

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DAS LESÕES VISCERAIS  
DA ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA NA FASE  
CRÔNICA

CAROLINA DIAS DE CAMPOS SANCHES

*BOTUCATU/SP*

*DEZEMBRO/2015*

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DAS LESÕES VISCERAIS  
DA ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA NA FASE  
CRÔNICA

CAROLINA DIAS DE CAMPOS SANCHES

Tese apresentada junto ao Programa  
de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária para obtenção do título de  
Doutor

Orientador: Prof. Adj. Dr. Antonio Carlos Paes  
Co-orientador: Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches

Nome do Autor: Carolina Dias de Campos Sanches

Título: ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DAS LESÕES VISCERAIS DA  
ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA NA FASE CRÔNICA

#### COMPOSIÇÃO EXAMINADORA

Professor Adjunto Doutor Antonio Calos Paes

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Professora Assistente Dra. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Professora Adjunto Doutora Noeme Sousa Rocha

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESp - Botucatu

Professora Pós Doutora Erica Engelberg Teixeira da Silva Hucke

Membro

Laboratório de fisiologia e farmacologia

Curso de Medicina Veterinária

Unifeob - Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos

Professor Doutor Helder Esteves Thomé

Membro

Laboratório de Patologia Animal

Curso de Medicina Veterinária

Unifeob - Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos

Data da Defesa: 01 de dezembro de 2015

### **Dedicatória**

*Dedico única e exclusivamente aos meus pais Claudio de Campos Sanches e Letizia Dias de Campos Sanches, que sempre me apoiaram, influenciaram e me inspiraram a dar continuidade aos meus sonhos e vocações.*

*Por eles eu fui, para eles eu sou e sempre serei!!!!*

### ***Agradecimentos***

- Ao meu orientador Professor Paes por me contemplar com essa linda obra, um sonho de projeto já antigo guardado em seus desejos de pesquisas.
- Aos queridos e amigos residentes do Ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos, que sempre muito dispostos me ajudaram a dar vida a esse estudo.
- Ao CNPq que financiou a bolsa e a reserva técnica possibilitando a realização do projeto e minha permanência na pós- graduação.
- À pós graduanda Erica Kikuchi que colaborou com as coletas de material e processamentos histopatológico e histoquímico das amostras.
- Ao Co - orientador Médico Veterinário e Doutor Osimar de Carvalho Sanches que cedeu seu laboratório de Consultoria e Diagnóstico Anatomopatológico Veterinário (CDAPVET) para confecção das lâminas histológicas
- À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, assim como ao Conselho de Pós- Graduação.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Encéfalo: Hemorragia focal em região de ponte e bulbo e evidencialização de vasos sanguíneos .....	37
Figura 2: Encéfalo: Evidencialização de vasos sanguíneos.....	37
Figura 3: Encéfalo: Córtex cerebral - edema acentuado – HE - 40x.....	38
Figura 4: Encéfalo: trombose e manguito perivascular plasmocitário – HE – 40x .....	38
Figura 5: Encéfalo: plexo coroide – coroidite plasmocitária – HE – 40x.....	39
Figura 6: Tórax: Petéquias e sufusões em costelas, átrio, pericárdio e pulmão e dilatação de veia cava.....	39
Figura 7: Pulmão: Edema, enfisema, pequenos focos hemorrágicos em lobo pulmonar. Coração: Petéquias e equimoses.....	40
Figura 8: Pulmão: Edema, enfisema, pequenos focos hemorrágicos em lobo pulmonar. Coração: presença de foco hemorrágico em região atrial...	40
Figura 9: Coração: Trombo- HE – 40x.....	41
Figura 10: Pulmão: Edema e infiltrado plasmocitário – Verde metil Pironina – 20x.....	41
Figura 11: Pulmão: Manguito perivascular plasmocitário – HE – 20x.....	42
Figura12: Fígado: Hepatomegalia, congestão, petéquias e degeneração.....	42
Figura13: Fígado: Hepatomegalia, congestão, petéquias e degeneração.....	43
Figura 14: Fígado: Espaço porta – acúmulo de plasmócitos – Verde metil Pironina – 40x.....	43
Figura15: Fígado: Congestão passiva – manguito perivascular plasmocitário – HE- 10x.....	44
Figura 16 : Fígado: Espaço porta – ausência de fibrose – TM. 10x.....	44
Figura 17: Rim: Degeneração, petéquias, sufusões e aderência capsular.....	45
Figura 18. Rim: Infiltração periglomerular de plasmócitos. Verde Metil Pironina, 40x.....	46
Figura 19: Rim: Glomerulonefrite mesangial. Há proliferação de células mesangiais (seta). HE- 20x.....	46
Figura 20: Baço: Esplenomegalia.....	46
Figura 21: Baço: Acúmulo de plasmócitos no parênquima esplênico ao redor dos folículos e trabéculas. Verde metil Pironina, 20x.....	47

FIGURA 22: Linfonodo: Acúmulo de plasmócitos – Verde metil Pironina. 20x.....	47
FIGURA 23: Linfonodo: Hiperplasia de folículo linfoide – HE – 10x.....	48

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1: Análise estatística comparada do encéfalo demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica.....49
- Quadro 2: Análise estatística comparada do coração demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica.....50
- Quadro 3: Análise estatística comparada do pulmão demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica..... 50
- Quadro 4: Análise estatística comparada do fígado demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica.....51
- Quadro 5: Análise estatística comparada do rim demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica.....51
- Quadro 6: Análise estatística comparada do baço demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica.....52
- Quadro 7: Análise estatística comparada do linfonodo mesentérico demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica.....52

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	12
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b> .....	13
	2.1 Agente etiológico e epidemiologia.....	13
	2.2 Patogenia.....	15
	2.3 Imunopatogenia.....	16
	2.4 Aspectos clínicos.....	17
	2.5 Aspectos laboratoriais.....	18
	2.5.1 Hematológicos.....	18
	2.5.2 Macroscopia.....	19
	2.5.3 Microscopia.....	19
	2.6 Diagnóstico.....	20
<b>3</b>	<b>Objetivos</b> .....	21
	3.1 Objetivos gerais.....	22
	3.2 Objetivos específicos.....	22
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	23
	4.1 Critérios.....	23
	4.2 Animais.....	22
	4.3 Coleita de material.....	23
	4.4 Técnica De Biologia Molecular.....	23
	4.4.1 Extração DNA.....	24
	4.4.2 Reação de PCR.....	25
	5.3 Processamento Histopatológico.....	25
<b>5</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	27
<b>6</b>	<b>Resultado</b> .....	28
	6.1 Encéfalo.....	28
	6.2 Coração.....	31
	6.3 Pulmão.....	32
	6.4 Fígado.....	34
	6.5 Rim.....	37
	6.6 Baço.....	39
	6.7 Linfonodo mesentérico.....	40
<b>7</b>	<b>Discussão</b> .....	42
<b>8</b>	<b>Conclusão</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

SANCHES, C.D.C. **Estudo histopatológico das lesões viscerais da Erliquiose Monocítica Canina na fase crônica.** Botucatu, 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) é uma enfermidade infecciosa, potencialmente fatal, causada por *Ehrlichia canis*, transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. O curso da enfermidade é dividido em três fases: aguda, subclínica e crônica. O objetivo deste estudo foi avaliar as lesões anatomopatológicas que ocorreram no parênquima e no endotélio vascular do encéfalo, coração, pulmão, fígado, rim, baço e linfonodo mesentérico de 16 cães que vieram a óbito acometidos pela EMC na fase crônica. Esses animais apresentaram sinais clínicos neurológicos, porém na avaliação microscópica não exibiam lesões que justificassem esses sintomas. No coração foi possível notar a presença de alterações vasculares visíveis, como Coagulação Intravascular Disseminada, necrose dos miócitos próximos a esses vasos, congestão e hemorragias devido à severa trombocitopenia desenvolvida durante a infecção. No pulmão notou-se pneumonia em grande parte dos animais estudados. O fígado também se apresentou acometido, mas não diretamente pela infecção, mas sim por consequência de outros fatores prejudiciais relacionados à doença. Em todos os rins avaliados a glomerulonefrite se mostrou presente. Em todos os 16 animais pode-se notar a esplenomegalia. O linfonodo mesentérico não é uma estrutura muito estudada em animais com EMC, mas pode-se notar um grande infiltrado plasmocitário. No entanto, concluiu-se que a vasculite foi responsável por grande parte das lesões, sendo predominante o infiltrado plasmocitário.

**Palavras chave:** Cão, *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, Erliquiose Monocítica Crônica, Trombocitopenia

SANCHES, C.D.C. **Histopathological study of visceral lesions Canine Ehrlichiosis Monocytic in the chronic phase.** Botucatu, 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is an infectious disease, potentially fatal, caused by *Ehrlichia canis*, transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*. The course of the disease is divided into three stages: acute, chronic and subclinical. The aim of this study was to evaluate the pathological lesions that occurred in the parenchyma and the vascular endothelium of the brain, heart, lung, liver, kidney, spleen and mesenteric lymph node of 16 dogs that died affected by CME in the chronic phase. These animals showed neurological signs, but in microscopic evaluation showed no injury to justify these symptoms. In the heart it was possible to notice the presence of visible vascular abnormalities, such as disseminated intravascular coagulation, necrosis of the myocytes near these vessels, congestion and bleeding due to severe thrombocytopenia developed during infection. In the lung was noted pneumonia in most animals studied. The liver also appeared affected, but not directly by infection, but as a result of other harmful factors related to the disease. In all evaluated kidneys showed this glomerulonephritis. In all 16 animals can be noted splenomegaly. The mesenteric lymph node is not a very studied structure in animal CME, but you may notice a large plasma cell infiltrate. However, the vasculitis was responsible for much of the lesions, predominant being the plasma cell infiltrate.

**Key-words:** Dog, *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, Canine Chronic Monocytic, Thrombocytopenia

## 1. Introdução

A Erlichiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença infecciosa de grande importância no Brasil, sendo que a incidência registrada pelo Serviço de Moléstias Infecciosas dos Animais Domésticos da Unesp – FMVZ- na cidade de Botucatu-SP, chegam a mil casos anuais, já que a região é considerada endêmica para o *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato marrom do cão que serve como vetor para *Ehrlichia canis*, agente etiológico primário da EMC.

Essa enfermidade teve como foco de estudo nos últimos anos a sua epidemiologia, aspectos clínicos, patogenia, terapêutica e diagnóstico molecular, no entanto a imunopatogenia assim como seus aspectos patológicos macro e microscópicos ainda são escassos.

Desde a detecção da doença há quase 70 anos, a EMC tem se mostrado uma das mais importantes enfermidades infecciosas dos cães domésticos ao redor do mundo, causando uma expressiva morbidade e letalidade em regiões endêmicas à infestação pelo carrapato *R. sanguineus*.

A evolução da erliquiose é dividida em três fases: aguda, subclínica e crônica. Quando o diagnóstico é feito na fase aguda os cães se recuperam da enfermidade com o tratamento adequado. Já os animais com o tratamento inadequado ou ausente podem evoluir para a fase subclínica da doença, com consequente evolução para a fase crônica, caracterizada por alterações clínicas e laboratoriais mais severas.

Considerando a região endêmica e a consequente casuística elevada de casos crônicos, o objetivo deste estudo foi descrever as lesões viscerais provocadas durante a infecção por *E. canis* e avaliar histologicamente os órgãos desses cães.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Agente etiológico e epidemiologia

A Ehrlichia é uma enfermidade infecciosa, caracterizada por uma bactéria cocóide, intracelular obrigatória, gram-negativa, pleomórfica, pequena medindo cerca de 0,5 – 0,9  $\mu\text{m}$  (HARRUS; WANER, 2011). O microrganismo se localiza principalmente nas células do sistema retículo endotelial do fígado, baço e linfonodos, sendo as células mononucleares o ponto inicial de sua multiplicação (MUNHÓZ; BABO, 1998).

A EMC causada pela *E. canis* foi descrita primeiramente em 1935 por Donatien e Lestoquard onde, ao analisar esfregaços sanguíneos de cães febris e anêmicos infestados por *R. sanguineus*, observaram a presença de pequenos organismos semelhantes à *rickettsias* no interior de monócitos, denominando-os de *Rickettsia canis* (MUNHÓZ; BABO, 1998).

