

VAMILTON ALVARES SANTARÉM

**ACHADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
HEMATOLÓGICOS E COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS
PARA DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis***

VAMILTON ALVARES SANTARÉM

**ACHADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
HEMATOLÓGICOS E COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS
PARA DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Área de Concentração: Clínica Veterinária).

ORIENTADOR: Prof. Ass. Dr. Izidoro Francisco Sartor

Botucatu

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Santarém, Vamilton Alvares.

Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis* / Vamilton Alvares Santarém. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia ,
Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Izidoro Francisco Sartor

Assunto CAPES: 50500007

1. Cão – Doenças - Diagnóstico

CDD 636.70896

Palavras-chave: Achados clínico – laboratoriais; Canino; Diagnóstico;
Ehrlichiose; Epidemiologia

DADOS CURRICULARES

| | |
|------------|--|
| NASCIMENTO | 02.04.1964 – Salvador/Ba |
| FILIAÇÃO | Milton da Paixão Santarém Wanda Maria Alvares Santarém |
| 1987/1993 | Curso de Graduação : Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Federal da Bahia |
| 1994/1996 | Residência em Medicina Veterinária Área de Enfermidades Parasitárias dos Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus de Botucatu |
| 1996 | Ingresso no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária Área de Clínica Veterinária Sub-área de Enfermidades Parasitárias dos Animais da FMVZ – Unesp – Botucatu |
| 1998 | Defesa de dissertação de Mestrado Título: Fase de vida livre e flutuação sazonal do <i>Boophilus microplus</i> (Canestrini, 1887), na região de Botucatu, São Paulo |
| 1998 | Admissão na Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Curso de Medicina Veterinária. Responsável pela Disciplina: - Enfermidades Parasitárias Professor Assistente: - Parasitologia Veterinária; Zoonoses e Saúde Pública; Apóio Diagnóstico - Professor convidado das Disciplinas de: Patologia Clínica Veterinária e Imunologia Veterinária |
| 2000 | Ingresso no Curso de Doutorado em Medicina Veterinária Área de Clínica Veterinária Sub-área de Enfermidades Parasitárias dos Animais da FMVZ – Unesp – Botucatu |

Esse trabalho é dedicado ao que há de mais importante em minha vida:

A Deus

“Se voltares as costas à luz, nada mais verás além da tua própria sombra.”
(Anônimo)

**À memória de Stella da Paixão, minha mãe-avó,
e à de Vladimir Roque Alvares Santarém, meu irmão,
que sempre contribuíram para a minha felicidade e
para que meus sonhos se tornassem realidade.**

“O que é belo não morre: transforma-se em outra beleza.”
(Balley Ardrich)

**À minha querida Cecília Laposy Santarém.
Esposa, companheira e amiga fiel, que entendeu todos os
momentos difíceis e os traduziu em palavras
de incentivo e gestos de ternura.**

“Tudo que eu fiz foi me confessar escravo do seu amor e livre para amar...”
(Ronaldo Bastos e Flávio Venturini)

**À minha Família:
meu ninho, meu lar, meu porto seguro, minha inspiração.**
“Dar o exemplo não é a melhor maneira de influenciar os outros. É a única.”
(Albert Schweitzer)

**Ao meu Orientador, Francisco Izidoro Sartor.
Em todos os momentos, amigo, pai e irmão.**
“Cria nos que têm experiência, aqueles que quiserem experimentar perigosamente.”
(Santo Agostinho)

Os méritos desse trabalho têm que ser compartilhados com pessoas que nos incentivaram e acreditaram que a amizade é, ainda, a mais bela das virtudes. Os meus eternos agradecimentos a todas elas, especialmente:

- Ao Professor Mauro Rodrigues de Oliveira (*In memoriam*) pela cordialidade e ensinamentos que foram fundamentais na elaboração desse trabalho;

- À Prof. Maria Angela Ornelas de Almeida, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, que abriu meus horizontes para a Pesquisa Científica;

- Aos Médicos Veterinários Residentes do Hospital Veterinário da Unoeste, Viviane von Ah Lopes, Gabriel Arantes Zanin, Fabíola Sangiorgio, Siha Fernandez Valente, Milena Palmeira Reis, Roberta Gil Pinto e Alessandra Aparecida Alça Alvares, pela ajuda na colheita e desenvolvimento do trabalho;

- Ao amigo-irmão Marconi Rodrigues de Farias, Médico Veterinário que ensinou os caminhos da clínica veterinária de animais de companhia e nas sugestões durante plano piloto do trabalho;

- Aos amigos Aristeu Vieira da Silva e Rogério Giuffrida, pela análise estatística e sugestões para apresentação dos resultados;

- Ao grande irmão Flávio de Araújo Ribeiro, pelo treinamento nas técnicas de Biologia Molecular e pela grande amizade.

- Ao Prof. João Pessoa de Araújo, do Laboratório de Virologia da Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, e ao Médico Veterinário Camilo Bulla, pelo processamento das amostras em Biologia Molecular;

- Ao amigo Lúcio Sacramento, pelo trabalho de arte gráfica;

- Aos funcionários do Hospital Veterinário e do Canil da Unoeste, pelo profissionalismo e dedicação aos animais durante o ensaio, especialmente Marcos Antonio Roberto, pela prontidão para auxiliar na contenção dos animais para colheita de amostras;

- Aos funcionários da Biblioteca da Unoeste, Presidente Prudente, especialmente de Roslaine Maria Bacetti Pereira, na pesquisa e comutação dos artigos científicos, e da Unesp, Botucatu, pela atenção sempre prestada, em particular a Rosimary Cristina da Silva pela revisão e adequação das citações bibliográficas;

- A todos os colegas de trabalho do Hospital Veterinário da Unoeste, pelo companheirismo e incentivo profissional, especialmente a Haroldo Alberti e Ana Maria Siqueira Webbe, pelo convívio alegre do dia-a-dia;

- Aos colegas do Curso de Pós-graduação, pela amizade e incentivo;

- Aos Professores Odilon Vidotto e Mara Regina Stipp Balarin, da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, e Professores Jane Megid e Márcio Garcia Ribeiro, da Unesp, Botucatu, pelas precisas e preciosas alterações, que com certeza, enriqueceram sobremaneira a versão final do trabalho .

- A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho e a quem eu peço desculpas aqui por, em um momento de esquecimento, deixar de lembrar seu nome. O cérebro pode ter falhado, mas o coração será eternamente grato à sua ajuda.

*Quando se caminha ao lado de um amigo,
um quilômetro tem dez passos.”
(Provérbio popular Russo)*

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS | 7 |
| LISTA DE QUADRO E TABELAS | 10 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 19 |
| 2.1 Agente Etiológico | 19 |
| 2.2 Histórico, Distribuição Geográfica e Epidemiologia | 20 |
| 2.3 Vias de Transmissão | 21 |
| 2.4 Fatores que predispõem à Infecção por <i>E. canis</i> | 22 |
| 2.5 Patogenia e Diagnóstico | 24 |
| 2.5.1 Patogenia e Achados Clínicos | 24 |
| 2.5.1.1 Fase Aguda | 24 |
| 2.5.1.2 Fase Subclínica | 26 |
| 2.5.1.3 Fase Crônica | 27 |
| 2.5.1.4 Outros Achados Clínicos..... | 29 |
| 2.5.2 Achados Hematológicos | 29 |
| 2.5.2.1 Fase Aguda | 29 |
| 2.5.2.2 Fase Subclínica | 32 |
| 2.5.2.3 Fase Crônica | 33 |
| 2.5.3 Diagnóstico Citológico | 34 |
| 2.5.4 Outras Técnicas Laboratoriais | 35 |
| 2.5.4.1 Cultivo Celular | 36 |
| 2.5.4.2 Imunodiagnóstico..... | 37 |
| 2.5.4.3 Biologia Molecular..... | 40 |
| 3 MATERIAL E MÉTODO | 42 |
| 3.1 Triagem dos Animais e Formação de Grupos | 42 |
| 3.2 Formação de Subgrupos | 44 |
| 3.3 Colheita e Acondicionamento das Amostras | 45 |

SUMÁRIO (Continuação)

| | |
|---|-----|
| 3.4 Exames Laboratoriais | 47 |
| 3.4.1 Hematologia | 47 |
| 3.4.1.1 Eritrograma..... | 47 |
| 3.4.1.2 Leucograma..... | 47 |
| 3.4.1.3 Contagem de Plaquetas..... | 47 |
| 3.4.1.4 Proteínas Plasmáticas Totais..... | 47 |
| 3.4.1.5 Fibrinogênio Plasmático..... | 48 |
| 3.4.1.6 Contagem de Reticulócitos..... | 48 |
| 3.4.2 Pesquisa de Hematozoários | 48 |
| 3.4.3 Técnica de Leuconcentração | 48 |
| 3.4.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) | 50 |
| 3.4.4.1 Extração do DNA..... | 50 |
| 3.4.4.2 Oligonucleotídeos Iniciadores (<i>Primers</i>)..... | 51 |
| 3.4.4.3 Preparo das Amostras para Amplificação do DNA..... | 51 |
| 3.4.4.4 Amplificação do DNA..... | 52 |
| 3.5 Análise Estatística | 53 |
| 4 RESULTADO E DISCUSSÃO | 54 |
| 4.1 Dados Epidemiológicos | 54 |
| 4.2 Achados Clínicos | 59 |
| 4.3 Achados Hematológicos | 65 |
| 4.4 Comparação e Validação de Técnicas | 84 |
| 5 CONCLUSÃO | 93 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |
| ANEXOS | 117 |
| RESUMO | 129 |
| ABSTRACT | 130 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Esfregaço de margem de orelha para pesquisa de hematozoários e mórulas de *Ehrlichia canis*. a. inserção de agulha na pina da orelha; b e c. obtenção de sangue com lâmina extensora; d. realização do esfregaço. Ilustração (esquerda) e foto (direita). Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 46
- Figura 2- Esfregaço a partir de sangue após centrifugação pela técnica de leucoconcentração para pesquisa de hematozoários e mórulas de *Ehrlichia canis* a. esmerilização do microcapilar com lâmina de vidro; b. local de quebra do microcapilar; d. disposição de leucoconcentrado sobre lâmina; material a ser utilizado no esfregaço. Ilustração (esquerda) e foto (direita). Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 49
- Figura 3- Ocorrência mensal de ehrlichiose canina em Presidente Prudente, São Paulo, entre janeiro de 2001 e dezembro de 2002..... 54
- Figura 4- Sinais clínicos relacionados com ehrlichiose canina. a. infestação por carrapatos; b. mucosa oral apresentando palidez; c. petéquias e equimoses na região prepucial; d. epistaxe bilateral; e. hemorragia na esclera.; f. hifema com descolamento de retina. Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 60
- Figura 5- Distribuição do número de hemácias ($/\mu\text{l}$ de sangue) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 71
- Figura 6- Distribuição da concentração de hemoglobina (g/dl) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 72

LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Figura 7- Distribuição do volume globular (%) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 73
- Figura 8- Distribuição da contagem plaquetária (/ μ l de sangue) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 75
- Figura 9- Distribuição da contagem do número total de leucócitos (/ μ l de sangue) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 78
- Figura 10- Distribuição das concentrações plasmáticas das proteínas totais (g/dl) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 80
- Figura 11- Agentes transmitidos por carrapatos observados em esfregaços sangüíneos de animais naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*: a. merozoítos de *Babesia canis* em eritrócitos; b. mórulas de *Anaplasma platys* em plaquetas; c. gametócito de *Hepatozoon canis* em neutrófilo. (Diff-quick. 1000X). d. gametócito de *Hepatozoon canis* em neutrófilo corado pelo Leishman para evidenciação do núcleo (1000X). Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 82

LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Figura 12- Resultado de *nested* PCR em gel de agarose, para *Ehrlichia canis* (*E. canis*) e *Anaplasma platys* (*A. platys*), em gel de agarose, revelada pelo brometo de etidium. Representação das colunas: 1. Biomarcador (em pares de base (bp). 2. Amostra negativa; 3. Amostra positiva para *E. canis*; 4. Amostra positiva para *E. canis*; 5. Amostra positiva para *A. platys*; 6. Amostra positiva para *A. platys*; 7. Amostra negativa; 8. Controle positivo para *E. canis*; 9. Controle negativo; ; 10. Controle negativo; 11. Controle positivo para *A. platys*. Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 83
- Figura 13- Estruturas de *Ehrlichia canis* observadas em esfregaços de sangue: a. corpúsculos iniciais em linfócito; b. mórula com corpúsculos condensados no interior de monócito; c. mórula com corpúsculos frouxos no interior de linfócito; d. mórula com corpúsculos de inclusão sendo liberados após ruptura de monócito (Diff-quick. 1000X)..... 87
- Figura 14- Alterações morfológicas observadas em esfregaços sangüíneos de animais infectados naturalmente por *Ehrlichia canis*: a. vacuolizações em monócitos; b. macroplaquetas; c. eritrofagocitose; d. leucofagocitose. (Diff-quick. 1000X). Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... 90

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Quadro 1- | Composição dos grupos e subgrupos de animais infectados e não infectados por <i>Ehrlichia canis</i> , de acordo com os resultados da pesquisa de mórulas, utilizando-se a PCR como padrão-ouro, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 45 |
| Tabela 1- | Distribuição das idades de cães infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e comparação entre animais considerados verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN), e suas respectivas frequências (%), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 56 |
| Tabela 2- | Distribuição das raças de cães infectados e não infectados (controle) por <i>Ehrlichia canis</i> , e suas respectivas frequências (%), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 57 |
| Tabela 3- | Achados epidemiológicos associados com ehrlichiose canina, verificados pela regressão logística ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 58 |
| Tabela 4- | Achados observados em cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e comparação da frequência em animais verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN), pelo teste exato de Fisher ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 59 |
| Tabela 5- | Média da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) \pm desvio-padrão de animais infectados e não infectados (controle) por <i>Ehrlichia canis</i> e comparação dos subgrupos verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) para a pesquisa de mórulas e a PCR, pelo teste exato de Fisher ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 61 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS (Continuação)

