins⁴ Karina Preising Aptekmann³ Olavo dos Santos
Pereira Júnior^{3*}

3.1 RESUMO

Ehrlichia canis é o agente etiológico primário da erliquiose monocítica canina. A doença é transmitida principalmente pelo carrapato marrom do cão, o *Rhipicephalus sanguineus*, sendo endêmica em diversas regiões do Brasil. A realização deste estudo teve como objetivo determinar, por meio da técnica de *nested*-PCR, a prevalência da *Ehrlichia canis* em 85 cães, independente de raça, idade, sexo ou estado de saúde, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Alegre-ES, e avaliar sua correlação com a presença de mórula e trombocitopenia. Observou-se que 1,17% das amostras analisadas pelo esfregaço sanguíneo foram positivas para a presença de mórula. A *nested*-PCR demonstrou positividade para 5,88% das amostras. E 17,64% das amostras apresentaram trombocitopenia. Ao analisar as técnicas, conclui-se que a introdução de técnicas de diagnóstico molecular como a *nested*-PCR é um método importante para o auxílio no diagnóstico precoce de patologias.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*. mórula. *nested*-PCR. trombocitopenia.

^IPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), Alegre, ES, Brasil.

^{II}Graduando em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo

^{III*}Professor do centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), Alegre, ES, Brasil. E-mail para correspondência: olavoufesjr@gmail.com.

^{IV}Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

3.2 ABSTRACT

Ehrlichia canis, is the primary etiologic agent of canine monocytic ehrlichiosis. The disease is mainly transmitted by the brown dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* in different endemic regions of Brazil. The purpose of this study was determined using the Nested Polymerase Chain Reaction (*nested-PCR*) the prevalence of *Ehrlichia canis* in 85 dogs, regardless of race, age, sex or health status, treated at the Veterinary Hospital of Federal University of Espirito Santo, in Alegre-ES and evaluate its correlation with the presence of morulae and thrombocytopenia. It was observed that 1,17% of the samples were positive by blood smear, for the presence of morulae. However, the *nested-PCR* showed 5,88% positivity of samples. And 17,64% samples showed thrombocytopenia. By analyzing all the techniques, it was concluded that the introduction of diagnostic techniques such as *nested-PCR* is an important method for aid in early diagnosis of pathologies.

Keywords: *Ehrlichia canis*. morulae. *nested-PCR*. thrombocytopenia.

3.3 INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC), foi a primeira espécie de *Ehrlichia* descrita no Brasil a infectar cães (LABRUNA; PEREIRA, 2001). São bactérias gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórios de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, tais como monócitos e macrófagos e, para algumas espécies, em células mielóides, tais como neutrófilos (DUMLER et al., 2001). É transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato marrom do cão, de distribuição cosmopolita, particularmente encontrado em regiões de climas tropicais e subtropicais (AGUIRRE et al., 2004; WANER; HARRUS, 2000). Caracterizada como uma enfermidade parasitária que acomete cães de todas as raças e idades. No Brasil, a EMC foi primeiramente descrita por Costa et al. (1973), em cães da raça Pastor Alemão, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

A patogênese da EMC envolve três fases consecutivas: aguda, subclínica com infecção assintomática persistente e a fase crônica (HARRUS et al., 2002). As

principais alterações hematológicas provocadas pela EMC incluem trombocitopenia, anemia e leucopenia (DAGNONE et al., 2001; HARRUS et al., 2002; BULLA et al., 2004; MACHADO, 2004; SOUSA et al., 2010).

O diagnóstico laboratorial da infecção causada por *E. canis* é de grande importância, uma vez que 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias em vários estados do Sudeste, Sul, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil, apresentam anticorpos contra antígenos de *E. canis* (DAGNONE et al., 2001; LABARTHE et al., 2003; MOREIRA et al., 2003). O diagnóstico pode ser feito através da visualização de mórulas do parasito em células mononucleares, detecção de anticorpos contra *E. canis* ou ainda a amplificação de uma porção do genoma do parasito através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (BREITSCHWERDT, 2000). La Scola e Raoult (1997) relataram que a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) é técnica de escolha para o diagnóstico da EMC, pois pode detectar o agente mesmo antes da formação de mórulas ou de soroconversão. Porém, a identificação da espécie deve ser feita com a PCR tipo "NESTED", que é uma técnica altamente sensível e específica para a detecção de *E. canis*, por incluir na sua execução uma etapa de re-amplificação do produto (WEN et al., 1997). Assim, esse estudo teve como objetivo determinar a prevalência da *Ehrlichia canis* em cães com e sem suspeita clínica para EMC, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Alegre-ES, por meio da técnica de *nested*-PCR, e avaliar sua correlação com a presença de mórulas e trombocitopenia.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

População

O estudo incluiu 85 cães, independente da raça, idade, sexo ou estado de saúde, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET), localizado no município de Alegre-ES, no período de agosto a novembro de 2010.