Em 1945, a espécie foi renomeada por Moshkovsky para *E. canis* em homenagem a Paul Ehrlich, um famoso bacteriologista alemão (McDADE, 1990).

Durante a guerra do Vietnã ocorreu um surto de erliquiose em cães do Exército Americano vitimando cerca de 300 cães que desenvolveram a enfermidade hemorrágica fatal então denominada Pancitopenia Tropical Canina (HUXSOLL et al., 1970), fato que tornou a enfermidade reconhecida mundialmente como uma doença infecciosa importante de cães e outros membros da família *Canidae* (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978), incluindo lobos e chacais (RIKIHISA, 2000).

No Brasil, a EMC foi descrita pela primeira vez em 1973, em Belo Horizonte, Minas Gerais (COSTA et al., 1973), sendo este também o primeiro caso diagnosticado na América do Sul. Nos dias atuais já foram e ainda são descritos casos em todo o território nacional.

A EMC também pode ser denominada Pancitopenia Tropical Canina (HUXSOLL et al., 1970; SMITH et al., 1976), Riquetsiose Canina, Tifo Canino, Febre Hemorrágica Canina, Afecção Hemorrágica de Nairóbi (WANER; HARRUS, 2000), Síndrome Hemorrágica Idiopática, Moléstia do Cão Rastreador (GREENE; APPEL, 2012).

Em geral as espécies de Ehrlichia podem ser diferenciadas pelo tipo de célula que infectam. A *E. canis* e *E. chaffensis* infectam monócitos, provocando a erliquiose monocítica, enquanto que a *E. ewingii* invade neutrófilos causando a erliquiose granulocítica (VARELA, 2003).

A erliquiose é descrita mundialmente, mas nota-se maior concentração dos casos em áreas tropicais e subtropicais devido à distribuição geográfica do principal vetor da doença, o *R. sanguineus* também conhecido como carrapato vermelho ou carrapato marrom do cão (HARRUS et al., 1997; COHN, 2003).

Uma vez no carrapato ocorre a transmissão trans-estadial, porém não existe a transmissão trans-ovariana no vetor (LEWIS JR, et al., 1977), podendo a doença ser transmitida pelos três estágios: larva, ninfa e adulto (GROVES et al., 1975; DAGNONE et al., 2001; BREMER et al., 2005). As larvas e ninfas se infectam a partir da ingestão de leucócitos de cães infectados na fase aguda da doença (SMITH et al., 1976; LEWIS et al., 1977).

Uma vez no vetor, as bactérias se disseminam nos hemócitos, alcançam o intestino e daí a glândula salivar e durante a alimentação os carrapatos inoculam a secreção salivar contaminada no hospedeiro (SMITH et al., 1976).

O carrapato infectado pode transmitir *E. canis* por até cinco meses após adquirir a infecção (RIKIHISA, 1991; DAGNONE et al., 2001). No entanto, a enfermidade pode também ser transmitida via transfusão sanguínea (NEER et al., 2012), até mesmo concomitantemente à infecção por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii*, ou ainda, associada a outras espécies de Ehrlichia (BREITSCHWERDT, 2004).

Após inoculação o período de incubação é de oito a 20 dias (GREENE; APPEL, 2012), e uma vez no hospedeiro as bactérias se multiplicam nos fagossomos das células mononucleares fagocíticas, propagando-se para o baço, fígado e órgãos linfóides (MCDADE, 1990), evoluindo de corpúsculos elementares para corpúsculos iniciais até a formação de mórulas (NYINDO et al., 1971).

As células infectadas são transportadas especialmente ao pulmão, rins e meninges, aderindo ao endotélio vascular e induzindo o aparecimento de vasculite e infecção do tecido subendotelial (SIMPSON, 1974).

## 2.2. Patogenia

O ciclo se inicia com a inoculação do agente pelo carrapato durante o repasto sanguíneo. A bactéria penetra nas células mononucleares sob a forma de corpúsculos elementares (SANTARÉM, 2003) que são as formas individuais do parasito. Uma vez na circulação, alcançam os monócitos e se multiplicam nos fagossomos da célula hospedeira.

As inclusões intracelulares formadas pelas Ehrlichias no hospedeiro são denominadas mórulas e podem ser encontradas nos leucócitos na fase aguda da infecção, em pequeno número e por curto período de tempo. Cada mórula contém vários corpos elementares, os quais são liberados com o rompimento da célula e irão infectar outras células iniciando um novo ciclo (McDADE, 1990).

Um mecanismo de adaptação que possibilita a permanência das erlíquias dentro dos vacúolos e a sua comunicação com a célula hospedeira por meio de retículo endoplasmático foi identificado em um grupo de genes de anquirina que codificam proteínas que talvez possam mediar interações específicas entre proteínas. No entanto, devido a essas proteínas de anquirina não ocorre a fusão fagolisossomal no interior das células infectadas, permitindo que os corpúsculos elementares se desenvolvam e se dividam por divisão binária dentro dos limites do fagossomo nas células hospedeiras infectadas (GREENE; APPEL, 2012).

Uma vez a bactéria no interior das células mononucleares teciduais de baço, fígado e linfonodos, são carregadas pela corrente sanguínea para os pulmões, rins e meninges, onde aderem ao endotélio vascular e causam vasculite e infecção do tecido subendotelial (FONSECA et al., 2013).

Após a fase aguda os animais imunocompetentes podem eliminar o agente sem desenvolver a fase crônica, ou estabelecer a fase subclínica, onde os sinais clínicos não são evidentes, mas o agente permanece infectando o organismo do hospedeiro, principalmente baço, persistindo por meses e anos (FONSECA et al., 2013).

Nos cães onde existe a resposta imunológica insuficiente a doença irá se desenvolver para a fase crônica, ocorrendo o comprometimento da medula

óssea com uma predominante pancitopenia no exame hematológico (MYLONAKIS et al., 2004).

O prognóstico na fase aguda é favorável, já que com a terapêutica adequada é possível observar melhora clínica já no início do tratamento. Na fase subclínica, o prognóstico varia de favorável a reservado conforme a sintomatologia do animal e sua condição imunológica e evolução para a fase crônica. Neste caso, o prognóstico é desfavorável, principalmente quando evolui para hipoplasia arregenerativa na medula óssea (HARRUS et al., 1997; GREENE; APPEL, 2012).

No entanto, quanto mais precoce o início do tratamento de cães com a infecção aguda for iniciado, maior a probabilidade de um prognóstico favorável. Já cães na fase crônica da enfermidade dificilmente respondem adequadamente ao tratamento devido às alterações causadas pela doença multissistêmica e à mielossupressão grave (GREENE; APPEL, 2012).

### 2.3. Imunopatogenia

Quando a *E. canis* interage com as células hospedeiras, sinais são ativados desarmando o sistema de alarme e os mecanismos microbicidas dos leucócitos, dando condição da célula hospedeira aceitar a bactéria para compartilhar seu interior e sua fonte de nutrientes. Concomitantemente, no interior da bactéria sinais são ativados permitindo a regulação do seu metabolismo e fisiologia no novo ambiente celular. Somente então sua permanência temporária não causará transtorno à fisiologia da célula invadida, até que tenham se multiplicado o suficiente (RIKIHISA, 2003).

Mavromatis et al. (2006) descreveram três glicoproteínas de membrana imunorreativas principais (gp 36, gp 140 e gp 200) que estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro, adesão das ehrliquias com a célula hospedeira e apresentam importante papel na sua patogênese.

Estudos com infecção experimental de *E. canis* em cães têm permitido avaliar as alterações imunológicas da doença. Há intensa infiltração de plasmócitos em órgãos parenquimatosos, sendo que os animais comumente apresentam teste de Coombs e autoaglutinação positivos (HARRUS et al., 1999; CASTRO et al., 2004).

A ativação de células T é necessária para a interação entre resposta imune humoral e celular, e uma efetiva destruição intracelular do parasita. Além disso, tem sido proposto que a imunidade celular desempenha um papel importante na patogênese da erliquiose canina, determinada por um aumento das células T citotóxicas durante a infecção, o que resulta em aumento da citotoxicidade mediada por células (CASTRO et al., 2004).

A trombocitopenia é considerada a alteração hematológica característica de cães infectados por *E. canis*. Esta anormalidade envolve vários processos já citados anteriormente como aumento do consumo plaquetário, sequestro esplênico, destruição imunomediada, decréscimo na produção de plaquetas devido hipoplasia medular na fase crônica e/ou diminuição da vida média dessas células (BULLA et al., 2004).

No entanto, a queda do número de plaquetas também pode ser secundária a produção nos linfócitos de citocinas como o fator de inibição-migração plaquetária, que parece intensificar o sequestro e estase de plaquetas, levando à sua redução no sangue periférico (HARRUS et al., 1999a; BULLA et al., 2004).

A destruição imunomediada foi demonstrada pela presença de anticorpos anti-plaquetas (APA) no soro de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. Além disso, existem evidências de que a interação dos anticorpos APA com as glicoproteínas de membrana das plaquetas é a causa das disfunções plaquetárias, em particular a inibição da agregação plaquetária, durante a fase aguda da doença (HARRUS et al., 1999a).

#### 2.4. Aspectos clínicos

O desenvolvimento da enfermidade se dá em três fases: aguda, subclínica e crônica. O período de incubação varia de oito a vinte dias pós infecção que tem duração de duas a quatro semanas (NELSON; COUTO, 2001).

Durante a fase aguda, os sinais clínicos são inespecíficos e incluem febre, secreção ocular e nasal, anorexia, apatia, perda de peso, dispneia, linfadenopatia, diáteses hemorrágicas em mucosas e subcutâneo, sinais

neurrológicos, musculares, oculares e poliartrite (RIKIHISA et al., 1991; DAGNONE et al., 2001; GREENE; APPEL, 2012), além de edema de membros, poliúria e/ou polidipsia (OLIVEIRA et al., 2000).

Na fase subclínica o animal se apresenta sem sinais clínicos aparentes.

Na fase crônica ocorrem sinais clínicos variando de apatia, letargia, perda de peso, mucosas pálidas, febre, edema periférico, hemorragias, pneumonia intersticial, poliartrite, insuficiência renal (WANER; HARRUS, 2000), linfadenopatia, esplenomegalia (UENO et al., 2009), uveíte anterior, meningite associada à ataxia cerebelar, paresia, hiperestesia (GREENE 2012). A trombocitopenia severa pode causar epistaxe, petéquias ou equimoses, melena, hematúria, hifema e hemorragia de retina (NEER; HARRUS, 2006).

## 2.5. Aspectos laboratoriais

### 2.5.1. Hematológicos

Na fase aguda o consumo, sequestro e destruição das plaquetas causam a trombocitopenia, com aparente petéquias, sufusões e equimoses que estarão presentes nesta fase (ALMOSNY, 2002).

A contagem de leucócitos é variável, podendo diminuir devido ao sequestro destas células por mecanismos imunológicos (MOREIRA et al., 2003), e anemia branda progressiva também pode se fazer presente devido à supressão da produção de eritrócitos e à destruição acelerada das hemácias (ALMOSNY, 2002; ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Na fase subclínica pode estar presente uma trombocitopenia branda, mesmo na ausência de sintomas (HARRUS et al., 1997). A trombocitopenia é um ótimo indicador de infecção, já que ocorre frequentemente em qualquer fase da enfermidade (BULLA et al., 2004), sendo decorrente de vários mecanismos imunomediados já citados acima (MOREIRA et al., 2003).

Na fase crônica as alterações hematológicas mais encontradas são anemia não regenerativa, trombocitopenia e leucopenia decorrentes do comprometimento da medula óssea, que pode ser causado por mecanismos imunomediados, infecção no interior da medula óssea ou exaustão devido à

destruição contínua de plaquetas (DAGNONE et al., 2001a; MACHADO, 2004; GREENE; APPEL, 2012).

As alterações bioquímicas mais encontradas são hiperproteinemia, hipergamaglobulinemia e posterior hipoalbuminemia (CASTRO et al., 2004; WATANABE et al., 2005), elevações das atividades de aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e alaninoaminotransferase (ALT) e baixa elevação dos níveis séricos de bilirrubina com leve icterícia (ALMOSNY, 2002), além de azotemia (TROY; FORRESTER, 2006).

### 2.5.2. Macroscopia

Durante um exame necroscópico de um cão com *E. canis* é possível encontrar petéquias e equimoses em superfície serosa e mucosa da maioria dos órgãos, incluindo cavidade nasal, pulmões, rins, bexiga, trato gastrintestinal e tecido subcutâneo (GREENE; APPEL, 2012).