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 6- | Sinais hemorrágicos em cães infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e frequência (%) das hemorragias simples e múltiplas nos subgrupos verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 63 |
| Tabela 7- | Achados clínicos associados com ehrlichiose canina, verificados pela regressão logística ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 65 |
| Tabela 8- | Comparação dos resultados do hemograma, contagem plaquetária, proteínas plasmáticas totais (PPT) e fibrinogênio plasmático em cães infectados e não infectados (controle) por <i>Ehrlichia canis</i> , e valores normais de referência (Jain, 1993), pelo teste <i>t</i> de Student ou <i>u</i> de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisas de esfregaço de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 66 |
| Tabela 9- | Variáveis hematológicas e leucocitárias associadas ou não com ehrlichiose canina, pela análise de regressão logística ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 67 |
| Tabela 10- | Avaliação da ocorrência de anemia e trombocitopenia como marcadores de ehrlichiose frente aos resultados da PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003. Estimativa \pm erro-padrão (intervalo de confiança de 95%)..... | 68 |
| Tabela 11- | Achados hematológicos observados em cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e comparação da frequência em animais verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN), pelo teste exato de Fisher ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 69 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS (Continuação)

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 12- | Frequência (%) de co-infecção de agentes transmitidos por carrapatos entre cães considerados verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) para <i>Ehrlichia canis</i> , com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 81 |
| Tabela 13- | Comparação dos resultados obtidos nos esfregaços realizados com a técnica de leucoconcentração (LC), de sangue obtido da margem de orelha (MO) e de veia jugular (SP), para pesquisa de mórulas de <i>Ehrlichia canis</i> frente aos resultados da PCR. Estimativa \pm erro-padrão (intervalo de confiança de 95%). Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 85 |
| Tabela 14- | Resultados obtidos nos esfregaços de sangue realizados a partir de técnica de leucoconcentração (LC), e da margem de orelha (MO) e de sangue periférico (SP) em animais infectados por <i>Ehrlichia canis</i> para pesquisa de corpúsculos iniciais da rickettsia, em cães naturalmente infectados, frente aos resultados da PCR. Estimativa \pm erro-padrão (intervalo de confiança de 95%). Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 88 |
| Tabela 15- | Comparação dos resultados obtidos nos esfregaços realizados pela técnica de leucoconcentração (LC), e de sangue obtido da margem de orelha (MO) e da veia jugular (SP) para pesquisa de agentes transmitidos por carrapato, em animais naturalmente infectados, analisados pelo teste Q de Cochran ($\alpha=0,05$). Presidente Prudente, São Paulo, 2003..... | 89 |
| Tabela 16- | Comparação da frequência (%) de alterações morfológicas de células sangüíneas observadas em esfregaços confeccionados após leucoconcentração (LC), a partir de sangue de margem de orelha (MO) e de sangue periférico (SP) de animais infectados naturalmente por <i>Ehrlichia canis</i> , pelo teste Q de Cochran ($\alpha=0,05$). Presidente Prudente, São Paulo, Brasil, 2003..... | 91 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | | |
|------------------------------|---|---|
| β | = | valor da estatística da regressão logística |
| $^{\circ}\text{C}$ | = | grau Celsius |
| $^{\circ}$ | = | Marca Registrada |
| κ | = | valor de associação kappa |
| μl | = | microlitro |
| μm | = | micrometro |
| μmol | = | micromol |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | = | sulfato de amônia |
| bp | = | pares de base |
| CHCM | = | concentração de hemoglobina corpuscular média |
| CRN | = | concordância de resultados negativos |
| CRP | = | concordância de resultados positivos |
| dATP | = | desoxiadenosina trifosfato |
| dCTP | = | desoxicitidina trifosfato |
| dGTP | = | desoxiguanosina trifosfato |
| dl | = | decilitro |
| DNA | = | ácido desoxiribonucléico |
| dTTP | = | desoxitimidina trifosfato |
| EDTA | = | ácido etilenodiaminotetrácetico |
| ELISA | = | ensaio imunoenzimático de imunoadsorção |
| EP | = | erro-padrão |
| fl | = | fentolitro |
| FP | = | falso(s)-positivo(s) |
| FV | = | falso(s)-negativo(s) |
| g | = | grama |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS (Continuação)

| | | |
|-------------------|---|--|
| <i>g</i> | = | gravidade padrão |
| g/dl | = | grama por decilitro |
| HCl | = | ácido clorídrico |
| HCM | = | hemoglobina corpuscular média |
| Ig | = | imunoglobulina |
| IL | = | interleucina |
| KCl | = | cloreto de potássio |
| l | = | litro |
| mg/dl | = | miligrama por decilitro |
| MgCl ₂ | = | cloreto de magnésio |
| ml | = | mililitro |
| mm | = | milímetro |
| mmol | = | milimol |
| PCR | = | reação em cadeia de polimerase |
| pg | = | picograma |
| pH | = | potencial de hidrogênio |
| pmol | = | picomol |
| Q | = | teste Q de Cochran |
| r.p.m. | = | rotações por minuto |
| RIFI | = | reação de imunofluorescência indireta |
| rMAP | = | proteína antigênica principal recombinante |
| SD | = | desvio-padrão |
| t | = | teste t de Student |
| Taq | = | <i>Thermus aquaticus</i> |
| ™ | = | Trade Market (Marca Registrada) |
| TNF- α | = | fator de necrose tumoral alfa |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS (Continuação)

| | |
|-----|-----------------------------|
| u | = teste U de Mann-Whitney |
| U | = unidade |
| VCM | = volume corpuscular médio |
| VN | = verdadeiro(s)-negativo(s) |
| VP | = verdadeiro(s)-positivo(s) |
| VPN | = valor preditivo negativo |
| VPP | = valor preditivo positivo |
| WI | = western immunoblot |

1 INTRODUÇÃO

Na última década, a ehrlichiose tem sido identificada como causa crescente de morbi-mortalidade de caninos e, em alguns países, do homem, em virtude da maior exposição a locais onde é comum a presença de carrapatos (ENG & GILES, 1989; DUMLER & BAKKEN, 1998; WALKER & DUMLER, 1996; ROBERTS & SOAVE, 1997). No Brasil, a doença é considerada enzoótica, conforme estimativa de Morais et al. (2002) e dados recentes obtidos por Labarthe et al. (2003) e Bulla (2003).

A ehrlichiose canina é causada por um cocobacilo Gram-negativo obrigatório de células mononucleares do sangue, a rickettsia *Ehrlichia canis* (*E. canis*). Nestas células, o agente sofre fissão binária formando estruturas conhecidas como corpúsculos iniciais e mórulas (CAMPBELL, 1994; STILES, 2000).

O período de incubação da doença varia de 8 a 15 dias para os casos agudos ou de meses ou anos nos cursos crônicos, que geralmente são fatais. Entre as fases aguda e crônica, ocorre um período no qual não existem alterações fisiológicas perceptíveis ao exame clínico denominado de fase subclínica, que pode durar anos até que a doença evolua para a cronicidade (WOODY & HOSKINS, 1991).

Além do período variável de incubação, os achados clínicos e hematológicos apresentados pelos animais são inespecíficos e caracterizados por uma síndrome variável que pode ser semelhante a diversas doenças metabólicas e infecciosas, dificultando o diagnóstico clínico (KAKOMA et al., 2000).

O diagnóstico definitivo de ehrlichiose pode ser realizado pela análise citológica de amostras de sangue para pesquisa de mórulas ou corpúsculos iniciais de *E. canis*. Embora apresente baixa sensibilidade (WOODY & HOSKINS, 1991), essa técnica é uma boa opção em áreas enzoóticas, especialmente para os clínicos veterinários que necessitam de um resultado rápido (ELIAS, 1991).

Algumas técnicas laboratoriais mostram alta sensibilidade para diagnóstico de *E. canis*, mas esbarram em problemas que dificultam a sua utilização na rotina das clínicas. O principal deles é o alto custo para sua realização, com necessidade de equipamentos sofisticados e pessoal treinado (KAKOMA et al., 2000; BULLA, 2003).

Outros entraves que limitam a utilização dessas técnicas são a possibilidade de resultados falsos-positivos, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imunoadsorância enzimática (ELISA). Algumas delas consomem tempo para processamento das amostras, como é o caso da reação em cadeia de polimerase (PCR) e do western immunoblot (WI). Em relação ao método de cultura *in vitro*, a rickettsia requer vários dias para se replicar em cultivo, tornando a técnica bastante morosa para que o laboratorista possa chegar a um resultado em tempo hábil para o tratamento (KAKOMA et al., 2000). Considera-se ainda que não existe uma padronização internacional para diagnóstico da ehrlichiose e que o desenvolvimento de novas técnicas, com baixos custos operacionais e de fácil execução pelo clínico, seria importante para a constatação da doença em sua fase inicial, aumentando as chances de tratamento e cura dos animais.

Embora as alterações clínicas e hematológicas sejam insuficientes para definir o diagnóstico de ehrlichiose, elas são indispensáveis para avaliação da fase da doença na qual o animal se encontra, possibilitando a adequação do tratamento e um prognóstico mais seguro (ELIAS, 1991; IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 1999; KAKOMA et al., 2000; WANER et al., 2001). Essas informações, juntamente com a realização de um teste barato e não laborioso, seriam uma forma de manter a qualidade do diagnóstico e diminuir gastos (BULLA, 2003).

Seguindo essa linha de raciocínio, o ensaio foi conduzido para obtenção dos seguintes propósitos:

1. Objetivos Gerais:

- Estudar a epidemiologia e os aspectos clínicos e hematológicos de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e comparar técnicas para o diagnóstico da rickettsia.

2. Objetivos Específicos:

- Estudar a ocorrência mensal da ehrlichiose canina no município de Presidente Prudente.

- Correlacionar dados epidemiológicos que possam estar associados com a infecção por *E. canis*. Da mesma maneira, verificar os sinais clínicos e achados hematológicos relacionados à ehrlichiose.

- Avaliar alterações clínicas e laboratoriais que seriam úteis para classificar a fase da ehrlichiose nos animais.

- Comparar as técnicas de leucoconcentração em tubo microcapilar, do esfregaço confeccionado com sangue venojugular e do esfregaço de sangue de margem de orelha para a pesquisa de mórulas de *E. canis*.

- Validar as técnicas citológicas, estimando-se a sua sensibilidade, especificidade, valores preditivos e eficiência, utilizando-se a PCR como teste padrão-ouro.

- Avaliar se a associação de achados clínicos e/ou laboratoriais pelo cálculo da sensibilidade paralela pode ser empregado no diagnóstico da ehrlichiose canina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Ehrlichiose canina é uma doença comumente referida à infecção de cães domésticos pela rickettsia *Ehrlichia canis* (WOODY & HOSKINS, 1991). *E. canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935) pertence à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Ehrlichia*, e é um cocobacilo Gram-negativo obrigatório de células mononucleares do sangue (DUMLER et al., 2001).

A primeira fase do ciclo de *Ehrlichia* é caracterizada pela penetração de corpúsculos elementares em células mononucleares (DAVOUST, 1993). Posteriormente, ocorre a multiplicação da rickettsia dentro do fagossomo de células mononucleares, onde se desenvolve em mais dois estágios: corpúsculos iniciais e mórulas (McDADE, 1989). Segundo os autores, os corpúsculos elementares são fagocitados por leucócitos mononucleares mas a fusão fagossomo-lisossomo não ocorre em células infectadas, permitindo assim a sua divisão.

Em cultivo celular, Nyindo et al. (1971) verificaram a presença de corpúsculos elementares de *E. canis* em monócitos após 48 horas de incubação. De acordo com Davoust (1993), essas inclusões podem variar de 0,2 a 0,6 μm de diâmetro. Com dois a três dias de incubação, os corpúsculos elementares, aumentam em número e se agrupam formando inclusões denominadas corpúsculos iniciais. Essas estruturas são caracterizadas por grânulos subsféricos de coloração rósea a púrpura medindo de 0,4 a 2,0 μm . Nos sete a 12 dias subseqüentes, ocorre a multiplicação dos corpúsculos e formação de mórulas (NYINDO et al., 1971; SIMPSON, 1972), sendo possível a detecção de pequena quantidade após sessenta horas de incubação (STEPHENSON & OSTERMAN, 1977).

As mórulas são estruturas com coloração idêntica àquela dos corpúsculos iniciais e são constituídas por um a três vacúolos de membrana simples contendo de um a quarenta corpúsculos elementares, que podem estar compactos ou difusos em seu interior (HUXSOLL et al., 1970; DAVOUST, 1993; BEAUFILS et al., 1995).

Popov et al. (1998) verificaram que mórulas de *E. canis* podem variar de 2,0 a 4,0 µm de diâmetro. Após 12 a 18 dias de incubação, elas se dissociam do citoplasma (NYINDO et al., 1971), liberando corpúsculos iniciais ao se romperem, que infectarão outras células (CAMPBELL, 1994).