Coleta de sangue, análise hematológica e parasitológica

Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em tubos contendo EDTA 10% (ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante. Parte do sangue foi destinado para a realização de exame hematológico e pesquisa de estruturas compatíveis com mórula de *Ehrlichia*, por meio do esfregaço sanguíneo.

Os esfregaços foram fixados com álcool metílico por 3 minutos, secado e corado por coloração do tipo Giemsa. Transcorridos de 10 a 20 minutos, foram enxaguados em água corrente e novamente secados, para então serem analisados no microscópio óptico com óleo de imersão em aumento de 100 vezes (OLICHESKI, 2003). No hemograma, analisou-se a série plaquetária de acordo com Kaneko (1997). Foram considerados trombocitopênicos os animais que apresentaram valores inferiores ou iguais a $200.000.\mu\text{L}^{-1}$ plaquetas.

Extração do DNA e técnica de *nested*-PCR

A extração de DNA das amostras foi realizada com o auxílio do Kit Blood GenomicPrep de acordo com o boletim técnico do fabricante (GE Healthcare). Todas as amostras foram analisadas quanto a integridade do DNA em gel de agarose 0,7%. O DNA foi armazenado a -30°C até sua utilização pela técnica de *nested*-PCR.

Para verificar a presença de *E. canis*, as amostras de DNA foram testadas como o auxílio da técnica de *nested*-PCR de acordo com Wen et al. (1997) e Murphy et al. (1998), como descrito abaixo.

Para a primeira mistura reacional foram utilizados os oligonucleotides iniciadores ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3') e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') na concentração de 20 nmols cada, que direcionaram a amplificação de um fragmento de 458 pares de bases (pb) do gene 16S rRNA de todas as *Ehrlichia sp.*, 5,0 μl de tampão (10x), 3,0 μl de MgCl_2 (25mM), 2,0 μl de dNTP (0,25 μmol), 1,0 μl de Taq DNA polymerase (1,5U - Fermentas), 10 μl de DNA genômico (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$) e água ultrapura q.s.p. para um volume total de 50 μl .

Para a segunda reação, em 1 μl da primeira, foram adicionados os oligonucleotides específicos ECAN (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') e HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') que direcionam a amplificação de um fragmento de 398pb *E. canis* específica. Os demais

componentes da mistura reacional foram mantidos como descrito para a primeira amplificação, em um volume final de 50 μ l.

Ambas as reações de amplificação foram conduzidas no termociclador (Techne® TC-412) em programa constituído um etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida por 1 minuto para a ligação dos oligonucleotídeos à temperatura de 55°C, e 1 minuto de extensão a 72°C. Após os 40 ciclos, as reações foram mantidas a 72°C por 7 minutos para extensão final. As reações foram avaliadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) em tampão de corrida TBE 1X e visualizadas no transluminador, acoplado a um sistema de fotodocumentação (L-PIX HE, Loccus Biotecnologia).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 85 amostras caninas avaliadas por meio da técnica de PCR, 5,88% (05/85) se mostraram positivas para *Ehrlichia sp.*, sendo observado a amplificação de um fragmento de DNA de 458pb a partir do gene 16S rRNA, como exemplificado na figura 1, linha 2. Ao serem submetidas à reação da nPCR, em 100% (05/05) das amostras foram detectados fragmentos de aproximadamente 398pb, característicos para *E. canis*, como descrito por Murphy et al. (1998) (Figura 1).

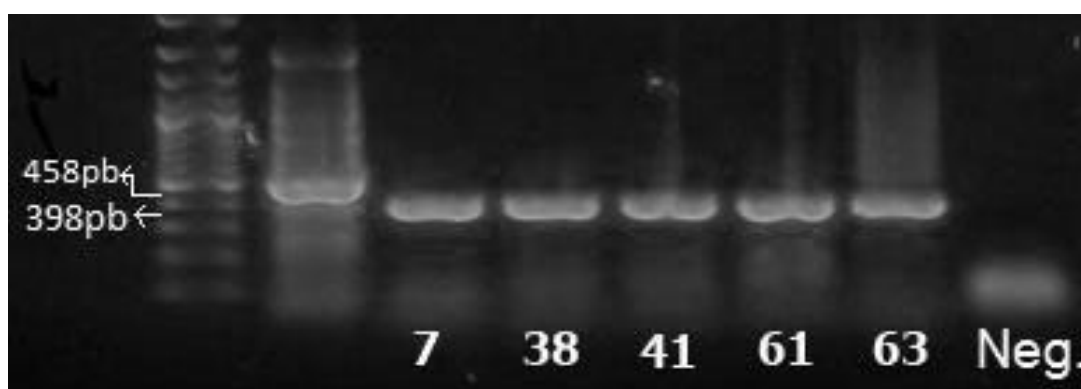


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo do produto de PCR de amostras de sangue de cães atendidos no HOVET. Fragmentos de 458pb, caracteriza positivo para *Ehrlichia sp.*, e 398pb, caracterizam os produtos amplificados positivo para *Ehrlichia canis*. Linha 1, marcador de peso molecular (100pb); linha 2. controle positivo *Ehrlichia sp.*; linhas 3 a 7, amostras testadas, positivas para *E. canis*; linha 8, controle negativo (cão sabidamente negativo para a doença). CCA-UFES, Campus de Alegre, 2011.