Alterações como linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia e hepatomegalia podem ser encontradas durante a fase aguda da enfermidade. A linfadenomegalia pode ser generalizada e os linfonodos podem se encontrar na cor acastanhada. Emaciação com perda da condição física ocular podem ser encontradas na fase crônica (GREENE; APPEL, 2012).

### 2.5.3. Microscópia

Em um estudo com 27 cães experimentalmente infectados com *E. canis* observaram meningite com infiltrado predominantemente monocítico em todos os cães (PANCIERA et al., 2001).

Um dos achados histopatológicos característicos consiste em infiltrado plasmocitário perivascular em vários órgãos, incluindo pulmões, cérebro, meninges, rins, linfonodos, medula óssea, baço e em alguns casos, pele ou mucosa. No entanto, o grau de infiltrado de células linfoides e plasmócitos parece aumentar nos cães cronicamente acometidos. Raramente são observadas mórulas em células fagocitárias mononucleares de tecidos corados pela hematoxilina e eosina (HARRUS et al., 1998).

## 2.6. Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da EMC é comumente baseado no conjunto de alterações clínicas e hematológicas. Para o diagnóstico definitivo, vários métodos de detecção do agente ou de anticorpos específicos estão atualmente disponíveis.

O diagnóstico citológico com a presença de mórulas intracitoplasmáticas em esfregaço sanguíneo confirma a presença de *E. canis*, mas a ausência da mórula não indica a ausência de infecção, já que a *E. canis* se encontra circulante em pequeno número na corrente sanguínea durante a infecção e a proporção de célula infectada pode ser menor do que 1% (DAGNONE et al., 2001a; LAPPIN, 2001).

O teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é capaz de detectar anticorpos anti- *E. canis* no sétimo dia pós-infecção. No entanto, a principal desvantagem dos métodos sorológicos além da possibilidade de ocorrer reação cruzada com outras espécies de *Ehrlichia* (SUKSAWAT et al., 2000a), é a incapacidade de distinguir uma infecção atual de uma exposição prévia, já que os títulos de anticorpos diminuem lenta e gradualmente em animais tratados, tornando-se negativos apenas após 15 a 30 meses, mesmo com a eliminação do agente.

Em contrapartida, em áreas endêmicas, cães podem mostrar alto título de IgG para *E. canis*, mesmo sem apresentar a doença clinicamente, provocando resultado falso-negativo (PERILLE; MATUS, 1991; BULLA et al., 2004).

Outro teste sorológico como ELISA é tão sensível e específico quanto a RIFI e dispensa equipamentos caros, no entanto, apesar de fácil leitura, seus resultados indicam apenas positivos e negativos (LEBARTHE et al., 2003). Ultimamente esse teste tem sido utilizado como adjuvante no diagnóstico ambulatorial, por ser rápido, de baixo custo e confiável.

Devido à alta prevalência da enfermidade fez-se necessário buscar o método diagnóstico sensível, específico, menos complicado e que detectasse diretamente a bactéria. Dessas necessidades surgiram as primeiras reações em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de *E. canis*, isolando o genoma

e amplificando a porção do DNA do patógeno permitindo seu reconhecimento específico (IQBAL et al., 1994; IQBAL; RIKIHISA, 1994 a).

A PCR é um método de amplificação de DNA *in vitro*. Essa técnica tem sensibilidade e especificidade consideravelmente superior às técnicas parasitológicas, e pode ser empregada no diagnóstico da erliquiose a partir das amostras de necropsia e material de biópsia.

Esta técnica permite a identificação da espécie de *Ehrlichia* envolvida na infecção, o que nem sempre é possível em outro procedimento diagnóstico, contudo, apresenta custo mais elevado e requer técnicos especializados (FENOLLAR, RAOULT, 2004).

A escolha da amostra para exame na PCR é geralmente determinada pela fase da infecção no animal, e preferencialmente, deve ser utilizado o tecido esplênico, embora nos animais com infecção crônica deva ser obtido sangue da medula óssea (MYLONAKIS et al., 2004). Isso se deve ao fato do baço ser o local de origem da multiplicação da Ehrlichia, na fase subclínica (HARRUS et al., 1998b; HARRUS et al., 2004).

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivos gerais

- Realizar exame necroscópico em cães naturalmente infectados pela EMC, avaliar as alterações macroscópicas de encéfalo, coração, pulmão, fígado, baço, rins e linfonodo mesentérico.
- Avaliar por histopatologia e histoquímica as lesões microscópicas nos órgãos citados acima.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Através das lamínas histológicas coradas pela hematoxilina-eosina detectar as lesões principais nos órgãos coletados
- Utilizar corantes especiais como Tricrômio de Masson para visualização de fibrose e Verde Metil Pironina para visualização de plasmócitos

#### 3.3 Hipótese

## 4 Materiais e Métodos

Este estudo só foi dado prosseguimento quando obteve a aprovação da Comissão De Ética No Uso De Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp – FMVZ - Botucatu gerando um protocolo n° 78/2015.

### 4.1. Critérios

- Cães com histórico de infestação por carrapatos
- Idade, sexo e raça aleatórios
- Exames hematológicos com grave anemia, trombocitopenia e leucopenia
- Animais que sofreram óbito devido ao desenvolvimento da doença
- Cães com PCR positivo de baço para *E. canis*

### 4.2. Animais

Foram utilizados 16 cães, naturalmente infectados, com idade, raça e sexo aleatórios, com evolução da fase crônica da enfermidade, que já passaram pelo tratamento preconizado para a doença.

Todos os animais foram atendidos no serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Hospital Veterinário, FMVZ, UNESP – Campus Botucatu e os casos de óbito foram utilizados neste procedimento de pesquisa.

### 4.3. Colheita de material

Após o óbito, um exame necroscópico foi realizado e os órgãos foram avaliados macroscopicamente e posteriormente colhidas amostras de encéfalo, pulmão, coração, fígado, baço, rim e linfonodos mesentéricos que foram colocados em frasco devidamente fechado contendo Formalina 10% tamponada para análise histopatológica e histoquímica nas colorações de Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômio de Masson (TM) e Verde Metil Pironina (VMP).

Uma pequena amostra esplênica de cada animal foi devidamente congelada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e encaminhado para o Laboratório de Diagnóstico Molecular no Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu do Departamento de Microbiologia e Imunologia para diagnóstico e realização da PCR.

#### 4.4. Técnica de Biologia Molecular

##### 4.4.1. Extração de DNA

Foi utilizado o *Invisorb Spin Tissue Mini Kit*®

- Esmagar as amostra de tecido em pequenos fragmentos ou moer com nitrogênio líquido (5 a 40mg de tecido).
- Diluir com pequena quantidade de H<sub>2</sub>O se necessário.
- Transferir para um tubo de 1,5 mL.
- Ajustar o termobloco a  $52^{\circ}\text{C}$ .
- Identificar a quantidade necessária de tubos.
- Pipetar para o tubo 400 $\mu\text{L}$  de Lysis Buffer e 40  $\mu\text{L}$  de ProteinaseK.
- Passar pelo vortex por 5 a 10 segundos.
- Incubar no termobloco com agitação até lise completa (aprox.. 20 min) à  $52^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifugar por 2 minutos à 11.000 rpm.
- Transferir sobrenadante para novo tubo de 1,5 mL e acrescentar 200  $\mu\text{L}$  de Binding Buffer T à amostra e passar pelo vortex.
- Transferir solução lisada para Spin Filter em tubo de 2,0 mL.
- Incubar por 1 min à temperatura ambiente e centrifugar por 2 min a 11.000 rpm.
- Neste meio tempo, aquecer o volume necessário de Elution Buffer (50  $\mu\text{L}$ /amostra + 50  $\mu\text{L}$  para erros de pipetagem).
- Descartar o filtrado e pipetar sobre o filtro 550  $\mu\text{L}$  de Wash Buffer e centrifugar por 1 minuto a 11.000 rpm.
- Descartar filtrado e repetir a lavagem anterior.

- Centrifugar por 1min a 11.000 rpm.
- Descartar filtrado e centrifugar por mais 4 minutos em velocidade máxima.
- Transferir filtro para o tubo de 1,5 mL do kit e adicionar 50µL de Elution Buffer D (à 52°C).
- Incubar em temperatura ambiente por 3 minutos.
- Centrifugar por 1 minuto a 11.000 rpm.
- Descartar filtro.

#### 4.4.2. Reação de PCR

- A reação ocorreu numa reação final de 25 µL contendo, 2,5 µL de amostra, 15,87 µL de água MilliQ estéril, 0,5 µL de dNTP 10mM, 2,5 µL de *Buffer* 10X, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µL de primer DSB330 10 mM, 1 µM de primer DSB729 10 µM, 0,13 µL de Taq *Platinum* 5U/ µL.
- Descongelar os reagentes (exceto a *Taq Platinum*) e passar rapidamente pelo vortex spin.
- Não vortexar os *primers*.
- Identificar os microtubos de 2002,5 µL de amostra.
- Aliquotar 22,5 µL de amostra em cada microtubo previamente identificado e manter em gelo.
- Levar para a sala de aplicação e adicionar 2,5 µL de amostra da amostra.
- Levar ao termociclador, programa EHRLICHI (95°C por 2 minutos; 50 ciclos de: 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos.

#### 4.5. Processamento Histopatológico

Os órgãos de todos os animais foram colhidos e fixados em solução de formalina a 10% tamponada, por 72 horas. Após a fixação foram lavados por 1 hora e em seguida armazenados em solução de álcool a 70% até o processamento.

Os fragmentos processados de acordo com a técnica de rotina histopatológica para inclusão em parafina. Cortes com 4 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, depositados em lâminas e em seguida permaneceram em estufa a 60°C por 12 horas para fixação dos cortes à lâmina.

Após este procedimento, as lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação; e em seguida foram coradas pelos métodos Hematoxilina - Eosina, Tricrômio de Masson e Verde Metil Pironina.

O processamento deste material e a confecção das lâminas histopatológicas foram realizados no Laboratório de Consultoria e Diagnóstico Anatomopatológico Veterinário – CDAPVET- Presidente Prudente – SP.

## **5 Análise Estatística**

A distribuição dos *escores* de lesões anatomopatológicas de cada variável estudada foi calculada com o procedimento estatístico PROC FREQ (SAS versão 9.3)

## 6 Resultados

A avaliação microscópica foi caracterizada em escore 0 (ausência de lesão); escore 1 (grau leve); escore 2 (grau moderado) e escore 3 (grau severo de lesão).

### 6.1. Encéfalo

Cada um dos 16 encéfalos foram avaliados macroscopicamente e microscopicamente. Do total, 93,75% não apresentaram alterações macroscópicas, no entanto, em 6,25% foi possível observar hemorragia focal de bulbo e ponte e evidencialização de vasos sanguíneos como mostra as figuras 1 e 2. Essa alteração pode ser explicada pela vasculite presente na infecção pela *E. canis*.



FIGURA 1: Encéfalo de cão. Hemorragia focal em região de ponte e bulbo (seta) e evidencialização de vasos sanguíneos (cabeça da seta).



FIGURA 2: Encéfalo de cão. Evidencialização de vasos sanguíneos (seta).

Microscopicamente as áreas avaliadas foram córtex cerebral, cerebelo, tálamo, tronco encefálico e hipocampo, e as alterações selecionadas foram desmielinização, presença de manguito perivascular, edema e necrose neural. Foram também avaliadas a presença de alterações vasculares como congestão, hemorragia e trombose; meningite; meningoencefalite e meningoencefalomielite. Esses resultados se encontram descritos no quadro 1.

QUADRO 1: Análise estatística comparada do encéfalo demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica.