2.2 HISTÓRICO, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA

O primeiro caso de ehrlichiose canina, foi descrito na Argélia, por Donatien & Lestoquard (1935). A doença ganhou notoriedade devido à infecção e morte de cães do exército americano durante a guerra do Vietnã, quando ficou conhecida como Pancitopenia Tropical Canina (HUXSOLL et al., 1970; WALKER et al., 1970). Entretanto, passou a ser mais pesquisada quando *E. canis* foi relacionada com a infecção em humanos, em 1987, nos Estados Unidos (DUMLER & BAKKEN, 1998).

Atualmente, a doença tem sido descrita em todos os continentes (WANER et al., 1996) e é reconhecida como ehrlichiose canina ou ehrlichiose monocítica canina (HARRUS et al., 1997; NEER, 1998).

O caráter cosmopolita da ehrlichiose canina está diretamente relacionado com a distribuição geográfica do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o principal vetor de *E. canis* (KEEFE et al., 1982). Consequentemente, a doença ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais, nas quais as condições ambientais para o desenvolvimento do artrópodo são bastante favoráveis (IQBAL et al., 1994).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em Belo Horizonte, MG, com a observação de inclusão da rickettsia em linfócito (COSTA et al., 1973). Registros de ehrlichiose canina têm sido realizados em outras cidades como Rio de Janeiro, RJ (CARRILO et al., 1976); Santa Maria (SILVA et al., 1985) e Porto Alegre (SEIBERT et al., 1997), RS; Curitiba, Pr (KAVINSKI et al., 1988 apud ALMOSNY,

1998); Campo Grande, MS (MUNHÓZ & BABO, 1998) e Botucatu, SP (HASEGAWA et al., 1997; BULLA et al., 2000).

Morais et al., em 2002, estimaram a prevalência da doença ao redor de 20,0% nos estados do Paraná, Bahia, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Ceará, Alagoas, Pernambuco, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Um ano mais tarde, Labarthe et al. (2003), em um inquérito com 2.533 cães destes estados, detectaram a presença de 19,8% de amostras sororeagentes a *E. canis*, confirmando a estimativa daqueles autores.

Bulla (2003) em estudo retrospectivo em Botucatu, São Paulo, com 246 amostras de sangue analisadas pela PCR, verificou que 30,9% continham material genético de *E. canis*. O autor considerou a cidade como área enzoótica para a ehrlichiose canina, uma vez que as condições climáticas foram favoráveis à manutenção de *R. sanguineus* durante todo o ano.

Em alguns países, a incidência de ehrlichiose é maior nos meses mais quentes do ano, como foi observado por Davoust et al. (1990), na França, e por Keysary et al. (1996) e Harrus et al. (1997), em Israel. Keefe et al. (1982) consideraram que o stress calórico pode ser a causa para o surgimento de quadros epizoóticos de ehrlichiose nos meses quentes do ano, como aqueles observados por Walker et al. (1970), no Vietnã, e por Stephenson & Ristic (1978), no Arizona, Estados Unidos.

2.3 VIAS DE TRANSMISSÃO

Segundo Groves et al. (1975), a transmissão da rickettsia entre carrapatos ocorre de forma transestadial sem que haja passagem transovariana. Este fato foi confirmado por Smith et al. (1976), observando que após ingestão de sangue de um animal infectado, ocorre multiplicação de *E. canis* em glândulas salivares e células intestinais de *R. sanguineus*. Em contrapartida, não foi encontrada nenhuma estrutura da bactéria nos ovários do artrópodo, pelos autores.

Entre animais, o principal mecanismo de infecção natural se dá pela picada do *R. sanguineus*, qualquer que seja o seu estágio (EWING & BUCKNER, 1965).

Lewis Jr. et al. (1977) verificaram que após infectar-se, um carrapato é capaz de transmitir o agente por até 155 dias.

Davoust (1993) observou que transfusões sanguíneas e inoculações experimentais são vias de infecção da rickettsia para os cães.

A passagem de *E. canis* para o carrapato ocorre duas a três semanas após o cão ser inoculado com a rickettsia (WOODY & HOSKINS, 1991). Segundo os autores, esse fato ocorre por causa da maior frequência de leucócitos infectados em animais em fase aguda da doença. Nos cães crônicos, é pouco provável a transmissão do agente para o seu vetor biológico (LEWIS Jr. et al., 1977).

2.4 FATORES QUE PREDISPÕEM À INFECÇÃO POR *E. canis*

Os fatores que afetam a severidade clínica e progressão da doença podem estar ligados à raça do animal, às diferenças individuais na resposta imune, à carga infectante, à patogenicidade da linhagem (RIKIHISA, 1991), à idade e também à ocorrência de doença concomitante (WOODY & HOSKINS, 1991).

Em cães naturalmente infectados, Thirunavukkarasu et al. (1993) constataram que a doença foi mais freqüente em animais de raça definida (73,44%), especialmente os pastores alemães, fato corroborado por Harrus et al. (1997), ao estudarem cem animais com ehrlichiose, mediante titulação de anticorpos. Frank & Breitschwerdt (1999) embora tenham verificado 72% dos casos da enfermidade em cães com definição racial, não notaram diferença na frequência das raças. No estudo realizado por Seamer & Snape (1970), os cães sem definição racial foram menos suscetíveis à infecção por *E. canis*.

Nyindo et al. (1980) observaram, mediante infecção experimental, que cães Pastores Alemães desenvolveram uma fase crônica mais severa em relação àqueles da raça Beagle, considerando-os mais suscetíveis à infecção por *E. canis*. Segundo os autores, as diferenças na expressão de sinais clínicos entre raças parece estar relacionada com a capacidade do animal em montar adequadamente uma resposta imunomediada por células, o que foi mais tarde confirmado por Reardon & Pierce (1981) ao estudarem a resposta linforreticular em animais imunossuprimidos.

Em relação à idade, Thirunavukkarasu et al. (1993) verificaram ehrlichiose com maior frequência em animais com menos de um ano, e Cocco et al. (2003), naqueles que apresentavam entre um e cinco anos. Contudo, Harrus et al. (1997) e Frank & Breitschwerdt (1999) não constataram diferença significativa entre as diversas faixas etárias dos animais infectados.

No que se refere ao sexo dos cães, a literatura não refere que exista maior predisposição sexual para infecção por *E. canis* (STEPHENSON & RISTIC, 1978; WADDLE & LITTMAN, 1988; THIRUNAVUKKARASU et al., 1993; HARRUS et al., 1997; FRANK & BREITSCHWERDT, 1999). Entretanto, Nims et al. (1970) observaram que 90% dos animais acometidos em um surto epizootico de ehrlichiose eram machos.

A infecção concorrente de cães por *E. canis* e outros agentes transmitidos por carrapatos pode agravar o quadro clínico do animal (Du PLEISS et al., 1990). As co-infecções mais comuns ocorrem por *Ehrlichia platys*, reclassificada como *Anaplasma platys* (*A. platys*) (HUA et al., 2000), *Babesia canis* (*B. canis*) (EWING & BUCKNER, 1965; VAN HEERDEN & IMMELMAN, 1979; PRICE et al., 1987; Du PLEISS et al., 1990; KLAG et al., 1991; MATTHEWMAN et al., 1993a; KORDICK et al., 1999), *Hepatozoon canis* (*H. canis*) (GOSSETT et al., 1985; LATHA &

JOSEPH, 1994) e também de forma múltipla por *B. canis* e *H. canis* ou *A. platys* (*Ehrlichia platys*) (KONTOS & KOUTINAS, 1997; KORDICK et al., 1999).

2.5 PATOGENIA E DIAGNÓSTICO

2.5.1 PATOGENIA E ACHADOS CLÍNICOS

Em animais naturalmente infectados, é difícil definir a fase da doença em que se encontra o animal (NEER, 1998) uma vez que a apresentação clínica e os achados laboratoriais são bastante similares (WADDLE & LITTMAN, 1988) e a duração e severidade dos sinais clínicos são variáveis (HUXSOLL et al., 1972).

A ehrlichiose é considerada uma síndrome altamente variável em suas alterações clínicas e hematológicas, mimetizando doenças metabólicas e infecciosas (KAKOMA et al., 2000), como trombocitopenia auto-imune idiopática ou secundária, doenças causadas por hematozoários, lúpus eritematoso sistêmico, leucemia, coagulopatia intravascular disseminada, neoplasia esplênica e esplenite, entre outras, o que dificulta também seu diagnóstico diferencial (HARRUS et al., 1999).

O período de incubação da ehrlichiose canina varia de uma a três semanas e a doença pode apresentar três fases, de acordo com as alterações clínicas e hematológicas: aguda, subclínica e crônica (PRICE et al., 1987).

2.5.1.1 FASE AGUDA

Na fase aguda, que dura de duas a quatro semanas, o agente se multiplica em leucócitos mononucleares, disseminando-se para órgãos como fígado, baço e

linfonodos (NEER, 1998). Nesse período, é mais comum a detecção de mórulas de *E. canis* em esfregaços de sangue e a presença de carrapatos nos animais (WALKER et al., 1970).

Da infecção ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos, existe uma grande variação de tempo. Em animais experimentalmente infectados, Huxsoll et al. (1972), Pierce et al. (1977) e Castro (1997) observaram as primeiras alterações entre o 10^o e 14^o dias. Keysary et al. (1996) e Harrus et al. (1996a), verificaram-nas exatamente no 15^o dia, ao passo que Nyindo et al. (1980) entre 12 a 17 dias pós-infecção.

Os principais achados clínicos na fase aguda são febre, anorexia, emaciação, letargia e apatia (HUXSOLL et al., 1969; WALKER et al., 1970; HUXSOLL et al., 1972; LOVERING et al., 1980; HARRUS et al., 1996a; HARRUS et al., 1997; ALMOSNY, 1998; FRANK & BREITSCHWERDT, 1999). Os sinais refletem alterações conseqüentes da resposta de fase aguda, com a liberação da interleucina 1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelo sistema imunológico (TIZARD, 2000).

Castro (1997) constatou aumento significativo na temperatura retal de cães infectados em relação ao grupo controle, até duas semanas pós-infecção, fato também observado por Harrus et al. (1996a), Almosny (1998) e Waner et al. (2000b).

Smith et al. (1974) registraram que a fase febril pode durar até três semanas e meia após os animais terem sido infectados, contudo Walker et al. (1970) consideraram que a persistência de febre por mais que três semanas é pouco freqüente.

Em relação à anorexia e perda de peso, estes últimos pesquisadores observaram animais acometidos por ehrlichiose que perderam até 6,8 kg de peso em sete dias. Segundo Allsopp & Allsopp (2001), anorexia e debilidade generalizada podem ser sugestivas de ehrlichiose quando não existem outros sinais da doença.

Hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia registradas em animais infectados são consideradas conseqüência da multiplicação do agente e da hiperplasia linforreticular de órgãos linfóides (WALKER et al., 1970; CASTRO, 1997; HARRUS et al., 1997; ALMOSNY, 1998).

Harrus et al. (1998c), ao estudarem a função do baço em cães infectados experimentalmente, observaram que os animais com baço responderam muito mais intensamente à infecção em relação àqueles esplenectomizados. Os autores sugerem que o órgão desempenha um dos principais papéis na patogenia da ehrlichiose, com esplenite linfoplasmática e liberação de mediadores inflamatórios.

Kuehn & Gaunt (1985), em 56 animais com infecção natural, observaram depressão, letargia, emaciação, hemorragias, linfadenomegalia e anorexia como principais achados clínicos, considerando-os como de caráter moderado.

Price et al. (1987) detectaram, em 373 cães, emaciação, febre, depressão, anorexia, vômito, esplenomegalia e palidez de mucosas como achados clínicos em animais em fase aguda. Este último achado foi freqüente também nos animais estudados por Harrus et al. (1997) e Castro (1997).

No trabalho de Munhóz & Babo (1998), realizado na cidade de Campo Grande, MS, as principais alterações em 227 cães considerados em fase aguda de ehrlichiose foram mucosas pálidas e febre, com diagnóstico baseado nos achados clínicos e/ou de inclusões de *E. canis*. Com os mesmos critérios, Thirunavukkarasu et al. (1993) reportaram febre e anorexia como alterações mais comuns em 64 cães.

Animais imunocompetentes geralmente respondem à infecção ou tornam-se portadores assintomáticos do agente (NEER, 1998), caracterizando a fase subclínica da doença.

2.5.1.2 FASE SUBCLÍNICA

A fase subclínica começa de 40 a 120 dias após a infecção e dura aproximadamente de seis a nove semanas (WOODY & HOSKINS, 1991), podendo persistir por quatro a cinco anos em áreas enzoóticas (CODNER & FARRIS-SMITH, 1986; WANER et al., 1997).

Embora os animais geralmente não apresentem sinais clínicos nessa fase, Price et al. (1987) consideraram que em alguns casos pode-se observar emaciação, apetite seletivo e letargia intermitente.

Segundo Woody & Hoskins (1991), se um cão é imunocompetente, ele é capaz de eliminar o agente. Caso contrário, a doença pode evoluir para a fase crônica.

2.5.1.3 FASE CRÔNICA

Na fase crônica, que pode ocorrer meses ou até 4 a 5 anos após infecção, a doença pode ser moderada, com os sinais da fase aguda reaparecendo de forma atenuada, ou recorrer com maior severidade, podendo levar o animal a óbito (WOODY & HOSKINS, 1991; MATTHEWMAN et al., 1993a).

Os sinais clínicos da ehrlichiose crônica são semelhantes aos de uma doença imunomediada (TROY & FORRESTER, 1990). Os animais encontram-se caquéticos, apáticos e com suscetibilidade às infecções secundárias em virtude do comprometimento imunológico (WOODY & HOSKINS, 1991).