Entre as amostras analisadas, de acordo com médico veterinário clínico do HOVET 10 foram de animais com alguma suspeita clínica de EMC, dentre elas: anemia, hipertermia, petéquias, perda de peso. A amplificação de DNA da *E. canis* foi confirmada por meio da técnica de nPCR em 30% (03/10) dessas amostras. Este dado foi similar ao encontrado por Bulla et al. (2004), em Botucabu, São Paulo, e inferior ao encontrado em Jaboticabal, São Paulo (NAKAGHI et al., 2008). Já 2,35% (02/85) das amostras, não tiveram suspeita clínica para o parasito, e se mostraram positivas. O que demonstra que a técnica pode ser utilizada no auxílio do diagnóstico, culminando em tratamentos mais eficazes, uma vez que a nPCR é um teste que tem a capacidade de detectar baixa parasitemia e inferir se um cão soropositivo é portador ou não do parasito (IQBAL et al., 1994, HARRUS et al., 1998).

Na pesquisa realizada por meio da técnica de esfregaço sanguíneo, foi observada a presença de mórula em 1,17% (01/85) das amostras. Este dado corrobora com o estudo de Nakaghi et al. (2008), que ao analisarem 30 cães, detectaram-se apenas um animal positivo (3,33%), e inferior ao encontrado em Uberlândia, Minas Gerais (BORIN et al., 2009), no qual evidenciaram-se 251 cães (5,69%) portadores de mórula de *Ehrlichia sp.*, e 219 cães (13,89%), positivos para corpúsculos iniciais, elementares ou mórulas em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (ALBERNAZ et al., 2007). Sendo que, a amostra que se mostrou positiva por meio da técnica de esfregaço sanguíneo, foi considerada negativa para a nPCR. Para Mylonakis et al. (2003), um grande fator gerador de falso-positivo, seria a inobservância de mórulas e, de fato, inclusões intracitoplasmáticas em leucócitos, incluindo material de fagocitose ou grânulos azurófilos, dados que corroboram com o estudo de Ramos et al. (2009), Ueno et al. (2009) e Sousa et al. (2010). Vale ressaltar que, os valores encontrados em amostras de esfregaços sanguíneos podem ser inferiores aos encontrados através de outras técnicas de diagnóstico, pois em infecções subagudas ou crônicas, a parasitemia é muito baixa (MOREIRA et al., 2005; CASTRO et al., 2004). O estudo de Nakaghi et al. (2008) demonstra tal afirmação, pois dos 30 animais analisados, apenas 01 demonstrou positividade pela técnica de esfregaço sanguíneo, e 16 amostras (53,33%) foram positivas para a nPCR.

Na avaliação hematológica observaram-se, nos casos positivos por meio da nPCR, a presença de trombocitopenia. Este resultado está em concordância com outros estudos realizados no Brasil (ALBERNAZ et al., 2007; MENESES et al., 2008;

BORIN et al.; 2009; SOUSA et al., 2010).

A infecção por *E. canis* pode levar à supressão difusa da medula óssea, induzindo trombocitopenia, anemia e leucopenia (GOULD et al., 2000), sendo que a trombocitopenia é o principal achado hematológico observado em todas as fases da EMC (ALMOSNY et al., 2000; PAGANI et al., 2000; MOREIRA et al., 2003), embora não seja exclusivo desta patologia, mesmo em área geográfica com a prevalência da doença relativamente elevada (MACIEIRA et al., 2005). Assim, das 85 amostras avaliadas em nosso estudo, 17,64% (15/85) apresentaram trombocitopenia, no entanto, apenas 13,33% (02/15) destas foram positivas para EMC pela nPCR. Esses achados indicam que a presença de trombocitopenia não deve ser indicativo da presença de *E. canis*, sendo prudente a realização de testes complementares.