Score	0	1	2	3	Total Animais
	Animais/ %	Animais/ %	Animais/ %	Animais/ %	
<b>Desmielinização</b>					
Córtex cerebral	4/26,67	11/73,33	0	0	15
Cerebelo	2/13,33	10/66,67	2/13,33	1/6,67	15
Tálamo	5/33,33	9/60	1/6,67	0	15
Tronco encefálico	4/26,67	9/60	1/6,67	1/6,67	15
Hipocampo	6/40	8/53,33	1/6,67	0	15
<b>Manguito Peri Vascular</b>					
Córtex cerebral	5/33,33	9/60	1,667	0	15
Cerebelo	3/20	10/66,67	2/13,33	0	15
Tálamo	8/63,33	6/40	1/6,67	0	15
Tronco encefálico	6/40	8/53,33	1/6,67	0	15
Hipocampo	8/53,33	6/40	1/6,67	0	15
Meningeano	5/35,71	8/57,14	1/7,14	0	15
<b>Edema</b>					
Córtex cerebral	0	0	0	15/100	15
Cerebelo	0	0	2/13,33	13/86,67	15
Tálamo	0	0	1/6,67	14/93,33	15
Tronco encefálico	0	0	1/6,67	14/93,33	15
Hipocampo	0	0	1/6,67	14/93,33	15
<b>Necrose Neural</b>					
Córtex cerebral	2/13,33	11/73,33	2/13,33	0	15
Cerebelo	6/40	7/46,67	2/13,33	0	15
Tálamo	6/40	8/53,33	1/6,67	0	15
Tronco encefálico	2/13,33	12/80	1/6,67	0	15
Hipocampo	7/46,67	7/46,67	1/6,67	0	15
<b>Alterções vasculares</b>					
Congestão	0	3/20	8/53,33	4/26,67	15
Hemorragia	8/53,33	7/46,67	0	0	15
Trombose	6/40	6/40	3/20	0	15
<b>Meningite</b>	6/40	9/60	0	0	15
<b>Meningoencefalite</b>	13/86,67	2/13,33	0	0	15
<b>Meningoencefalomielite</b>	15/100	0	0	0	15

O edema foi a única alteração microscópica que se destacou tendo uma graduação de escore 3 em praticamente todos os animais avaliados, contando com cerca de 93,33% dos animais avaliados, e está ilustrado na figura 3.

Presença de manguitos perivascularares (figura 4) em escore 1 variando a frequência de acordo com a região avaliada, sendo cerebelo em 66,67% dos animais; tronco encefálico em 53,33% e região meningeana com 57,14% dos animais.

A presença de trombose está ilustrada na figura 4. O infiltrado plasmocitário está evidente em várias regiões como demonstra as figuras 4 e 5.

Meningoencefalite não foi encontrada em 86,67%, no entanto está presente em escore 1 em 13,33% dos animais; meningite ausente em 40% e em escore 1 em 60% dos animais. A meningoencefalomielite esteve ausente em todos os cães.



FIGURA 3: Encéfalo: córtex cerebral – edema acentuado (seta) – HXE – 40X

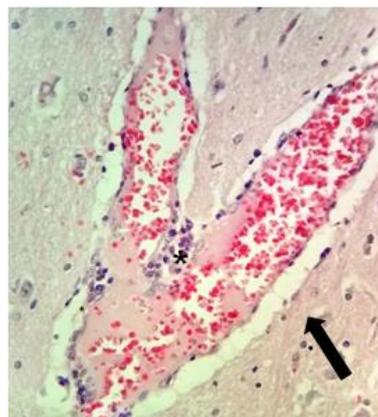


FIGURA 4: Encéfalo – trombose (seta) e manguito perivascular plasmocitário (\*) – HE – 40x

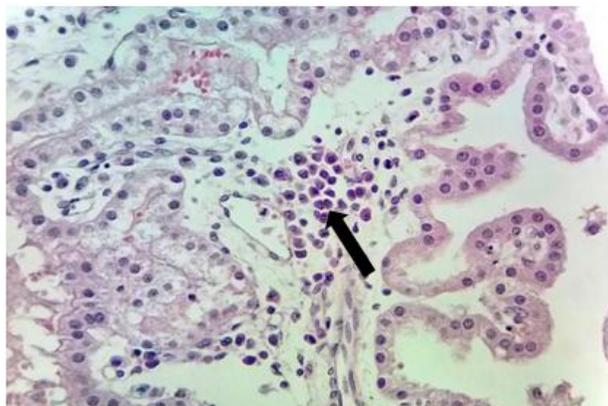


FIGURA 5: Encéfalo – plexo coroide – coroidite plasmocitária (seta) – HE – 40x

## 6.2. Coração

Na avaliação cardíaca macroscópica dos 16 animais, foi possível observar alterações vasculares em 68,75% dos pacientes. As figuras 6, 7 e 8 ilustram algumas dessas alterações. Dentre elas, é possível destacar petéquias equimóticas em átrio, endocárdio e pericárdio, condizente com presença de vasculite severa.

A avaliação histopatológica detectou a presença de alterações como edema, congestão, hemorragia, necrose, infiltrados neutrofílico, linfocitário, linfoplasmocitário, plasmocitário e misto. Essa avaliação está presente no quadro 2. A presença de trombo também pode ser observada como ilustra a figura 9.

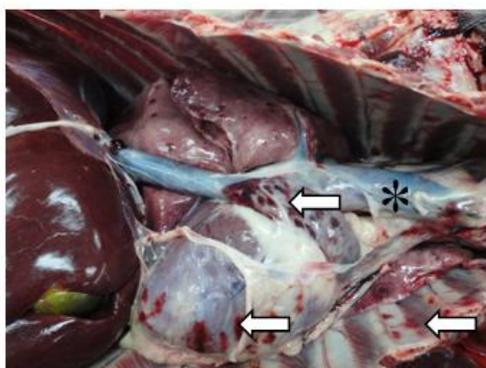


FIGURA 6: Tórax. Petéquias e sufusões (seta) em costelas, átrio, pericárdio e pulmão e dilatação de veia cava cranial (\*).

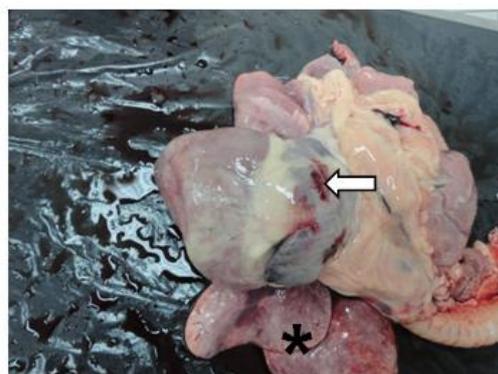


FIGURA 8: Pulmão: Edema, enfisema, pequenos focos hemorrágicos em lobo pulmonar (\*). Coração: presença de foco hemorrágico em região atrial (seta)



FIGURA 7: Pulmão: Edema, enfisema, pequenos focos hemorrágicos em lobo pulmonar (seta). Coração: Petéquias e equimoses (\*).

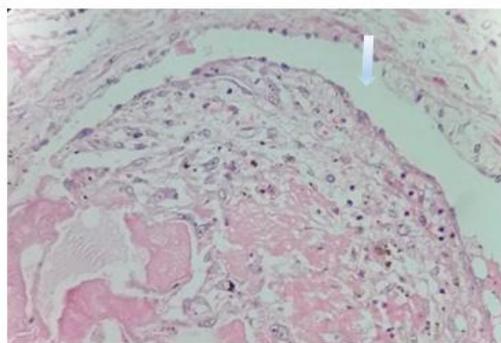


FIGURA 9: Coração – trombo- HXE – 40x

Neste estudo, podemos observar que alterações com escore 2 de edema em 62,5% dos animais, escore 1 de necrose em 59,25% e um escore de grau leve de infiltrado plasmocitário em 37,5% dos 16 animais avaliados.

Alterações como congestão e hemorragia estão presentes em um grau leve. Infiltrado neutrofílico, linfocitário e linfoplasmocitário estão ausentes na avaliação do órgão. Já o infiltrado plasmocitário esteve presente em um escore 1 em 37,5% dos animais.

QUADRO 2: Análise estatística comparada do coração demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica

Score	0	1	2	3	Total Animais
	Animais/%	Animais/%	Animais/%	Animais/%	
Edema	0	5/31,25	10/62,50	1/6,25	16
Congestão	2/12,5	5/31,25	4/25	5/31,25	16
Hemorragia	4/25	8/50	4/25	0	16
Necrose	0	9/59,25	5/31,25	2/12,5	16
Inf. Neutrofílico	15/93,75	1/6,25	0	0	16
Inf. Linfocitário	16/100	0	0	0	16
Inf. Linfoplasmocitário	16/100	0	0	0	16
Inf. Plasmocitário	8/50	6/37,50	2/12,50	0	16
Inf. Misto	2/12,50	12/75	1/6,25	1/6,25	16

### 6.3. Pulmão

As alterações pulmonares macroscópicas mais comuns foram edema em 62,50% dos animais, enfisema presente em alguma região pulmonar em 100% dos animais, a congestão em 68,75% dos animais. As figuras 6 e 7 ilustram essas alterações.

Dentre as alterações pulmonares, destacamos o grau de lesão de edema, enfisema, congestão, hemorragia, atelectasia, hiperplasia de pneumócitos, infiltrado neutrofílico; linfocitário; linfoplasmocitário; plasmocitário e misto, necrose epitelial bronquial; bronquilar, pneumonia intersticial e broncopneumonia. Essas alterações estão presentes no quadro 3.

QUADRO 3: Análise estatística comparada do pulmão demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica

Score	0	1	2	3	Total Animais
	Animais/%	Animais/%	Animais/%	Animais/%	
Edema	1/6,25	5/31,25	2/12,50	8/50	16
Enfisema	0	4/25	11/68,75	1/6,25	16
Congestão	0	8/50	5/31,25	3/18,75	16
Hemorragia	4/25	8/50	3/18,75	1,625	16
Atelectasia	1/6,25	7/43,75	7/43,75	1/6,25	16
Hiperplasia pneumócitos	1/6,25	3/18,75	10/62,50	2/12,50	16
Inf. Neutrofílico	15/93,75	0	1/6,25	0	16
Inf. Linfocitário	16/100	0	0	0	16
Inf. Linfoplasmocitário	16/100	0	0	0	16
Inf. Plasmocitário	0	8/50	5/31,25	3/18,75	16
Inf. Misto	1/6,25	3/18,75	7/43,75	5/31,25	16
Necrose ept. Bronquial	11/68,75	5/31,25	0	0	16
Necrose ept. Bronquiolar	10/62,50	3/18,75	2/12,50	1/6,25	16
Pneumonia Intersticial	1/6,25	8/50	4/25	3/18,75	16
Broncopneumonia	15/93,75	0	1/6,25	0	16

Dentre as alterações observamos que o edema pulmonar está presente em um escore de 1, 2 e 3 em 31,25%, 12,5% e 50% dos animais respectivamente, como podemos observar na figura 10. O enfisema pulmonar foi encontrado em 68,75% dos animais em um escore 2. Alterações como congestão, hemorragia, atelectasia foram encontradas em um escore leve de grau 1 em cerca de 50% dos animais.

Infiltrado neutrofílico, linfocitário e linfoplasmocitário foram ausentes nos animais desse estudo, já o infiltrado plasmocitário (figura 11) esteve presente em escore 1, 2 e 3 constituindo 50%, 31,25% e 18,75% dos animais respectivamente o que está de acordo com Andereg e Passos (1999) que descreveram que no exame histológico o achado mais comum é um infiltrado de células plasmocitárias perivasculares nos tecidos pulmonares e Castro (2004) que relatou a presença de pequenos focos de infiltração mononuclear em septos alveolares.

Infiltrado misto em 43,75% dos animais. Necrose bronquial e bronquiolar em um escore 1 na minoria dos órgão avaliados. Pneumonia intersticial

presente em escore 1 em 50% dos animais, escore 2 em 25% e escore 3 em 18,75%. Broncopneumonia ausente em 15 dos 16 animais avaliados.

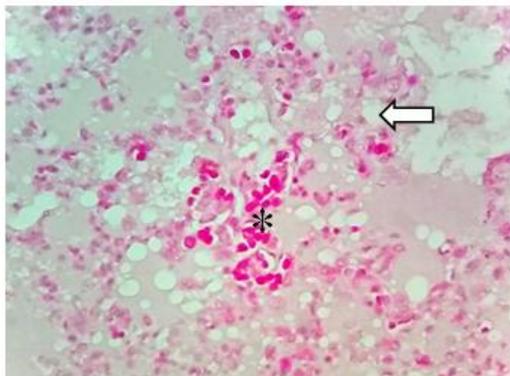


FIGURA 10: Pulmão – edema (seta) e infiltrado plasmocitário (\*) – Verde metil Pironina – 20x

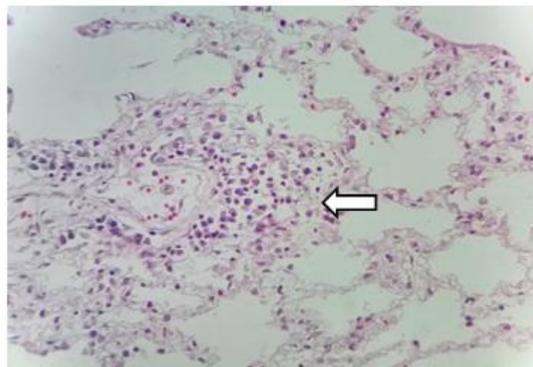


FIGURA 11: Pulmão: manguito perivascular plasmocitário – HE – 20X

#### 6.4. Fígado

Notamos que as alterações macroscópicas nesse órgão foram mais evidentes do que na sua avaliação microscópica. A hepatomegalia se manteve presente em 100% dos pacientes, enquanto que a congestão e degeneração foram encontradas em 87,5% dos animais.