Nessa fase, são comuns os distúrbios hemostáticos, as oftalmopatias e nefropatias (NEER, 1998), em decorrência de trombocitopenia, disfunção plaquetária, vasculite (CODNER et al., 1985), alteração da pressão oncótica (HARRUS et al., 1998b) ou deposição de imunocomplexos (PEDERSEN, 1999; HARRUS et al., 2001a).

Segundo Green (1983), petéquias e equimoses são observadas quando a contagem de plaquetas é inferior a 40.000/ μ L. Nos casos de ehrlichiose, quando os

valores plaquetários encontram-se abaixo de 20.000/ μ L, são observados sinais como epistaxe, hematúria ou hemorragias do trato gastrintestinal (STEPHENSON & RISTIC, 1978). Porém, Troy et al. (1980) não observaram sinal de hemorragia em um cão infectado naturalmente por *E. canis*, cuja contagem foi inferior a 7.000/ μ L.

Woody & Hoskins (1991), compilando estudos realizados nos Estados Unidos, com um total de 248 cães naturalmente infectados, constataram que 46% apresentavam tendência a hemorragias. Epistaxe foi o sinal mais comum, como observado também por Huxsoll et al. (1970), Walker et al. (1970), Harvey et al. (1979), Price et al. (1987), Harrus et al. (1997) e Munhóz & Babo (1998). Na opinião de Huxsoll et al. (1972), um quadro súbito de epistaxe é o sinal clínico mais evidente de ehrlichiose, levando o animal a óbito poucos dias após início da rinorragia.

Outros sinais de hemorragias segundo a revisão de Woody & Hoskins (1991) foram petéquias, equimoses, melena e sangramento prolongado em locais de punção venosa. Hematúria, hifema, hemorragia retinal, hemoptise e hematemese foram menos freqüentes. Price et al. (1987), Thirunavukkarasu et al. (1994), Harrus et al. (1997) e Munhóz & Babo (1998) observaram, em animais naturalmente infectados, sinais de distúrbios hemostáticos semelhantes aos apresentados pelos cães utilizados para realização dos estudos americanos.

Segundo Harrus et al. (1998b), hifema, hemorragia retinal e descolamento de retina são os achados mais comuns relacionados com as oftalmopatias. Pela ultrassonografia com *Doppler*, Gould et al. (2000), relataram um caso onde ocorreu descolamento da retina e hemorragia intraocular bilateral, que foi atribuída a estase das veias orbitais. Em contrapartida, Panciera et al. (2001), em um estudo anatomohistopatológico em animais infectados experimentalmente por *E. canis*, *E. chaffeensis* e o agente da ehrlichiose granulocítica humana, verificaram que as lesões oculares foram diagnosticadas apenas nos animais infectados por *E. canis* e que

a inflamação ocorreu mais intensamente no corpo ciliar e de forma menos intensa na coróide, íris e retina.

2.5.1.4 OUTROS ACHADOS CLÍNICOS

Outros achados menos freqüentes associados à infecção por *E. canis* e reportados na literatura são: vômito (WADDLE & LITTMAN, 1988; HARRUS et al., 1997), murmúrio cardíaco (WADDLE & LITTMAN, 1988), icterícia (KEYSARY et al., 1996; HARRUS et al., 1997), edema (HILDEBRANDT et al., 1973; PIERCE et al., 1977), piodermite profunda (CERUNDOLO et al., 1998) e alopecia (CASTRO, 1997). Poliartrite (BELLAH et al., 1986; THILAGAR et al., 1990), tetraparesia associada à polimiosite (BUORO et al., 1990), convulsões (MEINKOTH et al., 1989), encefalite e meningite (FIRNEISZ et al., 1990; MUNÃNA, 1996), e glomerulonefrite, têm sido atribuídas à deposição de imunocomplexos e infiltrado plasmocitário (HILDEBRANDT et al., 1973; WADDLE & LITTMAN, 1988).

2.5.2 ACHADOS HEMATOLÓGICOS

2.5.2.1 FASE AGUDA

Na fase aguda da ehrlichiose existe aumento no seqüestro e destruição de células sanguíneas que resulta em pancitopenia transitória, uma vez que a medula

óssea mantém suas funções normais (BUHLES Jr. et al., 1975; PRICE et al., 1987; WADDLE & LITTMAN, 1988).

A trombocitopenia é a principal alteração hematológica nos cães com ehrlichiose, qualquer que seja a fase da doença, segundo Woody & Hoskins (1991), Harrus et al. (1996b) e Keysary et al. (1996). Em um estudo com 987 cães com trombocitopenia, 23% tinham causa inflamatória ou infecciosa (GRINDEM et al., 2002). Entre as causas infecciosas, segundo opinião de Meyer & Harvey (1998), a ehrlichiose é a enfermidade que mais ocasiona a diminuição de plaquetas em cães.

A frequência de trombocitopenia em animais com ehrlichiose é considerada muito alta (NEER, 1998). Troy et al. (1980) verificaram essa alteração em 100% dos animais naturalmente infectados, ao passo que Bulla (2003) constatou que 98,5% dos cães positivos para *E. canis* pela PCR tinham contagem plaquetária abaixo dos valores de referência.

Davoust et al. (1991) estimaram que a trombocitopenia possui, respectivamente, valores preditivos positivos e negativos de 75,0% e 94,0%, com sensibilidade de 85,7% e especificidade de 88,8% para diagnóstico de ehrlichiose canina.

Em trabalhos experimentais, observou-se uma redução gradativa na contagem plaquetária a partir do terceiro dia pós-infecção, atingindo valores inferiores a 73,7% (WANER et al., 2000b) e 78,0% (PIERCE et al., 1977) do volume inicial nos dez primeiros dias, com intensa queda até o 16^o dia. Harrus et al. (1996b) e Castro (1997), entretanto, constataram as menores contagens plaquetárias na terceira semana após a infecção.

A presença de macroplaquetas em esfregaços de sangue de animais trombocitopênicos foi verificada por Smith et al., 1974, Pierce et al., 1977 e por Kuehn & Gaunt, 1985. Segundo Pedersen (1999), quando a contagem plaquetária é inferior a 60.000/ μ L de sangue, estes elementos possuem maior tamanho e forma bizarra.

Na fase aguda da ehrlichiose, a trombocitopenia tem sido associada a trombocitopatias funcionais como consumo plaquetário (SMITH et al., 1975); redução da meia vida (SMITH et al., 1975; PIERCE et al., 1977), da adesão (LOVERING et al., 1980) e da agregação das plaquetas (HARRUS et al., 1996b; VARELA et al., 1997; HARRUS et al., 2001a). Pode haver ainda inibição do fator 3 (PIERCE et al., 1977), um fosfolípídeo de membrana com atividade pró-coagulante liberado após agregação ou lise da plaqueta, que se liga aos fatores V, VIII e X, acelerando a formação de trombina (GOPEGUI & FELDMAN, 1998).

Mecanismos imunomediados como o desencadeamento de resposta imune (WANER et al., 2000b) com aumento da destruição plaquetária no baço (SMITH et al., 1974), destruição de plaquetas por linfócitos ativados (KAKOMA et al., 1980 apud CASTRO, 1997) e produção de anticorpos anti-plaquetas (WANER et al., 1995) também têm sido apontados como causas da redução do volume destes elementos do sangue.

Outros achados freqüentes na fase aguda são anemia e leucopenia transitória (WOODY & HOSKINS, 1991), provavelmente devido ao seqüestro e destruição de células sangüíneas como resposta inflamatória em resposta à infecção por *E. canis* (BUHLES Jr. et al., 1975; PRICE et al., 1987). Na opinião de Van Heerden & Immelman (1979), contudo, o achado de trombocitopenia e leucopenia é indicativo de ehrlichiose canina.

Hibbler et al. (1986) observaram uma leucopenia moderada entre a terceira e quarta semanas pós-infecção que tende a desaparecer, com surgimento de leucocitose e monocitose. A citotoxicidade mediada por linfócitos contra monócitos (KAKOMA, 1977) e plaquetas (KAKOMA et al., 1980 apud Castro, 1977) podem contribuir para a patogenia. Frank & Breitschwerdt (1999) observaram uma alteração da resposta imune em animais com ehrlichiose provavelmente como decorrência de

inversão na relação dos linfócitos CD4 e CD8, que poderiam predispor-los a infecções concorrentes, sepsis ou disseminação de uma infecção localizada.

Achados laboratoriais compatíveis com anemia arregenerativa moderada foram detectados após dez dias de infecção por Keysary et al. (1996), que verificaram ainda, uma leucopenia transitória em todos os cães utilizados no experimento. Esta alteração também foi descrita por Huxsoll et al. (1972) e Buhles Jr. et al. (1975), no mesmo período.

Outro achado observado nos casos agudos de ehrlichiose é a hiperproteinemia, decorrente da elevação de gamaglobulinas (HOSKINS et al., 1983; PERILLE & MATUS, 1991; RIKIHISA et al., 1994; MICHELS et al., 1995; HARRUS et al., 1996a), em resposta ao estímulo antigênico e/ou uma hipersensibilização ocasionada pela *Ehrlichia* circulante (BURGHEN et al., 1971).

Rikihisa et al. (1994) descreveram a glicoproteína- α 1 e proteína C-reativa (CRP) como as principais proteínas de fase aguda produzidas na ehrlichiose. Shimada et al. (2002), verificaram picos da concentração de CRP entre 15 e 42 dias após infecção experimental em beagles. A partir do 42^o dia, ocorreu uma rápida redução dos seus níveis, no plasma dos animais.

Estudando a cinética de anticorpos em resposta a *E. canis* em cães infectados experimentalmente, Weisiger et al. (1975) constataram que durante os primeiros sete dias após inoculação nos animais houve predominância nos títulos de imunoglobulinas da classe A (IgA) e M (IgM); porém, a hiperproteinemia foi observada depois do aumento gradativo de IgG. Harrus et al. (2001b) verificaram que a produção de IgG de subclasse II é predominante na fase aguda de ehrlichiose tanto em animais infectados naturalmente quanto naqueles em que a doença foi induzida.

2.5.2.2 FASE SUBCLÍNICA

Na fase subclínica, as alterações hematológicas são semelhantes às aquelas ocorridas na fase aguda mas existe uma tendência para a hipoplasia medular.

Em dez cães naturalmente infectados, Codner & Farris-Smith (1986) verificaram que as alterações observadas em animais, nessa fase, foram trombocitopenia, linfocitose, neutropenia e hiperglobulinemia. Valendo-se da infecção experimental de nove cães da raça beagle, Waner et al. (1997) observaram como principais alterações: redução do número de plaquetas, com aumento do seu tamanho, e redução da contagem leucocitária e neutrofílica mas sem que os valores chegassem aos limites inferiores aos estabelecidos como de referência pela literatura.

2.5.2.3 FASE CRÔNICA

Na fase crônica, as alterações hematológicas são semelhantes às aquelas da fase aguda. Anemia e trombocitopenia são achados comuns (WADDLE & LITTMAN, 1988). A pancitopenia comumente registrada nos cães em fase crônica, é consequência da hipoplasia da medula óssea., segundo Smith et al. (1974); Buhles Jr. et al. (1975); Price et al. (1987) e Harrus et al. (1999).

Segundo Buhles Jr. et al. (1975), a hipoplasia medular dos animais em fase crônica pode ser originada da infecção das células-tronco, as *stem cells*, por *E. canis*, que interferiria no metabolismo ou proliferação celular. Os autores verificaram que nos casos crônicos severos, a hipoplasia medular foi consequência de anemia aplástica e que nos animais com pancitopenia em casos crônicos graves o prognóstico é mais reservado, pois não existe resposta ao tratamento e a evolução do quadro é para o óbito.

Outro fator que poderia contribuir para a lesão medular seria a presença de grande número de células com características de linfócitos T citotóxicos e de células *natural killer* presentes na circulação e que atingiriam a medula óssea (WEISER et al., 1991).

Em relação às proteínas plasmáticas, nos casos crônicos moderados é comum a detecção de hiperproteinemia por hipergamaglobulinemia, como consequência de uma resposta imune aos componentes celulares danificados (BURGHEN et al., 1971). Porém, Harrus et al. (1996a) verificaram que as concentrações de gamaglobulinas em animais pancitopênicos foram significativamente inferiores às obtidas em cães sem pancitopenia. Segundo estes autores, a combinação de hipogamaglobulinemia e neutropenia tornam os animais em pancitopenia mais suscetíveis às infecções secundárias, que podem resultar em complicações e em um prognóstico reservado.

2.5.3 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

A citologia, a partir do esfregaço de sangue, é considerada como diagnóstico definitivo para ehrlichiose e se fundamenta na identificação de mórulas de *E. canis* em monócitos (VAN HEERDEN & IMMELMAN, 1979; THILAGAR et al., 1990; KEYSARY et al., 1996), em linfócitos (MENESES, 1995), ou em ambas as células (SEIBERT et al., 1997). Entretanto, estas estruturas são detectadas em esfregaços sangüíneos de cães naturalmente infectados (KUEHN & GAUNT, 1985) quase que exclusivamente durante a fase aguda da doença e em frequência muito baixa (WOODY & HOSKINS, 1991; HARRUS et al., 1997).

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade da detecção de mórulas, pesquisadores têm descrito novos métodos de avaliar as estruturas de *E. canis*.

Troy et al. (1980) e Castro (1997) verificaram que a utilização de esfregaços de sangue da borda da orelha mostrou-se um método eficaz na detecção da rickettsemia dos animais. Elias (1991) detectou corpúsculos de inclusão em 6% e 88%, respectivamente, nos esfregaços obtidos de venopunção periférica e de margem de orelha. Segundo o autor, as mórulas e os corpúsculos iniciais são importantes para o diagnóstico da enfermidade em áreas enzoóticas, especialmente para os clínicos veterinários que necessitam de um resultado rápido. Entretanto, Beaufils et al. (1995) chamam a atenção para a possibilidade de erros de leitura pela semelhança das estruturas de *E. canis* com artefatos de técnica, eritrofagocitose, leucofagocitose e grânulos azurofílicos.