De acordo com Santos et al. (2009), em estudo realizado no município de Ribeirão Preto, São Paulo, de 221 cães avaliados, 107 (48,4%) apresentavam trombocitopenia. Embora 57 (53,3%) desses animais foram positivos para *E. canis*, com auxílio da técnica de nPCR, em 50 (46,7%) animais trombocitopênicos não foi detectado o parasito. De acordo com os autores, esse resultado reforça que a trombocitopenia não é específica para a detecção de infecção por *E. canis* e não deve ser utilizado exclusivamente para estabelecer um diagnóstico para esse parasito. Estudo realizado por Sousa et al. (2010) demonstraram que em 48 cães infectados com o parasito, 14 apresentaram trombocitopenia, não sendo observada diferença significativa com os cães negativos. Macieira et al. (2005), demonstraram que em 112 cães com diagnóstico positivo para EMC, com auxílio de oligosiniciadores específicos para *E. canis*, 30 (26,8%) apresentavam-se trombocitopênicos. Esses dados indicam que a presença ou ausência de trombocitopenia, não deve ser indicativo de EMC, pois animais sem essa alteração hematológica podem apresentar o parasito.

Em virtude de a EMC ser uma infecção causada por agentes rickettsiais em carrapatos, que possuem prevalência bastante variável em todo o mundo, tal disparidade ocorrida entre vários estudos, em relação a presença do parasito diagnosticada através da técnica da nPCR e sua correlação com a presença de mórulas e trombocitopenia pode estar associada com fatores climáticos, como à exposição da população canina ao vetor (AKTAS et al., 2009; RAMOS et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012).

O sucesso do tratamento dessa parasitose depende de um diagnóstico precoce, que deve ser realizado no início da patologia (DAGNONE et al., 2001). Pois os achados laboratoriais dos cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* são bastante similares com outras patologias e a duração e severidade dos sinais clínicos são variados.

3.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a importância da técnica de nPCR no auxílio do diagnóstico de EMC na clínica de pequenos animais, em virtude de ser uma técnica sensível e específica quando comparada ao diagnóstico, por meio da detecção de mórula ou pela presença de trombocitopenia.

3.7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao técnico Jorge Pinto da Silva Filho, pela ajuda com a leitura das lâminas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES e FAPES).

3.7 REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 796-802, 2007.

AGUIRRE, E.; SAINZ, A.; DUNNER, S.; AMUSATEGUI, I.; LOPZ, L.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; LUACES, I.; CORTÉS, O.; TESOURO, M. A. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, n. 3-4, p. 365-72, 2004.

AKTAS, M.; ALTAY, K.; DUMANLI, N.; KALKAN, A. Molecular detection and identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species in ixodid ticks. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, n. 5, p. 1243-1248, 2009.

ALBERNAZ, A. P.; MIRANDA, F. J. B.; MELO Jr., O. A.; MACHADO, J. A.; FARJARDO, H. V. Ehrliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALMEIDA, A. B. P. F.; PAULA, D. A. J.; DAHROUG, M. A. A.; FREITAS, A. G.; SILVA, J. N.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1123-26, 2012.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L.; SILVA, G. V. O.; RODRIGUES, L. M.; XAVIER, M. S. Avaliação hematológica de cães infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, n. supl., p. 111-111, 2000.

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**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 566-71, 2009.

BREITSCHWERDT, E. B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. v. 1, cap. 86, p. 400-407.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAÚJO Jr., J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, Paris, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.

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

COSTA, J. O., SILVA, M., GUIMARÃES, M. P., BATISTA JUNIOR, J. A. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte-Brasil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

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

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BECKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGURWA, 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**, Reading, v.51, p. 2145-2165, 2001.

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

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZEBERG, 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**, Washington, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S.; ALLEMAR, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 361-8, 2002.

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

KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. San Diego: Academic, 1997. 932p.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsiosis: current approach to diagnosis on an old and new rickettsial disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.

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**, Santa Barbara, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MACHADO, R. Z. Ehrlichiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 53-57, 2004.

MENESES, I. D. S.; SOUZA, B. M. P. da S.; TEIXEIRA, C. M. M.; GUIMARÃES, J. E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

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. 141-7, 2003.

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

MURPHY, G. E.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffensis*, and *E. ewingii* in dogs from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 325-39, 1998.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.

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**, Santa Maria, v. 38, p. 766-770, 2008.

OLICHESKI, A. T. **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e Giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil.** 2003. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Doenças Parasitárias). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

PAGANI, F.; RODRIGUES, L. M.; PINTO, A. R. S.; GOMES, F. A.; MENDONÇA, R. B.; ALMOSNY, N. R. P. Alterações hematológicas observadas em casos de Ehrlichiose canina: Estudo retrospectivo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 108-108, 2000.

RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; GUEDES Jr., D. S.; SOUZA, I. I. F.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cão. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v.18, n. supl., p. 58-62, 2009.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T. C. B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAINS, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães

atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

WANER, T.; HARRUS, S. Canine Monocytic Ehrlichiosis(CME). In: CARMICHAEL, L.E. (Ed.) **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**, International Veterinary Information Service, Ithaca, 2000. Disponível em:<<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

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

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de técnicas que permitem distinção entre as diferentes erliquioses é essencial para o desenvolvimento de estratégias de vigilância epidemiológica e, conseqüentemente, a prevenção de novos casos.