Já a congestão passiva crônica onde o órgão fica com aspecto de nós moscada esteve presente em 31,25% dos animais. Alterações vasculares também foram encontradas em 68,75% dos animais. As figuras 12 e 13 ilustram a hepatomegalia, degeneração do órgão, petéquias em toda a superfície do parênquima e a congestão hepática.



FIGURA 12: Fígado Hepatomegalia, congestão, petéquias e degeneração



FIGURA 13: Fígado Hepatomegalia, congestão, petéquias e degeneração. Fígado em aspecto de nós moscada (congestão passiva crônica)

As alterações microscópicas hepáticas foram separadas em degeneração vacuolar, necrose centro lobular; periportal e difusa, Colestase, fibrose centrolobular; periportal; porto-central, hiperplasia de células de Kupfer, congestão passiva, infiltrado neutrofílico; linfocitário; plasmocitário; linfoplasmocitário e misto. Essas observações estão presentes no quadro 4.

QUADRO 4: Análise estatística comparada do fígado demonstrando a frequência em porcentagem de score de cada lesão microscópica

Score	0	1	2	3	Total Animais
	Animais/%	Animais/%	Animais/%	Animais/%	
Degeneração vacuolar	1/6,25	6/37,50	8/50	1/6,25	16
Necrose centro lobular	7/43,75	6/37,5	1/6,25	2/12,5	16
Necrose periportal	14/87,5	1/6,25	0	1/6,25	16
Necrose difusa	9/56,25	1/6,25	3/18,75	3/18,75	16
Colestase	7/43,75	5/31,25	4/25	0	16
Fibrose centrolobular	16/100	0	0	0	16
Fibrose periportal	14/87,50	2/12,5	0	0	16
Fibrose porto-central	15/93,75	1/6,25	0	0	16
Hiperplasia céls. Kupffer	1/6,25	8/50	7/43,75	0	16
Congestão passiva	0	1/6,25	10/62,50	5/31,25	16
Inf. Neutrofílico	15/93,75	1/6,25	0	0	16
Inf. Linfocitário	16/100	0	0	0	16
Inf. Plasmocitário	7/43,75	5/31,25	2/12,50	2/12,50	16
Inf. Linfoplasmocitário	15/93,25	0	1/6,25	0	16
Inf. Misto	15/93,75	0	1/6,25	0	16

Na avaliação histopatológica notamos que oito animais (50%) obtiveram um escore de 2 para degeneração vacuolar, 6 animais obtiveram um escore de 1 para necrose centro lobular e o fator mais evidente foi a congestão passiva (figura 15) presente em um escore 2 em 62,5% dos animais e escore 3 para 31,25%.

Necrose centrolobular, periportal e difusa, assim como colestase, fibrose centrolobular; periportal e porto-central se mostraram ausentes em praticamente todos os animais do experimento.

Infiltrado neutrofílico, linfocitário, linfoplasmocitário e misto também se encontram ausente em quase 100% dos animais. Já o infiltrado plasmocitário (figuras 14 e 15) esteve presente em escore 0, 1, 2 e 3 na frequência de sete (43,75%), cinco (31,25%), dois (12,5%) e dois (12,5%) respectivamente o que confirmam os dados encontrados por Castro (2004) onde descreveu um leve a moderado infiltrado celular mononuclear.

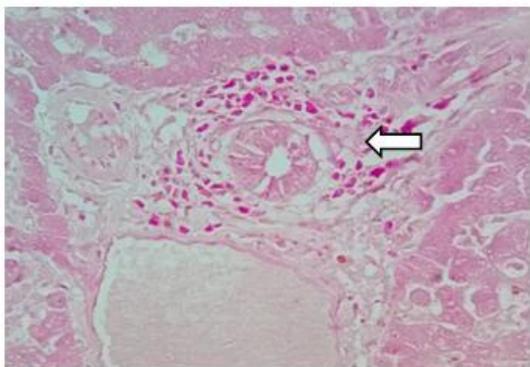


FIGURA 14: Fígado- espaço porta – acúmulo de plasmócitos – Verde metil Pironina – 40x

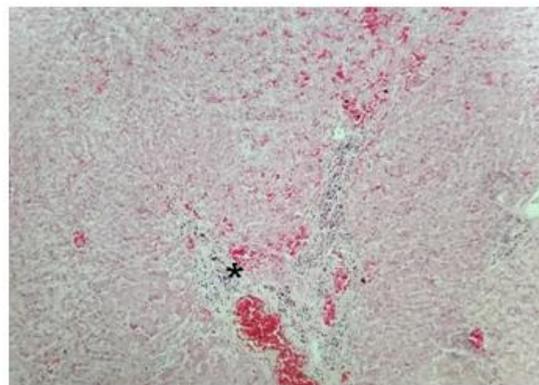


FIGURA15: Fígado – congestão passiva (\*) – manguito perivascular plasmocitário (seta) – HE- 10x

## 6.5. Rim

Dentre os exames necroscópicos dos 16 animais avaliados, foi possível encontrar alterações vasculares em 81,25% deles, como demonstra a figura 17. Degeneração foi encontrada em 56,25% dos animais, aderência de cápsula renal em 43,75% dos órgãos.

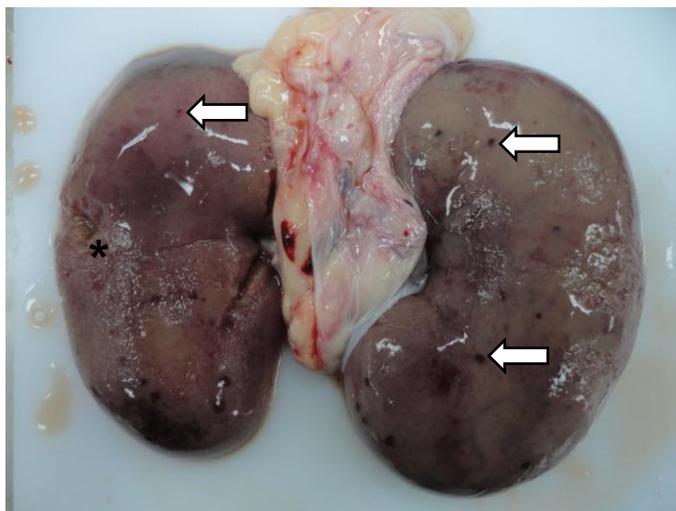


FIGURA 17: Rim. Degeneração, petéquias, sufusões (seta) e aderência capsular (\*)

No exame histopatológico, o rim foi avaliado quanto a degeneração tubular, necrose tubular, Infiltrado focal; multifocal; difuso; discreto; moderado; acentuado; intersticial; peritubular; periglomerular; linfocitário; plasmocitário; linfoplasmocitário e neutrofílico, assim como a caracterização das glomerulonefrites presentes nos órgão. Essas alterações estão presentes no quadro 5.

QUADRO 5: Análise estatística comparada do rim demonstrando a frequência em porcentagem de escore de cada lesão microscópica.

Score	0	1	2	3	Total Animais
	Animais/ %	Animais/ %	Animais/ %	Animais/ %	
Degeneração tubular	0	5/31,25	7/43,75	4/25	16
Necrose tubular	1/6,25	7/43,75	4/25	4/25	16

Infiltrado multifocal	8/50	8/50	0	0	16
Infiltrado difuso	13/81,25	1,625	1,625	1,625	16
Infiltrado discreto	9/56,25	7/43,75	0	0	16
Infiltrado moderado	10/62,50	5/31,25	1/6,25	0	16
Infiltrado acentuado	14/87,50	1,625	0	1,625	16
Infiltrado intersticial	7/43,75	9/56,25	0	0	16
Infiltrado peritubular	9/56,25	7/43,75	0	0	16
Infiltrado periglomerular	7/43,75	9/56,25	0	0	16
Infiltrado linfocitário	16/100	0	0	0	16
Infiltrado plasmocitário	7/43,75	4/25	3/18,75	2/12,5	16
Infiltrado linfoplasmocitário	12/75	3/18,75	1/6,25	0	16
Infiltrado neutrofilico	16/100	0	0	0	16

A degeneração tubular ocorreu em escore 1, 2 e 3 em 31,25%, 43,75% e 25% respectivamente. A necrose tubular em escore 1, 2 e 3 em 43,75%, 25% e 25% respectivamente. O infiltrado linfocitário em neutrofilicos foram ausentes nos órgãos avaliados. Infiltrado focal e acentuado ausente em 14 dos animais avaliados e em escore 1 em apenas 2 animais.

Infiltrado difuso ausente em 13 animais, e em escore 1, 2 e 3 para cada um dos restantes animais. Infiltrado linfoplasmocitario em escore 0, 1 e 2 em doze, três e 1 animal respectivamente. Infiltrado peritubular e discreto ausentes em 56,25% e em escore 1 em 43,75% dos casos. Infiltrado intersticial e periglomerular ausentes em sete animais e em escore 1 em nove animais.

Infiltrado multifocal em escore 1 em metade dos animais e ausente no restante. Infiltrado plasmocitário (figura 18) ausente em 7 animais, em escore 1 em quatro animais, escore 2 em três e escore 3 em apenas dois animais, o que corroboram os resultados de Macedo (2007) onde na análise histológica de rim mostrou infiltrado plasmocitário cortical de intensidade moderada.

A glomerulonefrite foi uma alteração observada em 100% dos animais. Dentre elas, a Glomerulonefrite mesangial (figura 19) em 62,5% dos cães, Glomerulonefrite membranosa em 18,75% dos animais, Glomerulonefrite membranoproliferativa em dois dos pacientes e Glomerulonefrite crônica em apenas 6,25% dos casos.

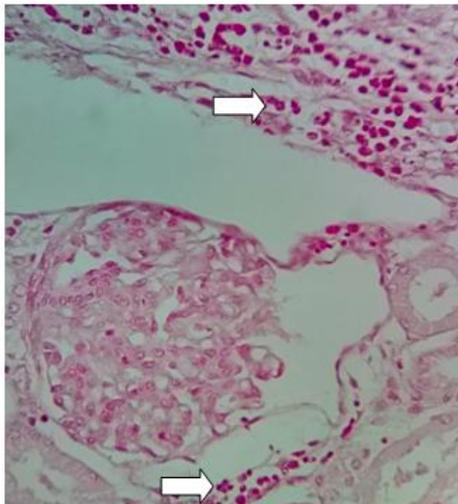


FIGURA 18. Rim: Infiltração periglomerular de plasmócitos (setas). Verde Metil Pironina, 40x

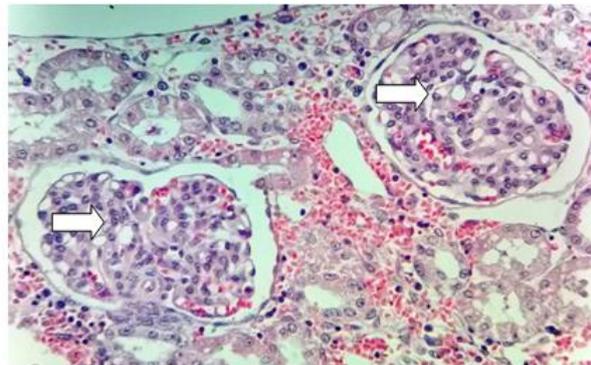


FIGURA 19: Rim: Glomerulonefrite mesangial. Há proliferação de células mesangiais (seta). HE, 20x

#### 6.6. Baço

A esplenomegalia (figura 20) foi a alteração mais evidente relacionada a esse órgão, onde em 100% dos casos estava presente. Esse tipo de alteração já era esperada, já que o baço é o responsável pelo armazenamento e captura de células vermelhas danificadas, o que está em alta quantidade em um cão com infecção por EMC.