A utilização de leucoconcentração também tem sido adotada para pesquisa de mórulas (STEPHENSON et al., 1975; STOCKHAN et al., 1992) bem como para o cultivo celular de *Ehrlichia canis* (GAUNT et al., 1996; McBRIDE et al., 1996; SHIMADA et al., 2002), com o intuito de aumentar a sensibilidade das técnicas.

Mylonakis et al. (2003) compararam a sensibilidade das técnicas de papa de leucócitos, sangue periférico, linfonodos, medula óssea e cultivo celular para a detecção de *E. canis*, em cinquenta cães naturalmente infectados e em fase aguda de ehrlichiose. As técnicas utilizando a papa de leucócitos e punção aspirativa de linfonodos mostraram-se as mais sensíveis quando foram utilizados mil campos de leitura em microscopia ótica por imersão, havendo diferença significativa ao utilizarem cem e quinhentos campos. Os autores observaram também que a presença de linfadenomegalia teve relação com o encontro de mórulas.

2.5.4 OUTRAS TÉCNICAS LABORATORIAIS

Outros métodos utilizados para diagnóstico da ehrlichiose são o cultivo celular *in vitro* (NYINDO et al., 1971), detecção de anticorpos séricos anti-*E. canis* pela técnica de RIFI (RISTIC et al., 1972), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (WANER et al., 1996), imunoensaio enzimático dot-blot (dot-ELISA) (CADMAN et al., 1994), Western immunoblot (MATTHEWMAN et al., 1993b) e PCR (IQBAL & RIKIHISA, 1994a,b).

Em clínicas de animais de companhia essas técnicas são de difícil aplicação (ELIAS, 1991), já que são necessários investimentos em equipamentos e pessoal, além de uma boa estrutura para sua realização (NYINDO et al., 1971; IQBAL et al., 1994; WANER et al., 2000a; BULLA, 2003).

2.5.4.1 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular em monócitos ou macrófagos de cães (NYINDO et al., 1971; STEPHENSON & OSTERMAN, 1977), em células endoteliais (DAWSON et al., 1993) ou macrófagos humanos (UNVER et al., 2001), ou macrófagos de camundongo (KEYSARY et al. 2001), tem sido empregado para multiplicação de *E. canis* e diagnóstico de ehrlichiose.

IQBAL et al. (1994) concluíram que o cultivo celular é o teste mais sensível para diagnóstico da ehrlichiose, seguindo-se a PCR, RIFI e WI, ao trabalhar com cinco cães infectados experimentalmente.

Todavia, alguns fatores limitam o uso do cultivo celular, especialmente em uma rotina clínica. Rikihisa (1991) advertiu para a dificuldade de cultivo de *Ehrlichia* ao passo que Price & Dolan (1980) consideraram que apesar de sua alta sensibilidade e especificidade, a técnica deve ser realizada em laboratórios como auxiliar no diagnóstico. Outra desvantagem é o período de 14 a 34 dias exigido desde a semeadura em meio de cultivo até a obtenção dos resultados (McBRIDE et al., 1996).

Um cultivo celular de curta duração foi aplicado por Price & Dolan (1980) e Price et al. (1987) mostrando bons resultados. Entretanto, Mylonakis et al. (2003) verificaram baixa sensibilidade da técnica (14,6%) considerando-a menos que satisfatória. Segundo os autores, o curto período de incubação, 48 a 96 horas, pode resultar em falso-negativo, uma vez que a formação de mórulas pode levar de 12 a 17 dias nesse tipo de técnica.

Unver et al. (2001) destacaram a importância do isolamento de *Ehrlichia* para caracterização do agente e de antígeno específico para uma determinada área geográfica com a finalidade de padronização de testes sorológicos com alta sensibilidade.

2.5.4.2 IMUNODIAGNÓSTICO

A técnica de imunofluorescência indireta revolucionou o diagnóstico de ehrlichiose canina (RISTIC et al., 1972), especialmente em animais que apresentavam sinais clínicos com o diagnóstico citológico negativo. Posteriormente, outras técnicas para detecção de anticorpos e mensuração de resposta humoral foram desenvolvidos para detecção de anticorpos contra *E. canis* como dot-ELISA (CADMAN et al., 1994; HARRUS et al., 1997) e ELISA (WANER et al., 1996).

O Dot-ELISA foi desenvolvido para ser utilizado comercialmente devido à facilidade de uso em clínicas veterinárias. A técnica requer o mínimo de equipamentos e tempo, e é de fácil leitura, ao contrário do que acontece quando a técnica de RIFI ou de ELISA é empregada (ARAÚJO et al., 2001; WANER et al., 2001). Segundo os autores, Dot-ELISA usa antígenos totais de *Ehrlichia* aplicados sobre superfícies de nitrocelulose e é fundamentada na detecção de IgG séricas.

Infelizmente, algumas desvantagens têm limitado o uso destas técnicas para investigação seroepidemiológica (KAKOMA et al., 2000).

Em animais infectados experimentalmente, a soroconversão foi observada entre dez e vinte dias pós-infecção (KEYSARY et al., 1996; WANER et al., 1996; HARRUS et al., 1998b). Ou seja, os animais podem apresentar sinais clínicos antes da produção de anticorpos, o que poderia implicar em resultados falsos-negativos em casos agudos. Contraditoriamente, os resultados podem ser falsos-positivos em animais que se recuperam da enfermidade. Perille & Matus (1991), Bartsch & Greene (1996), Harrus et al. (1998a) e Neer (1998) detectaram títulos de anticorpos para *E. canis* pela RIFI até 15 meses após tratamento de animais sem que os mesmos apresentassem sinais da doença, sugerindo uma contínua produção de anticorpos pela estimulação antigênica ocasionada pelo agente. De acordo com Mathew et al. (1996), esses fatores tornariam difícil a diferenciação de animais ativamente infectados daqueles convalescentes.

Iqbal et al. (1994) consideraram que um resultado sorológico positivo não define se um animal está se recuperando espontaneamente ou se ele tem uma infecção corrente. Na opinião de Bélanger et al. (2002), corroborando Woody & Hoskins (1991), um título positivo significa que o animal foi exposto ao agente.

Outra desvantagem para utilização das técnicas para pesquisa de anticorpos é a ocorrência de reações cruzadas entre *E. canis* e outras rickettsias (RIKIHISA, 1991; MURPHY et al., 1998; WANER et al., 1998), sobretudo em áreas enzoóticas (MATTHEWMAN et al., 1993b).

O mais grave problema encontrado na utilização de técnicas de imunodiagnóstico é a diferença que pode ser encontrada nos resultados da titulação de soro de um animal (KAKOMA et al., 2000). Os autores submeteram uma mesma amostra a RIFI em diversos laboratórios, mudando a identificação da mesma para que parecesse de animais diferentes. Os títulos variaram de negativo até 1:2.560 e um laboratório apresentou resultados diferentes para a mesma amostra. Na opinião dos pesquisadores, a leitura das lâminas foi o principal fator para a discrepância de resultados entre os laboratórios.

Segundo Bélanger et al. (2002) a seroprevalência de *E. canis* pode variar muito dentro de diferentes populações caninas. Esse fato pode ser exemplificado pelos estudos realizados em Israel. Em 1996, a prevalência foi de 30% (BANETH et al., 1996), ao passo que em 1998, foram registrados títulos considerados positivos em 63% da população estudada (BANETH et al., 1998).

Outra técnica utilizada para diagnóstico de ehrlichiose é o Western immunoblot, que é considerada por La Scola & Raoult (1997) como a mais específica e sensível para detecção de anticorpos contra rickettsias. Contudo, em razão da grande variedade de peptídeos para o gênero *Ehrlichia* e inexistência de uma padronização para aqueles específicos para *E. canis* (NYINDO et al., 1991; HEGARTY et al., 1997), a sua especificidade pode ser questionada (KAKOMA et al., 2000).

A produção de proteínas recombinantes é outro avanço no diagnóstico sorológico da ehrlichiose. Estudos com membrana externa de *E. canis* (OHASHI et al., 1998; McBRIDE et al., 1999; YU et al., 2000; ALLEMAN et al., 2001; McBRIDE et al., 2001; OHASHI et al., 2001; McBRIDE et al., 2003; TENG et al., 2003) têm aumentado as perspectivas para uma padronização de antígeno e para reduzir as reações cruzadas com outras rickettsias, como aquelas observadas nos estudos de Nyindo et al. (1991), Matthewmann et al. (1993b) e Chen et al. (1997).

Um estudo que mostrou a aplicabilidade de proteínas recombinantes foi conduzido por Bélanger et al. (2002), comparando as técnicas de RIFI, ELISA, com utilização de proteína recombinante rMAP2, e três testes comerciais utilizando Dot-ELISA, para a detecção de anticorpos em 35 amostras de soro de cães naturalmente infectados e que apresentavam sinais consistentes de ehrlichiose e título de RIFI positivo (=1:40). Os autores verificaram que o ELISA rMAP-2 foi o teste de maior acurácia, com maior chance de identificação do estado de infecção de um animal. Contudo, Knowles et al. (2003) constataram que não foi possível diferenciar sorologicamente a infecção por *E. canis* e *E. chaffeensis* ao utilizar a rMAP2 nas técnicas de ELISA e WI.

Harrus et al. (2002) compararam a concordância entre os resultados da RIFI com os testes de ELISA rMAP-2 e dois testes usando Dot-ELISA, observando que as técnicas apresentaram alta sensibilidade e especificidade, que corresponderam, respectivamente, a 0,71 e 0,85 para rMAP-2; 0,86 e 0,98 para o Immunocomb (Biogal, Israel); e, 0,71 e 1,00 para Snap 3Dx (IDEXX Laboratories Inc., USA). Contudo, os autores verificaram que a sensibilidade dos testes foi baixa quando os títulos de RIFI foram menores ou iguais a 320.

Em razão desses fatores, as técnicas de detecção de anticorpos, segundo Iqbal et al. (1994) e Kakoma et al. (2000), são pouco confiáveis para a confirmação do diagnóstico mas muito importantes em estudos soroepidemiológicos.

2.5.4.3 BIOLOGIA MOLECULAR

A PCR é considerada sensível e específica para diagnóstico de ehrlichiose canina. A técnica é fundamentada na amplificação do DNA de *Ehrlichia* em diversos materiais biológicos como sangue, medula óssea e linfonodos de cães (IQBAL & RIKIHISA, 1994a,b; IQBAL et al., 1994) e também em carrapatos

(MURPHY et al., 1998; MAUEL et al., 1999; STICH et al., 2002). Segundo McBride et al. (1996) e La Scola & Raoult (1997), a PCR é a técnica de escolha para o diagnóstico de ehrlichiose em casos iniciais de infecção, uma vez que a detecção do agente pode ser obtida antes da formação de mórulas ou de seroconversão. Outra vantagem apresentada pelos autores é a obtenção de resultado em um espaço de tempo relativamente curto, que pode variar de 24 a 48 horas.

Atualmente, a PCR tem sido muito utilizada para diagnóstico e estudo epidemiológico de ehrlichiose (SUTO et al., 2001; BULLA et al., 2003; MYLONAKIS et al., 2003), para caracterização de espécies (WARNER & DAWSON, 1996; BREITSCHWERDT et al., 1998; MURPHY et al., 1998) ou isolados de *Ehrlichia* (DAWSON et al., 1993; KEYSARY et al., 1996; PEREZ et al., 1996; ALLSOPP & ALLSOPP, 2001; UNVER et al., 2001), escolha de tecidos para diagnóstico (IQBAL & RIKIHISA, 1994a,b) e avaliação do tratamento de animais (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998a).

Harrus et al. (1998a) avaliaram a presença de *E. canis* em animais infectados experimentalmente pela PCR, detectando o agente após 34 meses de infecção. Com base nos resultados, os pesquisadores concluíram que a técnica permite avaliar se um animal sororeagente é carreador de *E. canis* ou se existe a persistência de anticorpos circulantes mas sem infecção, possibilitando a escolha de cães como doadores de sangue.

Iqbal et al. (1994) compararam a PCR com a RIFI, WI e reisolamento de *E. canis* em cultura celular. Concluíram que o cultivo celular foi a técnica mais sensível para diagnóstico de ehrlichiose canina. Porém, em decorrência de seu alto custo e demora para obtenção de resultados, os autores concluíram que a PCR em combinação com RIFI permite o mais rápido e razoável diagnóstico para a doença.

A utilização de dois pares de *primers* para amplificação de DNA de *E. canis* pela PCR (*nested PCR*) (WARNER & DAWSON, 1996; WEN et al., 1997) bem como de PCR com *primers* biotinizados (PCR-BP) (MATHEW et al., 2000), têm resultado em maior sensibilidade da técnica, aumentando a possibilidade de seu uso prático.

McBride et al. (1996) submeteram os produtos de uma PCR a uma hibridização quimiluminescente. Segundo os resultados obtidos pelos pesquisadores, esta associação de técnicas teve maior sensibilidade que o cultivo *in vitro* e permitiu a amplificação de aproximadamente 150 organismos de *E. canis* a mais em relação à PCR.