O sucesso do tratamento depende da precocidade do diagnóstico, desta maneira, a reação em cadeia da polimerase (PCR) se mostrou eficiente para o diagnóstico quando utilizada na rotina de laboratório, em comparação ao exame do esfregaço sanguíneo.

5 REFERÊNCIAS GERAIS

ABATH, F. G.; GOMES, A. L.; MELO, F. L.; BARBOSA, C. S.; WERKHAUSER, R. P. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snails infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1001, n. 1, p. 145-148, 2006.

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 796-802, 2007.

AGUIRRE, E.; SAINZ, A.; DUNNER, S.; AMUSATEGUI, I.; LOPÉZZ, L.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; LUACES, I.; CORTÉS, O.; TESOURO, M. A. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, n. 3-4, p. 365-72, 2004.

AKTAS, M.; ALTAY, K.; DUMANLI, N.; KALKAN, A. Molecular detection and identification of Ehrlichia and Anaplasma species in ixodid ticks. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, n. 5, p. 1243-1248, 2009.

ALBERNAZ, A. P.; MIRANDA, F. J. B.; MELO Jr., O. A.; MACHADO, J. A.; FARJARD, H. V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALMEIDA, A. B. P. F.; PAULA, D. A. J.; DAHROUG, M. A. A.; FREITAS, A. G.; SILVA, J. N.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1123-26, 2012.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L.; SILVA, G. V. O.; RODRIGUES, L. M.; XAVIER, M. S. Avaliação hematológica de cães infectados experimentalmente por

Ehrlichia canis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, n. supl., p. 111-111, 2000.

ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose Canina: revisão clínica. **Clínica Veterinária**. São Paulo, n. 19, p. 31-8, 1999.

ANDERSON, B. E. J.; SUMMER, W.; DAWSON, J. E.; TZIANABOS, T.; GREENE, C. R.; OLSON, J. G.; FISHBEIN, D. B.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; HOLLOWAY, B. P.; GEORGE, E. H. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n.4, p. 775-780, 1992.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3 Butantan, 2006. 223p.

BAVARO, M. F.; KELLY, D. J.; DASCH, G. A.; HALE, B. R.; OLSON, P. History of U.S. Military Contributions to the Study of Rickettsial Diseases. **Military Medicine**, Bethesda, v. 170, n. 4, p. 49-60, 2005.

BELLATO, V.; DAEMON, E. Efeito de três temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 21-27, 1997.

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**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 566-71, 2009.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998.

BREITSCHWERDT, E. B. RIQUETSIOSES. IN: ETTINGER. S. J; FELDMAN. E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 422-429.

BREMER, W. G.; SCHAEFER, J. J.; WAGNER, E. R.; EWING, S. A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D. L.; STICH, R. W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, n. 1-2, p. 95-105, 2005.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: Spring, 2004. 105 p.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Lancet**, London, v. 363, n. 9416, p.1209-19. 2004.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 365p.

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

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAÚJO Jr., J. P.; TRINCA, L.A; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, Paris, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.

CAILLE, V.; BOSSI, P.; GRIMALDI, D.; VIEILLARD-BARO, A. Physiopathology of severe sepsis. **Presse Medicale**, Paris, v. 33, n. 4, p. 256-61. 2004.

CÁRDENAS, A. M.; DOYLE, C. K.; ZHANG, X.; NETHERY, K.; CORSTEVET, R. E.; WALKER, D. H.; McBRIDE, J. W. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 2, p. 123-8, 2007.

CARNEIRO, M. E.; DAEMON, E. Influência da temperatura sobre tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 1-7, 2003.

CARRILLO, B. J.; REZENDE, H. E. B.; MASSARD, C. L. Ehrlichiose canina no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 15., 1976, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Tipografia Baptista de Souza – Editores, 1978. p. 162.

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

CLINTON, S. R.; BINA, J. E.; HATCH, T. P.; WHITT, M. A.; MILLER, M. A. Binding and activation of host plasminogen on the surface of *Francisella tularensis*. **BMC Microbiology**, London, v. 12, p.10-76. 2010.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, Philadelphia, v. 33, n. 4, p. 863-884, 2003.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 824p.

COSTA, J. O., SILVA, M., GUIMARÃES, M. P., BATISTA JUNIOR, J. A. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte-Brasil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

COSTA, J. O.; BOTELHO, J. R. *Classe arachnida*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L., GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 413-421.

COUTO, C. G. Doença riquetsiais. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. p.138-143.