O acúmulo plasmocitário (figura 21) presente em escore 1, 2 e 3 em 43,75%, 37,5% e 12,5% respectivamente.



FIGURA 20: Baço. Esplenomegalia, Infarto Hemorrágico

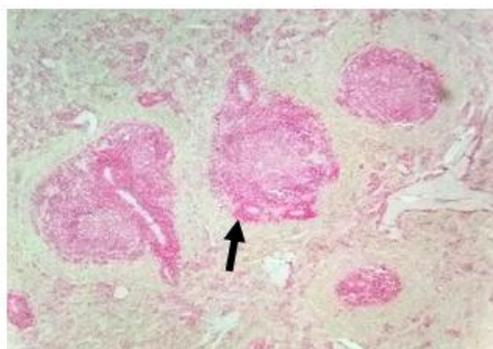


FIGURA 21: Baço: Acúmulo de plasmócitos no parênquima esplênico ao redor dos folículos e trabéculas (setas). Verde metil Pironina, 20x.

O quadro 6, a classificação histopatológica de baço foi realizada quanto a atrofia, hipoplasia e hiperplasia de folículos linfóides, assim como o acúmulo plasmocitário.

A hipoplasia e hipertrofia de folículo linfóide foi ausente em cerca de 81,25% dos animais. A atrofia esteve ausente em 56,25%, escore 1 e 3 em 6,25% e escore 2 em 31,25%.

QUADRO 6: Análise estatística comparada do baço demonstrando a frequência em porcentagem de score de cada lesão microscópica

Score	0	1	2	3	Total Animais
	Animais/%	Animais/%	Animais/%	Animais/%	
ATROFIA DE FOLÍCULOS LINFÓIDES	9/56,25	1/6,25	5/31,25	1/6,25	16
HIPOPLASIA DE FOLÍCULOS LINFÓIDES	12/75	2/12,5	2/12,5	0	16
HIPERTROFIA DE FOLÍCULOS LINFÓIDES	13/81,25	2/12,5	0	1/6,25	16
ACÚMULO DE PLASMÓCITOS	1/6,25	7/43,75	6/37,50	2/12,5	16

#### 6.7. Linfonodo mesentérico

As alterações em linfonodo foram separas em atrofia, hipoplasia e hiperplasia de folículos linfóides, assim como o acúmulo plasmocitário e podem ser observadas no quadro 7.

QUADRO 7: Análise estatística comparada do linfonodo mesentérico demonstrando a frequência em porcentagem de score de cada lesão microscópica

Score	0	1	2	3	Total Animais
	Animais/%	Animais/%	Animais/%	Animais/%	
Atrofia fol. Linfóide	14/87,5	0	1/6,25	1/6,25	16
Hipoplasia de Fol. Linfóide	9/56,25	1/6,25	5/31,25	1/6,25	16
Hipertrofia de Fol. Linfóide	10/62,5	2/12,5	3/18,75	1/6,25	16
Acúmulo de plasmócitos	2/12,5	3/18,75	4/25	7/43,75	16

A atrofia de folículo linfóide foi ausente em 87,5% dos animais. A hipoplasia ausente em 56,25% dos animais, escore 1 e 3 em 6,25% e escore 2

em cinco animais. A hiperplasia (figura 23) ausente em 10 animais, escore 1 em dois animais, escore 2 em três animais e escore 3 em apenas 1 animal o que confirmam os dados de Castro (2004) que descreveu na histopatologia de linfonodo uma discreta hiperplasia folicular com a presença de macrófagos com a presença de muitos plasmócitos.

O acúmulo de plasmócitos neste órgão foi bastante evidente apresentando escore 3 em (sete) 43,75% dos animais e escore 2 em 25% dos pacientes, sendo ilustrada na figura 22.

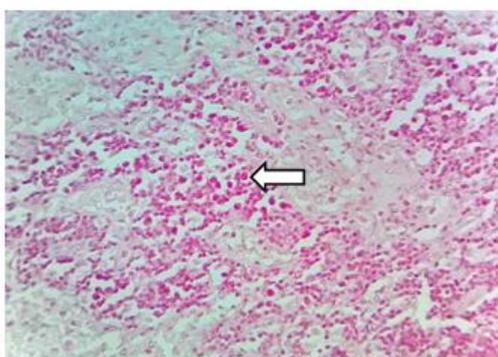


FIGURA 22: Linfonodo – acúmulo de plasmócitos – V.M.P. 20x

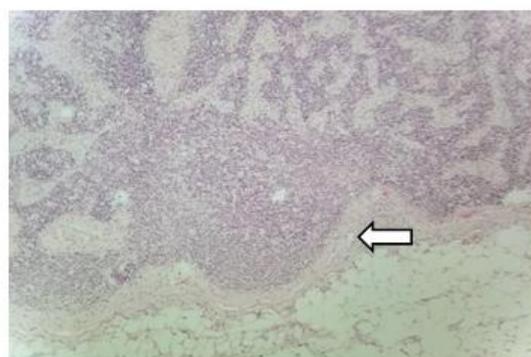


FIGURA 23: Linfonodo – hiperplasia de folículo linfoide – HE – 10x

## 7 Discussão

Embora no presente estudo a meningoencefalite tenha se mostrado presente em apenas 2 animais, confirmamos que no estudo de Castro (2004) onde no exame do sistema nervoso central demonstrou também a presença desta lesão com formação de manguitos perivasculares e infiltrados de células mononucleares nas meninges de cães com erliquiose.

Como descreve Greene (2012), sinais encefálicos geralmente são brandos ou ausentes na enfermidade, o que corrobora com os resultados acima, já que as alterações micro e macroscópicas estão em sua maioria ausentes ou em um leve grau de severidade apresentando sinais clínicos ausentes nos animais estudados.

Quando presentes, esses sintomas variam de manifestações neurológicas como meningite, sangramento meníngeo, causados pela lesão dos tecidos adjacentes do sistema nervoso central, provocando sintomas como convulsões, esturpor, ataxia, disfunção cerebelar, tremores e hiperestesia. Sendo assim, consequentes alterações macroscópicas como meningoencefalite não supurativa multifocal e encefalite (GREENE; APPEL, 2012).

Os resultados obtidos na avaliação cardíaca puderam ser encontrados também no estudo de Diniz (2006), onde na avaliação cardíaca de 11 animais com a enfermidade 82% apresentam sinais microscópicos de necrose.

A presença de infiltrado celular pode ser confirmado no estudo de Macedo (2007) onde na avaliação de cortes cardíacos foram encontrados infiltrados linfocitários e polimorfonucleares disseminados no endocárdio, miocárdio e epicárdio.

Existem evidências de que a *E. canis* possa ser um fator de risco para as lesões de miocárdio, provocando alterações eletrográficas em associação à infecção pela *E. canis* (GREENE, 2015).

De acordo com os sinais clínicos citados anteriormente, acreditamos que o enfisema e edema pulmonar podem ser agravados devido a anemia profunda em que o paciente se encontra durante a fase crônica da enfermidade, ocorrendo estafe pulmonar, tentando, em vão uma manobra compensatória de

esforço respiratório. Além disso, existem infecções bacterianas secundárias à infecção pela *E. canis*, incapacitando ainda mais a função do órgão.

No estudo de Macedo (2007) que avaliou cães infectados por *E. canis*, notou áreas focais de necrose localizadas principalmente na região central de lóbulos hepáticos, associada à infiltrado neutrofílico e plasmocitário. No espaço porta havia infiltrado plasmocitário moderado associado a macrófagos.

Machado (2004) demonstrou em seu estudo que a lesão observada nos rins de cães com EMC foi caracterizada como glomerulonefrite crônica, não-decorrente de deposição de imunocomplexos e mais provavelmente associadas às alterações circulatórias, em consequência da compressão vascular e do processo inflamatório ou redução do fluxo sanguíneo por trombose.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Castro et.al. (2004) onde foi caracterizado uma glomerulonefrite por infiltrado de células inflamatória nos rins, evidenciando que a EMC está diretamente relacionada com alteração funcional glomerular com consequente diminuição da taxa de filtração glomerular e perfusão renal inibindo a capacidade de total excreção dos metabólitos urêmicos.

Já Macedo (2007) observou hiperplasia do folículo e cordões esplênicos, porém apresentando nessa região grande quantidade de plasmócitos e relativamente poucos linfócitos e macrófagos.

Harrus et al (1998b) sugeriram que o baço desempenha um importante papel na patogênese da EMC e propuseram, que a esplenite linfoplasmacítica induzida por *E. canis* poderia levar a uma produção e/ou elaboração de um fator esplênico, que suprimiria a hematopoiese.

Estudos realizados com animais esplenectomizados demonstram que os mesmos apresentam sinais clínicos mais brandos do que animais portadores do baço, nas infecções por erliquiose. Pois o baço tem importante papel na imunopatogenia dessa doença, produzindo mediadores e substâncias, envolvendo mecanismos imunes (ALMOSNY et al., 2002).

A ausência deste fator em cães esplenectomizados talvez explicasse a redução nos parâmetros eritrocitários vistos em cães intactos, postulando os autores que tal fator poderia desempenhar um importante papel na supressão da medula óssea que ocorre durante a fase crônica da infecção.

Macedo (2007) na avaliação histológica de linfonodo observou folículos linfoides corticais com rarefação da celularidade do centro germinativo, linfocitopese reduzida com diminuição de linfócitos e seus precursores e aumento da quantidade de plasmócitos e polimorfonucleares.

## Conclusões

- A vasculite foi responsável pela maioria das lesões encontradas nos órgãos de todos os animais estudados.
- Os achados histopatológicos demonstraram que os animais que vieram a óbito tiveram um comprometimento geral dos órgãos, com inflamação crônica predominantemente plasmocitária.
- No encéfalo pudemos observar que não houve um grande grau de alterações, com exceção de edema em escore 3, confirmando a presença de inflamação no órgão, mas não em grau suficiente para provocar sinais clínicos neurológicos nos animais estudados.
- No coração foram observadas alterações vasculares visíveis, devido à severa trombocitopenia desenvolvida durante a infecção, que se refletiu no histopatológico em congestão e edema e necrose do órgão.
- No pulmão notou-se pneumonia em grande parte dos animais estudados. Isso ocorreu devido infecções bacterianas secundárias à erliquiose, já que os animais já se encontravam em uma situação de imunodeficiência devido à enfermidade.
- O fígado também se apresentou acometido, mas não diretamente pela infecção, mas sim por consequência de outros fatores prejudiciais relacionados à doença.
- Em 100% dos rins avaliados a glomerulonefrite se mostrou presente, o que era esperado, já que a deposição de imunocomplexos neste órgão é bastante considerável.
- Em todos os 16 animais pode-se notar a esplenomegalia, já que este órgão é o responsável por armazenar as células vermelhas danificadas.
- O linfonodo mesentérico não é uma estrutura muito estudada em animais com EMC, mas pode-se notar um grande infiltrado plasmocitário.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M. et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, p. 796-802, 2007.
- ALMOSNY, N.R.P; MASSARD, C.L. Ehrliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitose em pequenos animais domésticos e como zoonose**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2002, p. 13-56.
- ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose canina: a revisão. *Clínica Veterinária*, v.4, n.19, p.31-38, 1999.
- BELLAH, J.R.; SHULL, R.M.; SELCER, E.V.S. Ehrlichia canis-related polyarthritis in a dog. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.189, n.8, p.922-923, 1986.
- BREITSCHWERDT, E.B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. P. 422-429
- BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; HANCOCK, S.I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v. 42, p. 362-368, 1998.
- BREMER, W. G. et al. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v.131, n.1- 2, p.95-105, 2005.
- BULLA, C. et al. The relationship between the degree of trombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146, 2004.

- CASTRO, M.B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v.119, p. 73-86, 2004.
- COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, p. 863-884, 2003.
- COSTA, J.O.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M.P; BATISTA JUNIOR, J.A. *Ehrlichia canis* Infection in a dog in Belo Horizonte – Brasil. **Arquivo da Escola Veterinária**, v.25, n. 2, p. 199-200, 1973.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. Semina: **Ciências agrárias**, v.22, p.191-201, 2001.
- DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses filiales de l'Quest- Africain et de Madagascar, Siege de la société**: Institut Pasteur, Paris, Masson & Cie., Éditeurs, Libraires de L'Académie de Medicine, p. 418-419, 1935.
- DOYLE, C.K. et al. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* gp36 and *Ehrlichia chaffeensis* gp47 Tandem Repeats among isolates from different geographic locations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 433-435, 2005.
- DUMLER, J.S. et al. Reorganization of Genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2145-2165, 2001.

- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusions or morulae of *E. canis*. **Journal of Small Animal Practice**, v.33, p. 540-543, 1991.
- ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- EWING, S.A. et al. A new strain of *Ehrlichia canis*. **Journal American Veterinary Medical Association**. V. 159, n. 12, p. 1771-1774. 1971.
- FENOLLAR, F.; RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **APMIS**, v. 112, p. 785-807, 2004.
- FONSECA, J.P.; HIRSCH, C. GUIMARÃES, A.M. Eriquiase monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. **PUBVET**, Londrina, v.7, n.8, Ed. 231, Art. 1529, Abril, 2013.
- GAL, A. et al. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 48, p. 619, 622, 2007.
- GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine Distemper. In: GREENE, C. E. (Eds.) **Infectious Disease of the Dog and Cat**. Philadelphia: Saunders, 2012. p. 243-256.
- GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSSOLL, O.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to Dogs by Thicks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.07, p.937-940, 1975.
- HARRUS, S, et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n.9, p. 2745-2749, 1999.

- HARRUS, S. et al. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washinton, v. 36, p. 73-76, 1998a.
- HARRUS, S. et al. Comparison of Simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment os experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents Chemother.**, v. 48, p. 4488-4490, 2004.
- HARRUS, S. WANER, T. Diagnosis of canine monocytropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **The Veterinary Journal**, London, v.187, p. 292-296, 2011.
- HARRUS, S. WATER, T.; KEYSARY, A. AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation os splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunophathology**, Amsterdam, v.62, p. 15-27, 1998b.
- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine mococytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 36, p. 431-447, 1997.
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agents in dogs. **The Journal of Infectious Disease**, v. 137, p. 182-188, 1978.
- HOSKINS, J.D. Ehrlichial Diseases of Dogs: Diagnosis and treatment. *Canine Prattice*, v. 16, n.3, p.13-21, 1991.
- HUXSOLL, D.L. et al. Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 157, p. 1627-1632, 1970.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.

- IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* tissues of dogs. **Veterinary Microbioly**, v. 42, n.4, p. 281-287,1994a.
- KORDICK, S.K. et al. Coinfection with Multiple Tick-borne Pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. **Journal of Clinical microbiology**, v. 37, p. 2631-2638, 1999.
- LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brasil. **Veterinary Therapeutics Archives**, v.4, n.1, p.67-75, 2003.
- LAPPIN, M.R. Doenças R iquetsianas Polissistêmicas. In NELSON, R.W.; COUTO, C.G.: **Medicina interna de pequenos animais**, 2 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
- LEWIS, G.E. et al. The Brown Dog Tick *Rhipicephalus sanguineus* and the Dog as Experimental Hosts of *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research* , v.38, n.12, p.1953-1955, 1977.
- MACEDO, E. A. **Ultraestrutura de células parasitadas por Ehrlichia spp., métodos diagnósticos e histopatologia em órgãos de cães com erliquiose da micro-região de Uberlândia-MG**. Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia –UFU. 2007.
- MACHADO, R.Z. Ehrlichiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004.
- MATTHEWMAN, L.A. et al. Further evidence for the efficacy of imidicarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. **Journal of South African Veterinary Association**, v.65,n.3,p.704-107, 1994.

- MAVROMATIS et al. The Genome of the Obligate Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, p. 4015-4023, 2006.
- McDADE, J.E. Ehrlichiosis: a disease of animals and humans. **The Journal of Infectious Disease**, v.161, p. 609-617, 1990.
- MEINKOTH, J.H. et al. Ehrlichiosis in a dog with seizures and nonregenerative anemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.195, n.12, p.1754-1755, 1989.
- MOREIRA, S.M. et al. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p. 141-147, 2003.
- MUNHÓZ, A.L.F.; BABO,V.J. Estudo retrospectivo das características da erliquiose canina. **Ahora Veterinária**. V. 18, n. 106, p. 39-43, 1998.]
- MYLONAKIS, M.E. et al. Chronic canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, p. 174-184, 2004.
- NAKAGHI, A.C.H. et al. Estudo comparativo entre a PCR baseada no gene dsb e a nested PCR no diagnóstico de erliquiose canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES, 13º, Ouro Preto, MG, 2004. Anais... Ouro Preto, 2004. NAKAGHI A.C.H. et al. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares, *Ciência Rural*, v.38, p.766-770, 2008.
- NEER, T.M. et al. Consensus statement on erlichial disease of small animals from the infection disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p. 309-315, 2002.

- NELSON, R.W.; COUTO, G.E. Doenças riquetsianas polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO, G.E. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. P. 1006-1011.
- NYINDO, M.B.A. et al. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent: Ehrlichia canis. American Journal Veterinary Research, v.32, n.2, p.1651-1658, 1971.
- O'DWYER, L.H; MASSARDE, C.L.; SOUZA, J.C.P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p 143-150,2001.
- OLIVEIRA, D. et al. *Ehrlichia canis* antibodies detection by "DOT ELISA" in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v,9, p. 1-6, 2000
- PADDOCK, C.D. et al. Infectious with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in Persons Coinfected with Human Immunodeficiency Virus. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p. 1586-1594. 2001.
- PANCIERA, R. J.; EWING, S.A.; CONFER, W. Ocular Histopathology of Ehrlichial Infection in the Dog. **Veterinary Pathology**, Basel, v.38, p. 43-46, 2001.
- PERILLE, A.L.; MATUS, R.E.; Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, p. 195-198, 1991.
- QUINN, P.J. et al. In: Rickettsiales. Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.206-214.
- RIKIHISA, Y. Diagnosis of emerging ehrlichial disease of dogs, horses, and humans. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 250-251, 2000.

- RIKIHISA, Y. Mechanisms to Create a Safe Haven by Members of the family *Anaplasmataceae*. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 990, p. 548 – 555, 2003.
- RIKIHISA, Y. The tribe erlichieae and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p. 286-308, 1991.
- SAINZ, A. **Aspectos clínicos Y epizootológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapeutica de la doxiciclina y del dipropionato de imidocarb.** Universidad Complutense de Madrid. Tese de doutorado. 255p. Madrid, 1996.
- SANTARÉM, V.A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*.** 2003. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-2003.
- SIMPSON, C.F. Relationship of *Ehrlichia canis* – infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. *Infection and Immunity*, v.10, n.3, p.590-596, 1974
- SMITH, R.D. et al. Development of *Ehrlichia canis*, causative agente of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v.37, p. 119-126, 1976.
- SUKSAWAT, J et al., Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 50-55, 2000.
- TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious disease of dog and cat.** Philadelphia: W.B. Saunders, 2006. P. 404-418.

- UENO, T.E.H. et al. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n.3, p. 57-61, 2009.
- UNVER, A. et al. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a non virulent strains o *Ehrlichia canis*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v.15, p.1-3, 2008. Suppl 1.
- VARELA, A.S. Tick-borne ehrlichiae and rickettsiae of dogs: Companion and exotic animal parasitology. **Internatonal Veterinary information Service**. 2003.
- WANER, T. et al. Significance of serological testing for ehrlichial disease in dogs with special omphafis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 1-15, 2001.
- WATANABE, M. et al. Experimental inoculation of beagle dogs with *Ehrlichia* species detected from *Ixodes ovatus*. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 147-154, 2005.
- WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial disease of dogs. *Veterinary Clinicals of North America: Small animal pratice*, v.21, n.1, p.45-98, 1991.
- YABSLEY et al. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii* and *Rickettsia spp* in dogs from Grenada. **Veterinary Parasitology.**, v. 151, p. 279-285, 2008.

## ANEXO II

### Artigo a ser enviado para a Revista Brasileira de Ciência Veterinária

#### Estudo Histopatológico Das Lesões Viscerais Da Erliquiose Monocítica Canina Na Fase Crônica

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as lesões anatomopatológicas macro e microscópicas que ocorreram no parênquima e no endotélio vascular dos órgãos (encéfalo, coração, pulmão, fígado, rim, baço e linfonodo mesentérico) de 16 cães que vieram a óbito acometidos pela Erliquiose Monocítica Canina na fase crônica. No encéfalo podemos observar que não houve um grande grau de alterações. No coração foi possível notar a presença de alterações vasculares visíveis. No pulmão notou-se pneumonia em grande parte dos animais estudados. O fígado também se apresentou acometido, mas não diretamente pela infecção. Em 100% dos rins avaliados a glomerulonefrite se mostrou presente, assim como a esplenomegalia, já que este órgão é o responsável por armazenar as células vermelhas danificadas. O linfonodo mesentérico não é uma estrutura muito estudada em animais com EMC, mas pode-se notar um grande infiltrado plasmocitário.

**Palavras chave:** Cão, *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, Trombocitopenia

Carolina Dias de Campos Sanches<sup>1</sup>; Antonio Carlos Paes<sup>2</sup>, Osimar de Carvalho Sanches<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do curso de Medicina Veterinária em Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública- FMVZ- Unesp – Botucatu - SP- Brasil – carol\_sanches5@hotmail.com

<sup>2</sup>Professor Adjunto Doutor do curso de Medicina Veterinária em Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública- FMVZ- Unesp -SP – Botucatu –Brasil – paesacmi@unesp.br

<sup>3</sup>Médico Veterinário Doutor do Laboratório de Consultoria e Diagnóstico Anatomopatológico Veterinário – CDAPVET – Presidente Prudente – SP – Brasil – osimarsanches@yahoo.com.br

## Introdução

A Ehrlichiose Monocítica Canina é uma bactéria cocóide, intracelular obrigatória, gram-negativa, pleomórfica, pequena medindo cerca de 0,5 – 0,9 µm (WANER & HARRUS, 2001). O principal vetor e reservatório de *E. canis* é o *R. sanguineus*. Durante o período de incubação de 8 a 20 dias (GREENE; APPEL, 2012) uma vez no hospedeiro, as bactérias se multiplicam nos fagossomos das células mononucleares fagocíticas, propagando-se para o baço, fígado e órgãos linfóides (McDade, 1990), evoluindo de corpúsculos elementares para corpúsculos iniciais até a formação de mórulas (NYINDO et al., 1971).

Um mecanismo de adaptação que possibilita a permanência das erlíquias dentro dos vacúolos e a sua comunicação com a célula hospedeira por meio de retículo endoplasmático foi identificado em um grupo de genes de anquirina que codificam proteínas que talvez possam mediar interações específicas entre proteínas (GREENE; APPEL, 2012). No entanto, devido a essas proteínas de anquirina não ocorre a fusão fagolisossomal no interior das células infectadas, permitindo que os corpúsculos elementares se desenvolvam e se dividam por divisão binária dentro dos limites do fagossomo nas células hospedeiras infectadas.

O período de incubação varia de uma a três semanas após a infecção que tem duração duas a quatro semanas (NELSON; COUTO, 2001) apresentando sinais como febre, apatia e hipo/anorexia (RIKIHISA et al., 1991; DAGNONE et al., 2001). O desenvolvimento da enfermidade se dá em três fases: aguda, subclínica e crônica, onde a infecção natural essas fases não são muito bem distinguíveis.

Durante a fase aguda, uma vez a bactéria no interior das células mononucleares teciduais de baço, fígado e linfonodos, são carreadas pela corrente sanguínea para os pulmões, rins e meninges, onde aderem ao endotélio vascular e causam vasculite e infecção do tecido subendotelial. Nessa fase, os sinais clínicos são inespecíficos e incluem febre, secreção ocular e nasal, anorexia, apatia, perda de peso, dispneia, linfadenopatia, vasculite induzindo a grandes ou pequenos focos hemorrágicos, sinais neurológicos, musculares, oculares e poliatrite (GREENE; APPEL, 2012), além de edema de membros, diáteses hemorrágicas, poliúria e/ou polidipsia (OLIVEIRA et al., 2000). Após a fase aguda os animais imunocompetentes podem eliminar o agente sem desenvolver a fase crônica, ou entrar para a fase subclínica, onde os sinais clínicos não são evidentes, mas o agente permanece infectando o organismo do hospedeiro

persistindo por meses e anos. Nessa fase, devido à deposição de imunocomplexos, alguns animais apresentarão glomerulonefrite (FONSECA et al., 2013).