A grande desvantagem da PCR, segundo Kakoma et al. (2000), é a necessidade de equipamentos sofisticados e laboratório com estrutura adequada para realização das reações, limitando seu uso em clínicas veterinárias.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 TRIAGEM DOS ANIMAIS E FORMAÇÃO DE GRUPOS

A triagem dos animais seguiu vários estágios de avaliação clínica e laboratorial, que foram constituídas das seguintes etapas:

1 - Triagem epidemiológica

Foram selecionados cães da rotina ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, não havendo distinção de raça, sexo ou idade dos animais para que os animais fossem incluídos no estudo, durante o período de janeiro de 2001 a dezembro de 2002.

Com o objetivo de levantar informações que pudessem fornecer subsídios para correlacionar fatores epidemiológicos relacionados à doença, os proprietários foram questionados se seus animais estavam ou se já haviam sido infestados por carrapatos, se conviviam com outros cães, e se o piso onde eles habitavam era de terra ou de cimento.

Foram selecionados os cães procedentes de Presidente Prudente. Adotou-se pela exclusão dos animais atendidos por Médicos Veterinários de outras clínicas da cidade e cujos proprietários haviam sido encaminhados ao HV, e ainda daqueles que tinham recebido medicamentos, como antibióticos ou antiinflamatórios, que poderiam comprometer a análise dos resultados.

2 - Triagem clínica

Atendidos esses critérios de inclusão, era realizado o exame clínico de rotina adotado no HV, com a observação do comportamento, atitude e estado nutricional do animal; aferição da temperatura retal e das frequências cardíaca e respiratória; inspeção da pele, especialmente para detecção de carrapatos, e das mucosas aparentes; palpação dos linfonodos submandibulares, subaxilares e poplíteos; e, realização de exames neurológico e oftálmico.

Considerou-se como suspeitos, os cães nos quais foram constatados dois sinais clínicos relacionados por Kakoma et al. (2000): apatia, anorexia, emaciação, letargia, sinais de depressão, febre, temperatura retal maior que 39,5⁰C, palidez de mucosas, ou sinais de distúrbio de coagulação como epistaxe, petéquias, sufusões, melena, hematúria ou hifema.

Caso o clínico presumisse a possibilidade de ehrlichiose, um formulário padrão, com base nos critérios de Dunn (2001), era preenchido para que contivesse todas as informações das resenhas epidemiológica e clínica do paciente.

3- Triagem laboratorial

Concluindo-se o exame clínico e com adequação do animal aos critérios anteriores, eram solicitados hemograma, contagens de plaquetas e de reticulócitos, pesquisa de hematozoários e de *E. canis* e *A. platys*, utilizando-se a técnica de leuconcentração em tubo microcapilar e esfregaços de sangue periférico e de margem de orelha. Tanto a confecção dos esfregaços como a leitura das lâminas foram efetuadas sob a forma de duplo cego, para minimizar vícios de leitura.

Os animais com uma ou mais das alterações hematológicas descritas por Kakoma et al. (2000) e que consistiam de trombocitopenia, anemia, leucopenia, pancitopenia, hipoproteinemia ou presença de mórulas, passaram para a última fase de triagem que constou da amplificação de material genético de *E. canis* em amostra de sangue pela PCR, sendo excluídos do ensaio qualquer cão com resultado negativo.

Este grupo de cães constituiu o grupo de infectados (Grupo 1). Para formação de um grupo controle (Grupo 2), foram avaliados 50 cães sem suspeita clínica de ehrlichiose, clinicamente hígidos, triados no canil da Unoeste, utilizando-se dos mesmos procedimentos clínicos e laboratoriais, considerando-se a PCR negativa com critério para sua inclusão.

3.2 FORMAÇÃO DE SUBGRUPOS

Após todas as etapas de triagem, os grupos 1 e 2 foram divididos em dois subgrupos cada, com a finalidade de identificar os animais verdadeiros-positivos e falsos-negativos, e verdadeiros-negativos e falsos-verdadeiros, respectivamente, para validação das técnicas citológicas empregadas para diagnóstico de mórulas de *E. canis*, conforme a seguinte distribuição:

Grupo 1: Animais Infectados

- Subgrupo 1: Verdadeiros-positivos (VP) – cães com suspeita clínica de ehrlichiose canina confirmada pela presença de mórula de *E. canis* em pelo menos uma das técnicas citológicas empregadas e PCR positiva para a rickettsia.

- Subgrupo 2: Falsos-negativos (FN) – cães com suspeita clínica de ehrlichiose canina, com pesquisa de mórula de *E. canis* negativa para as técnicas citológicas empregadas e PCR positiva para a rickettsia.

Grupo 2: Animais Controle

- Subgrupo 3: Falsos-positivos (FP) – cães sem suspeita clínica de ehrlichiose, em higidez, com pesquisa de mórula de *E. canis* em pelo menos uma das técnicas citológicas empregadas e PCR negativa para a rickettsia.

- Subgrupo 4: Verdadeiros-negativos (VN) – cães sem suspeita clínica de ehrlichiose, em higidez e com pesquisa de mórula de *E. canis* e PCR negativas para a rickettsia.

Ao final da triagem clínica e laboratorial, foram incluídos 95 animais para realização do ensaio. Os grupos de infectados e não infectados foram compostos, respectivamente, por 60 e 35 cães, e subdivididos conforme os resultados citológicos e da PCR (Quadro 1).

Quadro 1. Composição dos grupos e subgrupos de animais infectados e não infectados por *Ehrlichia canis*, de acordo com os resultados da pesquisa de mórulas, utilizando-se a PCR como padrão-ouro, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| | | Grupo I | | Grupo II | | |
|---------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|--|--------------|
| | | Animais Infectados | | Animais não Infectados | | |
| | | PCR Positiva | | PCR Negativa | | Total |
| | | Subgrupo 1: | | Subgrupo 3: | | |
| Mórula | Presente | Verdadeiros-positivos (VP) | Falsos-positivos (FP) | | | 45 |
| | | n=45 | n=0 | | | |
| de | | Subgrupo 2 | Subgrupo 4: | | | |
| | Ausente | Falsos-negativos (FN) | Verdadeiros-negativos (VN) | | | 50 |
| | | n=15 | n=35 | | | |
| | Total | 60 | 35 | | | 95 |

3.3 COLHEITA E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

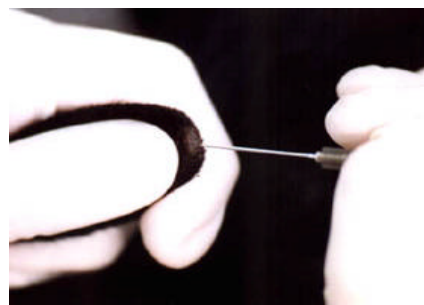
Amostras de sangue foram colhidas por punção da jugular com auxílio de tubos de vácuo (Vacuntainer[®]), para os seguintes procedimentos:

- 4,0 ml em EDTA a 10% para a pesquisa de hematozoários, contagem de hemácias, reticulócitos e plaquetas; determinação da concentração de hemoglobina; volume globular; proteína plasmática total e do fibrinogênio plasmático; bem como da contagem total e diferencial de leucócitos e da PCR.

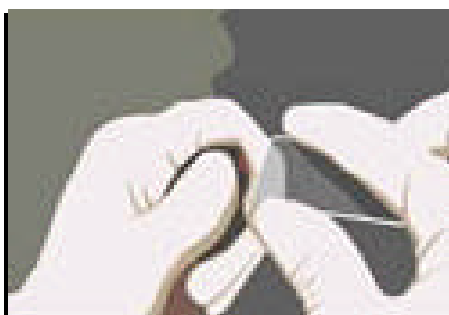
- 2,0 ml de sangue total em EDTA a 10% foram transferidos para tubos criogênicos estéreis, para execução da PCR. A amostra, após identificação, foi imediatamente congelada a -4,0⁰C até o momento de seu processamento.

- O esfregaço de sangue de margem de orelha foi confeccionado de acordo com a Figura 1, baseando-se nos procedimentos adotados por Elias (1991).

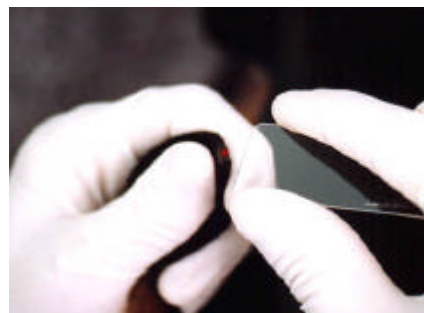
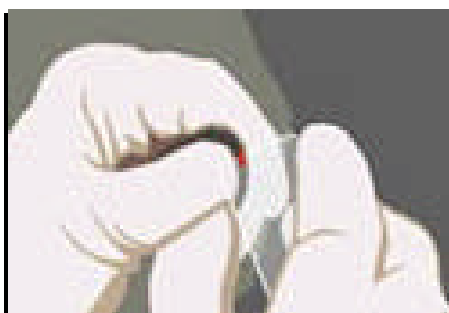
a



b



c



d

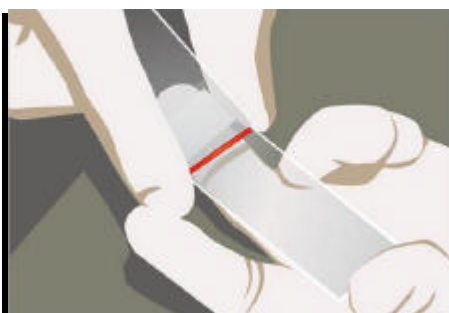


Figura 1 – Esfregaço de margem de orelha para pesquisa de hematozoários e mórulas de *Ehrlichia canis*. a. inserção de agulha na pina da orelha; b e c. obtenção de sangue com lâmina extensora; d. realização do esfregaço. Ilustração (esquerda)

e foto (direita). Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

3.4 EXAMES LABORATORIAIS

3.4.1 HEMATOLOGIA

O processamento das amostras de sangue para hematologia e pesquisa de hematozoários foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica e Parasitoses do HV da Unoeste, sendo executado de acordo com Jain (1993) e Kaneko (1997), de onde foram retirados os valores normais de referência para comparação das seguintes variáveis:

3.4.1.1 Eritrograma

A contagem total de hemácias foi procedida pela técnica do hemocitômetro, a concentração da hemoglobina pela cianometahemoglobina e a determinação do volume globular por meio do microhematócrito. Calculou-se os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) e as concentrações média de hemoglobina (HCM) e de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

3.4.1.2 Leucograma

Para obtenção da leucometria, utilizou-se a técnica do hemocitômetro e o diferencial pela contagem de cem células em esfregaço corado pelo Diff-Quick (Panótico rápido[®]).

3.4.1.3 Contagem de plaquetas

A plaquetometria foi obtida em microscopia ótica (400x) e realizada em câmara de Neubauer imediatamente após a colheita da amostra, utilizando-se solução de oxalato de amônio 1% (líquido de Brecher) como diluente.

3.4.1.4 Proteínas plasmáticas totais

A determinação da concentração de proteínas plasmáticas totais foi obtida por refratometria.

3.4.1.5. Fibrinogênio plasmático

Determinou-se o fibrinogênio plasmático pela precipitação protéica pelo calor, à temperatura de 56,0⁰C.

3.4.1.6 Contagem de reticulócitos

A contagem de reticulócitos foi efetuada pelo método de coloração supra-vital pelo azul de cresil brilhante, com a contagem de mil células.

3.4.2 PESQUISA DE HEMATOZOÁRIOS

A pesquisa de hematozoários foi realizada mediante a leitura de esfregaço sangüíneo corado pelo método de Diff-Quick (Panótico rápido[®]).

3.4.3 TÉCNICA DE LEUCOCONCENTRAÇÃO

Para pesquisa de mórulas de *E. canis* pela leucoconcentração, as amostras de sangue total em EDTA, primeiramente, foram transferidas para tubos de vidro para hematócrito por capilaridade. Depois de preenchidos, os capilares, após fechamento de sua extremidade pelo calor, foram centrifugados em microcentrífuga durante cinco minutos a 11.500 r.p.m. (10.000g).

Após centrifugação, os tubos foram marcados e esmerilados com a borda de uma lâmina de vidro, na parte final da camada de hemácias. Com auxílio das mãos, os tubos eram quebrados e a porção restante da camada eritrocitária desprezada. O material para o esfregaço deveria conter os seguintes constituintes: porção final da

camada eritrocitária, a camada de leucócitos e plaquetas e o plasma sangüíneo (Figura 2).