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

DAGNONE, A. S.; DE MORAIS, H. A. S.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n.4, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Phylogenetic analysis of Anaplasmataceae agents DNA detected in dog blood samples with intracellular inclusions from Jaboticabal – SP and Campo Grande – MS. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2., 2006, Ribeirão Preto, Brasil. **Anais...** Ribeirão Preto: CBPV, 2006. p. 378.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites and Vectors**, London, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.

DAVOUST, B. Canine ehrlichiosis, **Le Point Vétérinaire**, Paris, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DELEO, F. R.; CHAMBERS, H. F. J. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 119, n. 9, p. 2464-74. 2009.

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

DOUDIER, B.; OLANO, J.; PAROLA, P.; BROUQUI, P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma spp.* as human pathogens. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 2-4, p. 149-54, 2010.

DUMLER, J. S.; ASANOVICH, K. M.; BAKKEN, J. S.; RICHTER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J. E. Serologic Cross-Reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and Human Granulocytic Ehrlichia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1098-1103, 1995.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BECKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGURWA, 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**, Reading, v.51, p. 2145-2165, 2001.

EWING, S. A. Canine ehrlichiosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, New York, v. 13, p. 331-353, 1969.

FARIA, J. L. M.; DAGNONE, A. S.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C. F.; PEREIRA, W. A. B.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis morulae* and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 98-102, 2010.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Ícone, 2004. 607p.

FOX, G. E.; WISOTZNEY, J. D.; JURTSCHUK Jr., P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 42, n. 1, p.166-170, 1992.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

FRITZ, C. L. Emerging tick-borne diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 39, n. 2, p. 265-278, 2009.

GALVÃO, M. A. M.; LAMOUNIER, J. A.; BONOMO, E.; TROPIA, M. S.; REZENDE, E. G.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MACHADO, M. C.; OTONI, M. E. A.; LEITE, R. C.; CARAM, C.; MAFRA, C. L.; WALKER, D. H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1593-1597, 2002.

GERIA, A. N.; SCHWARTZ, R. A. Cutis Impetigo update: new challenges in the era of methicillin resistance. **Cutis**, New York, v. 85, n. 2, p. 65-70. 2010.

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

GREENE, C. E; HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1984. p. 405-414.

GREENE, C. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis and Wolbachia Infection. In: ____. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Saint. Louis: Saunders, 2006. p. 203-231.

GREGORY, C.; FORRESTER, S. O. *Ehrlichia canis*, *E. Equi* and *E. Risticci* infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1990. p. 404-414.

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

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

HARRUS, S.; KASS, P. H.; WANER, T. Canine Monocytic Ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, London, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.

HARRUS, S., BARK, H., WANER, T.; Canine Monocytic Ehrlichiosis: an update. **Parasitology**, London, v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997.

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

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

HARRUS, S.; ALLEMAR, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 361-8, 2002.

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**, Washington, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **Veterinary Journal**, London, v. 187, n. 3, p. 292-6, 2011.

HERMAN, A.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P.; PULLEN, A. M. Superantigens: mechanisms of T-cell stimulation and role in immune responses. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 9, p. 745-72, 1991.

HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. **Aplicação da PCR em laboratório clínico e medicina forense: apostila de práticas**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1997.

HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**, Santa Barbara, v. 16, n. 3, p. 13-21, 1991.

IMAGAWA, T.; KATAKURA, S.; MORI, M.; AIHARA, Y.; MITSUDA, T.; YOKODA, S. A case of macrophage activation syndrome developed with systemic juvenile rheumatoid arthritis. **Ryumachi**, Tokyo, v. 37, n. 3, p. 487-92. 1997.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. **PCR strategies**. San Diego: Academic Press, 1995. 550 p.

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

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

JACOBS, P. A. H.; FOURIE L. J.; HORAK, I. G. A laboratory comparison of the life cycles of the dog ticks *Haemaphysalis leachi* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 71, n. 1, p. 15-28, 2004.

JOHNSON, E. M.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; FOX, J. C.; CROW, D. W.; KOCAN, K. M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Ehrlichieae*) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 74, n. 2-4, p. 277-288, 1998.

KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. San Diego: Academic, 1997. 932p.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 11, p. 129-63, 1993.

KEEFE, T. J.; HOLLAND, C. J.; SALYER, P. E.; RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 181, n. 3, p. 236-238, 1982.

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

KOCH, H. G.; TUCK, M. D. Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 79, p. 11-14, 1986.

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 a Walker Hound Kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n. 8, p. 2631-2638, 1999.

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M.; BARBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, p. 24-31, 2001.

LABRUNA, M. B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidade). **Revista Brasileira de Veterinária**, Pirassununga, v. 13, p. 123-124, 2004.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsiosis: current approach to diagnosis on fan old and new rickeettsial disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.

LEGATZI, K.; JORGE, P. S. Erliquiose canina: uma doença emergente? **Nosso Clínico**, n. 26, p. 12-20, 2002.