Nestes cães onde existe a resposta imunológica insuficiente a doença irá se desenvolver para a fase crônica, ocorrendo o comprometimento da medula óssea com pancitopenia (MYLONAKIS et al., 2004).

No entanto, nosso objetivo foi avaliar por histopatologia as lesões causadas pela bactéria nos órgãos coletados durante o exame necroscópico de animais com o desenvolvimento da fase crônica da enfermidade.

Através das laminas coradas pela hematoxilina-eosina detectar as lesões principais e o grau de vasculite nos órgãos afetados: encéfalo, coração, pulmão, fígado, rim, baço e linfonodo mesentérico.

Utilizando-se corantes especiais (Hematoxilina e Eosina (HE), Ácido Periódico-Schiff (PAS) e Tricrômio de Masson). observaremos a presença de plasmócitos em todos os órgãos estudados, pois se tornou patente nessa enfermidade reações imunomediadas prejudicando intensamente o hospedeiro, tal como anticorpos anti plaquetas e produção de linfocina que impedem a migração e ação natural das plaquetas, fazendo com que o sistema imune trabalhe contra o hospedeiro.

### **Materiais e Métodos**

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da faculdade FMVZ – UNESP- Botucatu- SP gerando um protocolo n° 78/2015.

Foram utilizados 16 animais naturalmente infectados na fase crônica da enfermidade, que foram atendidos e vieram a óbito no setor de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Hospital Veterinário, da FMVZ, UNESP – Botucatu.

O baço coletado durante o exame necroscópico foi processado no Laboratório de Diagnóstico Molecular no Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu do Departamento de Microbiologia e Imunologia para diagnóstico e realização da PCR.

Todos os animais foram atendidos no setor de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Hospital Veterinário, FMVZ, UNESP – Campus Botucatu e os casos de óbito ou irrecuperáveis que não responderam ao tratamento e se encontravam em sofrimento e situação incompatível com a vida foram eutanasiados e seus órgãos utilizados neste procedimento de pesquisa.

Após a eutanásia houve a retirada do encéfalo, pulmão, coração, fígado, baço, rim e linfonodos mesentéricos que foram armazenados em frascos contendo formol 10%

tamponado para avaliação histopatológica na coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), e Tricrômio de Masson, Verde Metil Pironina.

Dessa forma, foram colhidas amostras de baço no exame necroscópico de todos os animais e foram devidamente congeladas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para diagnóstico de PCR. Colheu-se também órgãos que foram colocados em frasco devidamente fechado contendo Formol 10% tamponado para análise histopatológica.

Todos os órgãos de todos os animais foram colhidos e fixados em solução de formalina a 10% tamponada, por 72 horas. Após a fixação foram lavados por 1 hora e em seguida armazenados em solução de álcool a 70%. Os fragmentos processados de acordo com a técnica de rotina histopatológica para inclusão em parafina. Cortes com 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, depositados em lâminas e em seguida permaneceram em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  por 12 horas para fixação dos cortes à lâmina. A distribuição dos escores de lesões anatomopatológicas de cada variável estudada foi calculada com o procedimento estatístico PROC FREQ (SAS versão 9.3)

### **Resultados e Discussão**

Cada um dos 16 encéfalos foram avaliados macroscopicamente e microscopicamente. Em um total de 16 encéfalos, 15 deles (93,75%) não apresentaram alterações, mas em apenas 1 (6,25%) órgão foi possível observar hemorragia focal de bulbo e ponte como mostra a .

É possível observar que o edema foi a única alteração microscópica que se destacou tendo uma graduação de escore 3 (grau severo) em praticamente todos os animais avaliados, contando com 93,33% dos animais avaliados.

Como descrito na literatura, sinais encefálicos geralmente são brandos ou ausentes na enfermidade, o que corrobora com os resultados acima, já que as alterações micro e macroscópicas estão sempre ausentes ou em um leve grau de severidade.

Meningoencefalite está presente em um eescore de 1 (grau leve) em 13,33% dos casos; meningite em eescore 1 com 60% e presença de manguitos perivasculares em escore 1 variando a frequência de acordo com a região avaliada, sendo cerebelo em 66,67% dos animais; tronco encefálico em 53,33% e região meníngeana com 57,14% dos animais. Greene (2012) descreve manifestações neurológicas como meningite, sangramento meníngeo, causados pela lesão dos tecidos adjacentes do sistema nervoso central, provocando sintomas como convulsões, esturpor, ataxia, disfunção cerebelar, tremores e hiperestesia. Sendo assim, consequentes alterações macroscópicas como meningoencefalite não supurativa multifocal, encefalite,

Existem evidências de que a *E. canis* possa ser um fator de risco para as lesões de miocárdio, provocando alterações eletrográficas em associação à infecção pela *E. canis* (GREENE; APPEL, 2012).

Na avaliação macroscópica dos órgãos dos 16 animais, foi possível observar alterações vasculares em (onze) 68,75% dos pacientes. Dentre elas, é possível destacar petéquias equimóticas em átrio, endocárdio e pericárdio, condizente com presença de vasculite severa.

Neste estudo, podemos observar que alterações como escore 2 de edema em 62,5% dos animais, escore 1 de necrose em 59,25% e um escore de grau leve de infiltrado plasmocitário em 37,5% dos 16 animais avaliados.

Estes resultados podem ser encontrados também no estudo de Diniz (2006), onde na avaliação cardíaca de 11 animais com a enfermidade, nove animais (82%) apresentam sinais microscópicos de necrose.

As alterações pulmonares macroscópicas mais comuns foram edema em 62,50% dos animais, enfisema presente em alguma região pulmonar em 100% dos animais, a congestão em 68,75% contando um total de onze animais.

Dentre as alterações pulmonares o enfisema e o edema pulmonar se destacam das outras lesões. O edema pulmonar em um escore de 3 considerando a severo grau de lesão acometendo 50% dos 16 animais avaliados. O enfisema pulmonar foi encontrado em 68,75% dos animais. Alterações como congestão, hemorragia, atelectasia e pneumonia intersticial foram encontradas em um escore leve de grau 1 em cerca de 50% dos animais.

O enfisema e edema pulmonar podem ser justificados devido a anemia profunda em que o paciente se encontra durante a fase crônica da enfermidade, já que o tecido sem o carregamento de oxigênio adequado, acaba entrando em estafe pulmonar, tentando, em vão uma manobra compensatória de esforço respiratório.

Notamos que as alterações macroscópicas nesse órgão foram mais evidentes do que na sua avaliação microscópica. A hepatomegalia se manteve presente em 100% dos pacientes, enquanto que a congestão e degeneração foram encontradas em 14 animais (87,5%). Já a congestão passiva crônica onde o órgão fica com aspecto de nós moscada esteve presente em 5 desses animais (31,25%). Alterações vasculares também foram encontradas em (onze) 68,75% dos animais. Foi observado hepatomegalia, degeneração do órgão, petéquias em toda a superfície do parênquima e a congestão hepática.

Notamos que as alterações microscópicas do fígado não foram tão severas, onde 8 animais (50%) obtiveram um escore de 2 para degeneração vacuolar, 6 animais obtiveram um escore de 1 para necrose centro lobular e o fator mais evidente foi a congestão passiva presente em um escore 2 em 62,5% dos animais.

Com o desenvolvimento de um processo imunomediado secundário à infecção por EMC, é esperado que ocorra uma grande deposição de imunocomplexos neste órgão, provocando as várias alterações renais já citadas anteriormente. Essa lesão geralmente acarreta deficiência do órgão em sua função, prejudicando a filtração sanguínea.

Dentre os exames necroscópicos dos 16 animais avaliados, foi possível encontrar alterações vasculares em 13 deles (81,25%). Degeneração foi encontrada em nove (56,25%) animais, aderência de cápsula renal em sete (43,75%) órgãos.

Na microscopia notou-se degeneração tubular de escore 2 e (sete) 43,75% dos animais, infiltrado intersticial de escore 1 em (neve) 56,25% dos pacientes, infiltrado peritubular de escore 1 em (sete) 43,75% dos animais e infiltrado periglomerular escore 1 em 56,25% dos casos.

É possível observar o tipo de glomerulonefrite que cada animal apresentou. Glomerulonefrite mesangial em (dez) 62,5% dos cães, Glomerulonefrite membranosa em (três) 18,75% dos animais, Glomerulonefrite membranoproliferativa em dois dos pacientes e Glomerulonefrite crônica em apenas um (6,25%) dos casos. Assim, podemos concluir que todos os 16 cães obtiveram algum tipo de glomerulonefrite.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Castro et.al. (2004) onde foi caracterizado uma glomerulonefrite por infiltrado de células inflamatória nos rins, evidenciando que a EMC está diretamente relacionada com alteração funcional glomerular com conseqüente diminuição da taxa de filtração glomerular e perfusão renal inibindo a capacidade de total excreção dos metabólitos urêmicos.

A esplenomegalia foi a alteração mais evidente relacionada a esse órgão, onde em 100% dos casos estava presente. Esse tipo de alteração já era esperada, já que o baço é o responsável pela armazenagem e captura de células vermelhas danificadas, o que está em alta quantidade em um cão com infecção por EMC.

Nota-se uma infiltração plasmocitária de escore 1 e 2 em 43, 75% e 37,5% respectivamente.

O acúmulo de plasmócitos no linfonodo mesentérico foi bastante evidente apresentando escore 3 em (sete) 43,75% dos animais e escore 2 em 25% dos pacientes.

### **Conclusões**

É possível concluir que a vasculite foi a responsável pela maioria das lesões encontradas nos órgãos de todos os animais estudados. Em todos os órgãos avaliados foi encontrado infiltrado plasmocitário, evidenciando um processo imunomediado nesta enfermidade. No encéfalo podemos observar que não houve um grande grau de alterações, com exceção de edema em escore 3, confirmando a presença de inflamação no órgão, mas não em quantidade suficiente para provocar sintomas clínicos neurológicos importantes nos animais estudados. No coração foi possível notar a presença de alterações vasculares visíveis, devido à severa trombocitopenia desenvolvida durante a infecção, que se refletiu no histopatológico em congestão e edema e necrose do órgão. No pulmão notou-se pneumonia em grande parte dos animais estudados. Acreditamos que isso ocorra devido infecções bacterianas secundárias à erliquiose, já que o animal já se encontra em uma situação de imunodeficiência devido à enfermidade. O fígado também se apresentou acometido, mas não diretamente pela infecção, mas sim por consequência de outros fatores prejudiciais relacionados à doença. Em 100% dos rins avaliados a glomerulonefrite se mostrou presente, o que era esperado, já que a deposição de imunocomplexos neste órgão é bastante considerável na erliquiose crônica. Em todos os 16 animais pode-se notar a esplenomegalia, já que este órgão é o responsável por armazenar as células vermelhas danificadas. O linfonodo mesentérico não é uma estrutura muito estudada em animais com EMC, mas pode-se notar um grande infiltrado plasmocitário.

### **Referencias**

- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. Semina: Ciências agrárias, v.22, p.191-201, 2001.
- FONSECA, J.P.; HIRSCH, C. GUIMARÃES, A.M. Erliquiose monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. PUBVET, Londrina, v.7, n.8, Ed. 231, Art. 1529, Abril, 2013.
- GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine Distemper. In: GREENE, C. E. (Eds.) Infectious Disease of the Dog and Cat. Philadelphia: Saunders, 2012. p. 243-256.

- McDADE, J.E. Ehrlichiosis: a disease of animals and humans. *The Journal of Infectious Disease*, v.161, p. 609-617, 1990.
- MYLONAKIS, M.E. et al. Chronic canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 40, p. 174-184, 2004.
- NELSON, R.W; COUTO, G.E. Doenças riquetsianas polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO. G.E. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. P. 1006-1011.
- NYINDO, M.B.A. et al. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent: *Ehrlichia canis*. *American Journal Veterinary Research*, v.32, n.2, p.1651-1658, 1971.
- OLIVEIRA, D. et al. *Ehrlichia canis* antibodies detection by "DOT ELISA" in naturally infected dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v,9, p. 1-6, 2000
- RIKIHISA, Y. Diagnosis of emerging ehrlichial disease of dogs, horses, and humans. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 14, p. 250-251, 2000.
- WANER, T. et al. Significance of serological testing for ehrlichial disease in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, v. 95, p. 1-15, 2001.