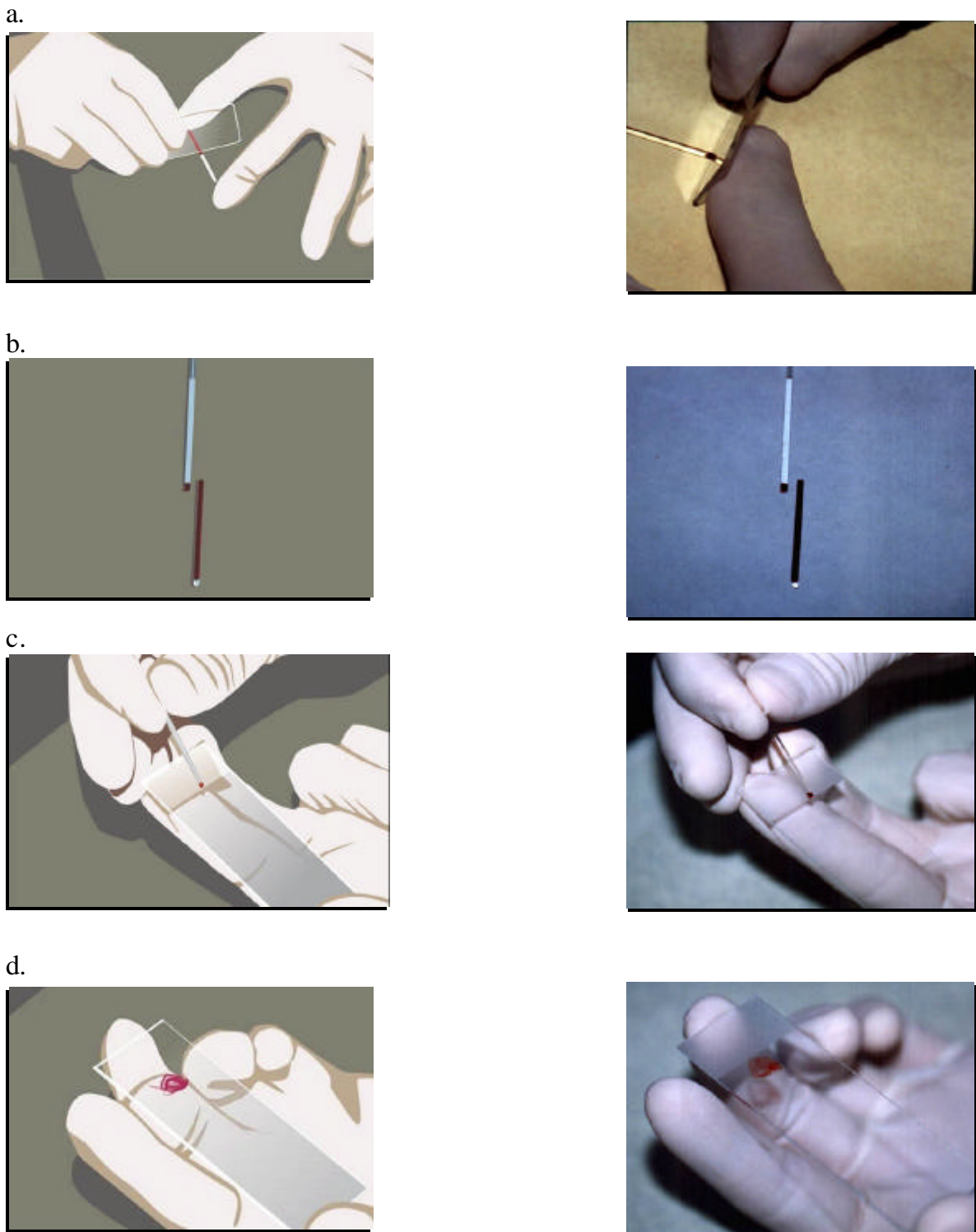


Figura 2 – Esfregaço a partir de sangue após centrifugação pela técnica de leucoconcentração para pesquisa de hematozoários e mórulas de *Ehrlichia canis* a. esmerilização do microcapilar com lâmina de vidro; b. local de quebra do microcapilar; d. disposição de leucoconcentrado sobre lâmina; material a ser utilizado no esfregaço. Ilustração (esquerda) e foto (direita). Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

As amostras foram analisadas sob microscopia ótica (aumento de 1.000X), adotando-se os critérios descritos por Elias (1991) e Stockham et al. (1992) com algumas modificações. Utilizou-se uma única lâmina para cada técnica citológica. Estabeleceu-se a contagem de cinquenta células mononucleares em cada margem lateral do esfregaço e outras cinquenta na cauda, uma vez que na parte central o agrupamento de leucócitos dificultava a leitura da lâmina. Foram contados os leucócitos até a leitura de 150 células mononucleares (monócitos e/ou linfócitos) e a visualização de uma mórula. Após o encontro desta estrutura, o restante da lâmina era visualizado até que se encontrasse pelo menos mais uma mórula, para caracterização citológica de amostras positivas.

Nos casos em que os animais eram pancitopênicos, toda a lâmina era visualizada, utilizando-se também um esfregaço para cada técnica.

3.4.4 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

A PCR foi executada no Laboratório de Virologia do Instituto de Biociência da Unesp, Botucatu, e constituiu-se das seguintes etapas:

3.4.4.1. Extração do DNA

O DNA foi extraído de 600 µL de amostras de sangue total, utilizando-se o GFX Genomic Blood DNA Purification KitTM (Amersham Biosciences do Brasil¹), de acordo com as recomendações do fabricante.

¹ Amersham Biosciences do Brasil S/A
Fone: 0800-136833

3.4.4.2. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen[®]), descritos por Wen et al. (1997). Os *primers* foram fundamentados na seqüência de DNA que codifica uma porção altamente variável ao final da região 5' da seqüência gênica 16S rRNA para *E. canis*. As seqüências para a primeira fase (PCR) foram “EC1 sense” (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3') e EC1 antisense” (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3').

Para a segunda fase (*nested* PCR), foram utilizados os *primers* “EC2 sense” (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3') e “EC2 antisense” (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'), para *E. canis*.

3.4.4.3. Preparo das amostras para amplificação do DNA

Inicialmente, diluiu-se os oligonucleotídeos a 2,0 pmol/μL em solução de tris-HCl a 10,0 mmol/L (pH 7,4) e EDTA a 0,1 mmol/L. Esta solução-mãe foi diluída em água Milli Q autoclavada na proporção 1:10, para obtenção da concentração de uso de 0,2 μmol/L.

Para amplificação, utilizou-se uma PCR com uma reação de 25,0 μL contendo: 5,0 μL de filamento de DNA; 0,2 μmol/L (cada) dos deoxinucleotídeos dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Amersham Biosciences); 2,0 pmol (cada) dos *primers*; 0,625 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogenbiotools²); e, solução tampão (pH 9,0), contendo 2,0 mmol/L de MgCl₂; 50,0 mmol/L de KCl; 20,0 mmol/L de (NH₄)₂SO₄; e, 75,0 mmol/L Tris-HCl. O volume foi completado com água autoclavada em quantidade suficiente para 25,0 μL.

<http://www.amershambiosciences.com.br>

² Invitrogen do Brasil Ltda.

Av. Jamaris, 380 – Indianópolis. São Paulo. 04078-000 Fone: (0—11)5051-7422

3.4.4.4. Amplificação do DNA

A amplificação foi efetuada em termociclador automático (Modelo PTC 100 MJResearchTM). Inicialmente, as amostras sofreram uma desnaturação a 94^oC durante cinco minutos, seguida de uma seqüência de quarenta ciclos repetidos, compostos de três temperaturas para cada ciclo: 1) 94^oC por um minuto, para desnaturação das fitas de DNA; 2) 60^oC por um minuto, para hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*); e, 3) 72^oC por um minuto, para anelamento e extensão de cadeia. Para garantir a finalização do processo de extensão e a presença dos DNAs amplificados, realizou-se ainda uma incubação a 72^oC por cinco minutos.

Para realização da segunda etapa (*nested* PCR), foi retirado 1,0 µL do material amplificado pela PCR. Os ciclos das reações foram semelhantes para as duas fases, diferindo apenas pelos pares de *primers* que neste caso foram a “EC2 sense” e “EC2 antisense”.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em ácido-EDTA tris-bórico tamponado, revelada com brometo de etídio (0,5µg/mL). Os fragmentos de DNA foram analisados com marcadores de DNA de 100 pares de base (bp) (Gibco, BRLTM)², em transluminação UV.

Realizou-se ainda a PCR e *nested* PCR para *A. platys*. A PCR seguiu o mesmo protocolo utilizado para *E. canis*. Contudo, na *nested* PCR utilizou-se o *primer* EP1 para amplificação de *A. platys*, descrito por Chang & Pan (1996).

Considerou-se como positivas, as amostras cujos produtos apresentaram tamanho aproximado de 400 bp.

² Invitrogen do Brasil Ltda.

Av. Jamaris, 380 – Indianópolis. São Paulo. 04078-000 Fone: (0—11)5051-7422

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tratados estatisticamente no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Unesp, Botucatu.

Para avaliar quais os achados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais que pudessem estar associados com a infecção por *E. canis*, os valores obtidos foram submetidos à regressão logística. Os resultados dos exames hematológicos dos subgrupos foram tratados pelo teste t de Student ou teste u de Mann-Whitney, para dados não emparelhados.

Para comparação da diferença de frequência das alterações clínicas e hematológicas obtidas nos grupos de animais verdadeiros-positivos e falsos-negativos, os dados foram submetidos ao teste exato de Fisher.

No que se refere à validação das técnicas de detecção de mórulas de *E. canis*, foram calculadas a sensibilidade e especificidade comparadas, os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e o coeficiente Kappa (κ), adotando-se a PCR como técnica padrão-ouro, segundo Mackinnon (2000).

Com o objetivo de estabelecer quais as alterações observadas nos esfregaços estavam correlacionados com a positividade da amostra, comparou-se os resultados das técnicas de pesquisa de mórulas para *E. canis* pelo teste Q de Cochran.

Calculou-se também a sensibilidade e especificidade paralelas para as técnicas que apresentaram maior eficiência e os achados correlacionados com a positividade para ehrlichiose, com o objetivo de avaliar se a associação forneceria subsídios para melhorar as chances de diagnóstico da doença, segundo critérios apresentados por Medronho & Perez (2002).

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos em nível de 5% (TRIOLA, 1999).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Na Figura 3 está representada a ocorrência mensal média da ehrlichiose canina em Presidente Prudente no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2002.

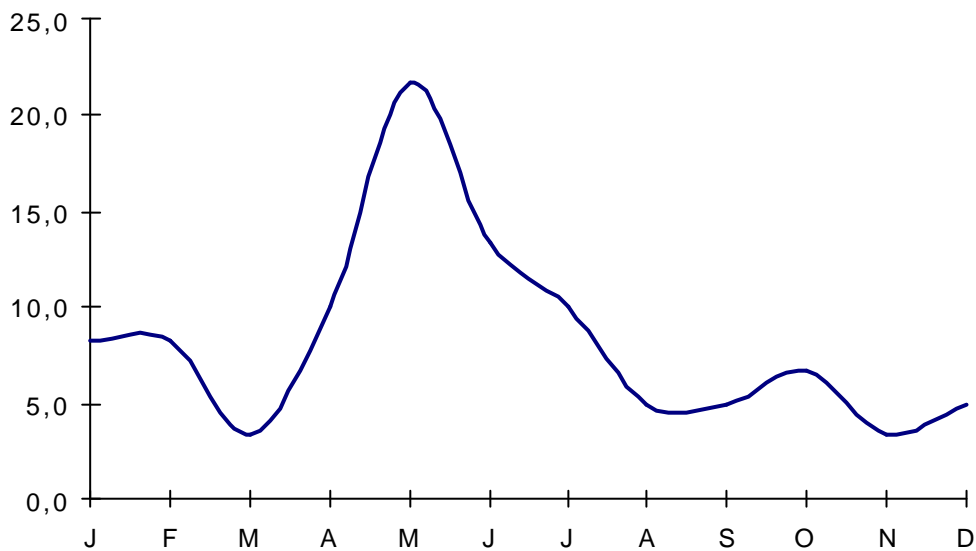


Figura 3 – Ocorrência mensal de ehrlichiose canina em Presidente Prudente, São Paulo, entre janeiro de 2001 e dezembro de 2002.

A maior frequência de ehrlichiose ocorreu nos meses mais frios e secos, compreendidos entre abril e julho. Entretanto, observou-se a doença nesse ensaio durante todo o ano, devido à presença de *R. sanguineus*, que também foi constatado nos 12 meses. Este achado foi citado também por Bulla (2003) e Munhóz & Babo (1998), que consideraram as condições climáticas de Botucatu, SP, e Campo Grande, MS, respectivamente, favoráveis à manutenção do carrapato.

Não houve nenhuma hipótese que pudesse justificar a maior frequência de casos entre os meses de abril a julho, sendo necessários trabalhos na região que investiguem as possíveis variáveis que interfiram na sazonalidade da doença.

Flutuação similar da doença foi verificada por Harrus et al. (1997), em Israel. Porém, naquele país o maior número de casos ocorreu quando as temperaturas foram mais altas, fato que foi registrado também por Walker et al. (1970), Stephenson & Ristic (1978), Davoust et al. (1990) e Keysary et al. (1996). Keefe et al. (1982) consideraram o stress calórico como responsável pelas epizootias e de maior frequência em meses em que as temperaturas são altas.

Não ocorreu interferência na variável sexo em relação à infecção por *E. canis*. O grupo de animais infectados foi formado por 34 machos (56,67%) e 26 fêmeas (43,33%). Nos animais controle, seis foram machos (17,15%) e 29 fêmeas (82,86%). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Stephenson & Ristic (1978), Waddle & Littman (1988), Thirunavukkarasu et al. (1993), Harrus et al. (1997), Frank & Breitschwerdt (1999) e Cocco et al. (2003), ao verificarem que a ehrlichiose ocorreu aproximadamente nas mesmas proporções em ambos os sexos, ao contrário de Nims et al. (1971), que observaram 90,0% de machos infectados pela rickettsia.

A idade dos animais infectados por *E. canis* variou de um mês a 11 anos. No grupo controle, a variação foi de seis meses a nove anos. Essa idade, em alguns casos, poderia ser questionada, uma vez que os animais, em sua maioria, eram errantes antes de serem levados ao canil.

Na Tabela 1 é apresentado um escalonamento etário dos animais infectados por *E. canis*, bem como a comparação dos subgrupos.