LEWIS, G. E.; RISTIC, M.; SMITH, R. D.; LINCOLN, T.; STEPHENSON, E. H. Brown Dog Tick *Rhipicephalus sanguineus* and the Dog as Experimental Hosts of *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 38, n. 12, p.1953-1955, 1977.

LI, J. S.; WINSLOW, G. M. Survival, replication, and antibody susceptibility of *Ehrlichia chaffeensis* outside of host cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n. 8, p. 4229-4237, 2003.

MACHADO, R. Z. Ehrlichiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 53-57, 2004.

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**, Santa Barbara, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MADRUGA, G. R.; DE ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. DOT-ELISA para detecção de anticorpos contra *Ehrlichia canis*. In:_____. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 297-300.

MATTHEWMAN, L. A.; KELLY, P. J.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. *Journal of South African Veterinary Association*, Pretoria, v. 65, n. 3, p. 104-1-7, 1994.

McBRIDE, J. M.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 8, n. 4, p. 441-7, 1996.

McDADE, J. E. Ehrlichiosis - A disease of animals and humans. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 161, n. 4, p. 609-617, 1990.

MELO, F. L.; GOMES, A. L.; BARBOSA, C. S.; WERHAUSER, R. P.; ABATH, F. G. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene**, London, v. 100, n. 11, p.1049 - 1055, 2006.

MENDONÇA, C. S.; MUNDIM, A. V.; COSTA, A. S.; MORO, T. V. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 167-174. 2005.

MENESES, I. D. S.; SOUZA, B. M. P. da S.; TEIXEIRA, C. M. M.; GUIMARÃES, J. E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

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. 141-7, 2003.

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

MUNHOZ, A. L. F.; BABO, V. J. Estudo retrospectivo das características da Erliquiose Canina. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 106, p. 39-43, 1998.

MURPHY, G. E.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffensis*, and *E. ewingii* in dogs from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 325-39, 1998.

MURPHY, C. J., MARFURT, C. F., McDERMOTT A., BENTLEY, E., ABRAMS, G. A., REID, T. W.; CAMPBELL, S. Spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs: Clinical features, innervation, and effect of topical SP, with or without IGF-12. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Louis, v. 42, n. 10, p.2252-2261, 2001.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.

MYLONAKIS, M. E.; SIARKOU, V. LEONTIDES, L.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; KONTOS, V. I.; KOUTINAS, A. F. Evolution of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.138, n. 3-4, p. 390-393, 2009.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 21-29.

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**, Santa Maria, v. 38, p. 766-770, 2008.

NEER, T. M. Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. (ed): **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998, p. 139-147.

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**, Philadelphia, v. 16, n. 3, p. 309-315, 2002.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 203-216.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1360p.

NEVES, D. P. Classe Arachnida. In: COSTA, J. O.; BOTELHO, J. R. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 413-421.

NYINDO, M. B.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L. A.; SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: In vitro cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 32, n. 11, p. 1651-58, 1971.

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

OLICHESKI, A. T. **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e Giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici,1893) e de riquetsias do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil.** 2003. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Doenças Parasitárias). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C. T.; COSTA, M. T.; MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, n.1, p. 1-5, 2000.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. **Atenção farmacêutica no Brasil: trilhando caminhos:** relatório 2001-2002. Brasília: OPAS, 2002, 46p.

ORIÁ, A. P.; NETO, F. A. D.; MACHADO, R. Z.; SANTANA, A. E.; GUERRA, J. L.; SILVA, V. L. D.; BEDFORD, P. G. C.; LAUS, J. L. Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 94-97, 2008.

PAGANI, F.; RODRIGUES, L. M.; PINTO, A. R. S.; GOMES, F. A.; MENDONÇA, R. B.; ALMOSNY, N. R. P. Alterações hematológicas observadas em casos de Ehrlichiose canina: Estudo retrospectivo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 108-108, 2000.

PAUL, W. E. **Fundamental immunology.** 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1584p.

PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 179-215.

PRAHALAD, S.; BOVE, K. E.; DICKENS, D.; LOVELL, D. J.; GROM, A. A. Etanercept in the treatment of macrophage syndrome. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 28, n. 9, p. 2120-24. 2001.

QUINN, P. J.; TORGERSON, P. R.; MARKEY, B. K.; DONNELLY, W. J.; CARTER, M. E. **Microbial and Parasitic Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1997. p. 229-233.

RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; GUEDES Jr., D. S.; SOUZA, I. I. F.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cão. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v.18, n. supl., p. 58-62, 2009.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, n. 3, p. 286-308, 1991.

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C.; SIREGAR, A. G.; PASARIBU, F. H.; MALOLE, M. B. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 143-148, 1991.

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 9, p. 2107-212, 1994.

RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 9, n. 1, p. 95-101, 2006.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; TACHIBANA, N.; RAPMUND, G. Evidence of a serologic relationship between *Ehrlichia canis* and *Rickettsia sennetsu*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 30, n. 6, p.1324-1328, 1981.

RUNGSIPAT, A.; ODA, M.; KUMPOOSIRI, N.; WANGNAITHAIM, S.; POOSOONTHONTHAM, R.; KOMKAEW, W.; SUKSAWAT, F.; RUOJI, Y. Clinicopathological study of experimentally induced canine monocytic ehrlichiosis. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 18, p.13-22, 2009.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

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. **Veterinary Journal**, London, v.179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SCHOCHETMAN, G.; OU, C. Y.; JONES, W. K. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 158, n. 6, p. 1154-1157, 1988.

SEAMAN, R. L.; KANIA, S. A.; HEGARTY, B. C.; LEGENDRE, A. M.; BREITSCHWERDT, E. B. Comparison of results for serologic testing a polymerase chain reaction assay to determine the prevalence of stray dogs in eastern Tennessee seropositive to *Ehrlichia canis*. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v.65, n. 9, p. 1200-1203, 2004.

SHAW, S.; DAY, M.; BIRTLES, R.; BREITSCHWERDT, E. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 74-80, 2001.

SHERDING, R. G. Doenças Infeciosas. In BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 1998. p. 139-142.

SILVA, L. J.; GALVÃO, M. A. A. Epidemiologia das riquetsioses do gênero *Rickettsia* Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 197-198, 2004.

SILVA, V. L. D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental**. 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SKOTARCZACK, B. Canine ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 10, n. 2, p. 137-141, 2003.

SLOSS, M. W.; ZAJAC, A. M.; KEMP, R. L. **Parasitologia Clínica Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 1-198.

SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M. R.; HUXSOLL, D. L. Development of *Ehrlichia canis*, Causative Agent of Canine Ehrlichiosis, in the Tick *Rhipicephalus sanguineus* and Its Differentiation from a Symbiotic Rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 37, n. 2, p. 119-126, 1976.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T. C. B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

STICH, R. W.; SCHAEFER, J. J.; BREMER, W. G.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPON, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 158, n. 4, p. 256-273, 2008.

SUKASAWAT, J.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p.50-55, 2000.

SVS/MS. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Febre Maculosa Brasileira - Características clínicas e epidemiológicas**. 6. ed. Brasília: Secretária de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. 2005. p. 330-343.

SWANGO, L. J.; BANKENIPER, K. W.; KONG, L. I. Infecções Bacterianas, Riquetsiais, Protozoais e outras. IN: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1992.

SWEATMAN, G. K. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus* females ticks. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 53, n. 2, p. 432-445, 1967.

THOMAS, R. J.; DUMLER, J. S.; CARYLON, J. A. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 7, n. 6, p. 709-22, 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; de MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.

TU, A. H. T.; HAUSLER, C.; YOUNG, R.; STRUCK, D. K. Differential expression of the cytotoxic and hemolytic activities of the ApxIIA toxin from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 5, p. 2119-21. 1994.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, n. 10, p.1047-1058, 2002.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAINS, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães

atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 273p.

VIGNARD-ROSEZ, K.; ALVES, F. R.; BLEICH, I. Erliquiose Canina. **Cães e gatos**, n. 96, p. 25-28, 2001.

VARELA, A. S. Tick-borne *Ehrlichiae* and *Rickettsiae* of dogs. In: BOWMAN, D. D. Companion and exotic animal parasitology. **International Veterinary Information Service**, Ithaca, 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 6 dez. 2011.

WALKER, H.; PADDOCK, D.; DUMLER, J. Emerging and Re-emerging Tick-Transmitted Rickettsial and Ehrlichial Infections. **Emergency Medicine Clinics of North America**, Philadelphia, v. 92, n. 6, p. 1345-1361, 2008.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D. J.; BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-2, p. 177-182, 1995.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 68, n. 3-4, p. 307-317, 1997.

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

WANER, T.; HARRUS, S. Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In: CARMICHAEL, L. E. (Ed.) Recent Advances in Canine Infectious Diseases, International Veterinary Information Service, Ithaca, 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

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

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 45-98, 1991.

XAVIER, M. S.; ALMOSNY, N. R. P.; NASCIMENTO, M. D.; SILVA, G. V. O.; BOTELHO, G. G. Avaliação da coagulação plasmática e plaquetometria em cães não infectados e infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1049-1053, 2009.

YU, X.; McBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Restriction and expansion of Ehrlichia strain diversity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 337-46, 2007.

ZHANG, J. Z.; SINHA, M.; LUXON, B. A.; YU, X. J. Survival strategy of obligate intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: Novel modulation of immune response and host cell cycles. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 1, p. 498-507, 2004.