Tabela 1 - Distribuição das idades de cães infectados por *Ehrlichia canis* e comparação entre animais considerados verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN), e suas respectivas freqüências (%), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Idade | Total | | VP | | FN | |
|------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | n/N | % | n/N | % | n/N | % |
| < 1 ano | 21/60 | 35,00 | 19/45 | 42,22 | 2/15 | 13,33 |
| 1-2 anos | 11/60 | 18,33 | 9/45 | 20,00 | 2/15 | 13,33 |
| 3-4 anos | 11/60 | 18,33 | 7/45 | 15,56 | 4/15 | 26,67 |
| 5-6 anos | 7/60 | 11,67 | 3/45 | 6,67 | 4/15 | 26,67 |
| 7-8 anos | 4/60 | 6,67 | 3/45 | 6,67 | 1/15 | 6,67 |
| 9-10 anos | 3/60 | 5,00 | 2/45 | 4,44 | 1/15 | 6,67 |
| 11-12 anos | 3/60 | 5,00 | 2/45 | 4,44 | 1/15 | 6,67 |
| >12 anos | 0/60 | 0,00 | 0/45 | 0,00 | 0/15 | 0,00 |

Observou-se que a maioria dos cães possuía idade inferior a um ano. Este fato foi observado particularmente nos animais verdadeiros-positivos (VP), ao contrário do que ocorreu nos falsos-negativos (FN), em que houve maior freqüência de cães com três a cinco anos de idade.

Thirunavukkarasu et al. (1993) também observaram que houve uma tendência para que animais com idade inferior a um ano fossem mais acometidos pela ehrlichiose. No estudo de Cocco et al. (2003), cães entre um e cinco anos foram os mais acometidos, ao passo que nos realizados por Stephenson & Ristic (1978), Price et al. (1987), Waddle & Littman (1988), Harrus et al. (1997) e Frank & Breitschwerdt (1999), houve distribuição homogênea entre as idades dos animais estudados.

Em relação à raça, houve predomínio de infecção em cães com definição racial. No grupo controle, foi mais freqüente a presença de cães sem raça definida (SRD) (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição das raças de cães infectados e não infectados (controle) por *Ehrlichia canis*, e suas respectivas frequências (%), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Raça | Infectados | | Controle | |
|-----------------------|------------|------|----------|------|
| | n/N | % | n/N | % |
| Sem raça definida | 21/60 | 35,0 | 28/35 | 80,0 |
| Com definição racial | 39/60 | 65,0 | 7/35 | 20,0 |
| Rottweiler | 6/60 | 10,0 | 0/35 | 0,0 |
| Poodle | 5/60 | 8,3 | 1/35 | 2,9 |
| Australian Cattle Dog | 5/60 | 8,3 | 0/35 | 0,0 |
| Pastor Alemão | 3/60 | 5,0 | 2/35 | 5,7 |
| Cocker Spaniel | 3/60 | 5,0 | 0/35 | 0,0 |
| Pit Bull | 2/60 | 3,3 | 0/35 | 0,0 |
| Doberman Pinscher | 2/60 | 3,3 | 0/35 | 0,0 |
| Fila Brasileiro | 2/60 | 3,3 | 2/35 | 5,7 |
| Dogue Alemão | 2/60 | 3,3 | 0/35 | 0,0 |
| Border Collie | 2/60 | 3,3 | 0/35 | 0,0 |
| Basset Hund | 2/60 | 3,3 | 0/35 | 0,0 |
| Setter Irlandês | 1/60 | 1,7 | 0/35 | 0,0 |
| Husky Siberiano | 1/60 | 1,7 | 0/35 | 0,0 |
| Dachs hund | 1/60 | 1,7 | 1/35 | 2,9 |
| Bulldog | 1/60 | 1,7 | 0/35 | 0,0 |
| Bull Terrier | 1/60 | 1,7 | 0/35 | 0,0 |
| Doberman | 0/60 | 0,0 | 1/35 | 2,9 |

Somando-se todas as raças de cães, houve predominância de animais de raça (65%) em relação aos SRD (35%), corroborando Thirunavukkarasu et al. (1993) e Frank & Breitschwerdt (1999), ao observarem, respectivamente, que 71,5% e 72,0% dos animais infectados tinham definição racial. Contudo, comparando-se apenas uma raça com os cães SRD, a frequência destes foi superior, o que também foi constatado por Thirunavukkarasu et al. (1993). Estes argumentos, porém, são contraditórios aos de Seamer & Snape (1970), que verificaram que cães SRD foram menos suscetíveis à ehrlichiose.

No que se refere aos cães pastores alemães, considerados como os de maior suscetibilidade à infecção por *E. canis* (NYINDO et al., 1980), a frequência obtida foi muito baixa em relação às verificadas por Thirunavukkarasu et al. (1993) e Harrus et al. (1997), respectivamente de 20,31% e 28,0%. O reduzido número de pastores alemães estudados não permitiu inferir se estes animais foram mais propensos à infecção como sugerem os autores citados.

Embora algumas características raciais e etárias tenham sido consideradas interessantes para o estudo da ehrlichiose em Presidente Prudente, não houve correlação entre o diagnóstico de *E. canis* e as variáveis raça, sexo e idade, fato que corrobora Troy et al. (1980), Kuehn & Gaunt (1985) e Waddle & Littman (1988). Por outro lado, o histórico de infestação por carrapatos (86,67%), a presença de piso de terra (66,67%) e de outros cães (60,0%) no local onde o animal vivia, e o acesso à rua (53,33%), foram as variáveis epidemiológicas associadas com a positividade para ehrlichiose ($p < 0,0001$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Achados epidemiológicos associados com ehrlichiose canina, verificados pela regressão logística ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Variável | b | EP-b | IC-95% | p-value |
|------------------------|---------|--------|-------------------|----------|
| Coabitante | -0,1977 | 0,0540 | -0,3052 – -0,0903 | 0,0004 |
| Acesso à rua | 0,1358 | 0,0633 | 0,0098 – 0,2617 | 0,0347 |
| Piso de terra | 0,2082 | 0,0606 | 0,0874 – 0,3289 | 0,0009 |
| Histórico de Carrapato | 0,3984 | 0,0641 | 0,2708 – 0,5260 | < 0,0001 |

β: valor da estatística; EP: erro-padrão; IC: intervalo de confiança

Estudos que correlacionem a influência de fatores ambientais com ehrlichiose canina não foram verificados na literatura, não permitindo uma discussão mais ampla sobre o assunto, com exceção de Bulla (2003), que constatou uma alta taxa de infecção de cães por *E. canis*, 30,9%, atribuiu-a ao fato de grande parte dos animais viver em ambientes externos, facilitando o contato com carrapatos.

A associação dos fatores ambientais correlacionados com ehrlichiose observados nesse trabalho pode ser uma grande ferramenta para clínicos veterinários, especialmente em regiões endêmicas para a doença, como é o caso do Brasil, como sugerem as estimativas de Moraes et al. (2002) e os dados obtidos por Labarthe et al. (2003).

4.2 ACHADOS CLÍNICOS

Apatia, anorexia, presença de carrapatos, linfadenomegalia, febre e palidez de mucosas foram os sinais clínicos mais frequentes nos infectados (Tabela 4), sendo observados em mais da metade dos cães.

Tabela 4 – Achados observados em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e comparação da frequência em animais verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN), pelo teste exato de Fisher ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Achado Clínico | Total | | VP | | FN | | p-value |
|------------------------------|-------|-------|-------|--------------------|-------|--------------------|---------|
| | n/N | % | n/N | % | n/N | % | |
| Apatia | 43/60 | 71,66 | 35/45 | 77,77 ^a | 8/15 | 53,33 ^a | 0,0988 |
| Anorexia | 41/60 | 68,33 | 31/45 | 68,88 ^a | 10/15 | 66,66 ^a | 1,0000 |
| Presença de carrapatos | 39/60 | 65,00 | 30/45 | 66,66 ^a | 9/15 | 60,00 ^a | 0,7568 |
| Linfadenomegalia | 34/60 | 56,66 | 25/45 | 55,55 ^a | 9/15 | 60,00 ^a | 1,0000 |
| Febre (>39,5 ⁰ C) | 32/60 | 53,33 | 26/45 | 57,77 ^a | 6/15 | 40,00 ^a | 0,2514 |
| Palidez de mucosas | 32/60 | 53,33 | 23/45 | 51,11 ^a | 9/15 | 60,00 ^a | 0,7659 |
| Esplenomegalia | 25/60 | 41,66 | 19/45 | 42,22 ^a | 6/15 | 40,00 ^a | 1,0000 |
| Hemorragias | 18/60 | 30,00 | 7/45 | 15,55 ^a | 11/15 | 73,33 ^b | <0,0001 |
| Emaciação | 16/60 | 26,66 | 10/45 | 22,22 ^a | 6/15 | 40,00 ^a | 0,1947 |
| Prostração | 13/60 | 21,66 | 11/45 | 24,44 ^a | 2/15 | 13,33 ^a | 0,4850 |
| Dificuldade locomotora | 7/60 | 11,66 | 6/45 | 13,33 ^a | 1/15 | 6,66 ^a | 0,6678 |
| Miosite | 2/60 | 3,33 | 1/45 | 2,22 ^a | 1/15 | 6,66 ^a | 0,4407 |
| Icterícia | 1/60 | 1,66 | 0/45 | 0,00 ^a | 1/15 | 6,66 ^a | 0,2500 |
| Ataxia | 1/60 | 1,66 | 0/45 | 0,0 ^a | 1/15 | 6,66 ^a | 0,2500 |

Frequências seguidas de letras distintas indicam diferença significativas

Na Figura 4 podem ser observadas algumas das principais manifestações clínicas nos animais infectados.

a.



b.



c.



d.



e.



f.



Figura 4 – Sinais clínicos relacionados com ehrlichiose canina. a. infestação por carrapatos; b. mucosa oral apresentando palidez; c. petéquias e equimoses na região prepucial; d. epistaxe bilateral; e. hemorragia na esclera.; f. hifema com descolamento de retina. Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

Segundo Kuehn & Gaunt (1985), Price et al. (1987), Waddle & Littman (1988), Thirunavukkarasu et al. (1994), Harrus et al. (1997), Munhóz & Babo (1998), Frank & Breitschwerdt (1999), os achados clínicos na ehrlichiose são inespecíficos, como aqueles descritos na Tabela 4.

A frequência dos sinais clínicos, com poucas exceções, foi similar à descrita por Harrus et al. (1997), em Israel, que por sua vez consideraram-na semelhante às de estudos americanos e sul-africanos.

A comparação das médias de temperatura retal entre animais infectados e não controle e entre os subgrupos está disposta na Tabela 5.

Tabela 5 - Média da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) \pm desvio-padrão de animais infectados e não infectados (controle) por *Ehrlichia canis* e comparação dos subgrupos verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) para a pesquisa de mórulas e a PCR, pelo teste exato de Fisher ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Média \pm Desvio-padrão | | Estatística | p-value |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------|----------|
| Infectados | Controle | | |
| 39,48 ^a \pm 1,08 | 38,62 ^b \pm 0,36 | t= 4,56 | < 0,0001 |
| VP | FN | | |
| 39,53 ^a \pm 1,10 | 39,33 ^a \pm 1,07 | t= 0,61 | <0,5497 |

Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas

Analisando-se a Tabela 5, constatou-se que nos animais infectados a temperatura retal foi significativamente maior que a do grupo controle. No primeiro grupo, cujas temperaturas variaram de 35,0 $^{\circ}\text{C}$ a 41,5 $^{\circ}\text{C}$, em 53,3% verificou-se febre, ao passo que no segundo grupo, essa alteração não foi registrada, havendo variação de 38,0 a 39,3 $^{\circ}\text{C}$. Não ocorreu diferença, comparando-se os animais VP e FN.

Na opinião de Neer (1998) e Frank & Breitschwerdt (1999), é impossível discriminar clinicamente as fases da ehrlichiose. Entretanto, os sinais clínicos mais freqüentes nos cães infectados (Tabela 4) foram compatíveis com a de uma resposta aguda. Tizard (2000) postula que apatia, anorexia e febre são decorrentes dos efeitos de interleucinas, como IL1, IL 6 e TNF- α , especialmente sobre o sistema nervoso central e o fígado, na tentativa de eliminar microrganismos que circulam no hospedeiro.

A pirexia encontrada na maioria dos animais fortalece a hipótese que os mesmos encontravam-se em doença aguda, já que este sinal é citado como característico desta fase em estudos experimentais, segundo Harrus et al. (1996a,b), Castro (1997), Almosny (1998), Waner et al. (2000a,b). A persistência de febre após 21 dias é pouco freqüente (WALKER et al., 1970; SMITH et al., 1974).

Frank & Breitschwerdt (1999) associaram o ectoparasitismo por *R. sanguineus* ao curso agudo da ehrlichiose. A presença de carrapatos nos cães em alta freqüência reforçaria a hipótese de que a maioria dos cães que participaram desse experimento cursasse a fase inicial da enfermidade.

Outro fator importante para corroborar essa idéia seria a faixa etária dos animais, que na sua maioria apresentavam idade inferior a uma ano e poderiam estar mais suscetíveis a uma primo-infecção pela rickettsia, contribuindo para o grande número de cães com mórulas presentes nas células mononucleares do sangue.

Ainda com base na Tabela 4, comparando-se os animais verdadeiros-positivos e falsos-negativos, não houve diferença nos sinais clínicos, com exceção das hemorragias, que foram observadas em maior freqüência nos cães FN ($p < 0,0001$), e estão sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Sinais hemorrágicos em cães infectados por *Ehrlichia canis* e frequência (%) das hemorragias simples e múltiplas nos subgrupos verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| | VP | | FN | | Total | |
|----------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | n/N | % | n/N | % | n/N | % |
| Sinais Simples | | | | | | |
| Melena | 2/45 | 4,44 | 1/15 | 6,66 | 3/60 | 5,00 |
| Sufusões | 1/45 | 2,22 | 1/15 | 6,66 | 2/60 | 3,33 |
| Hematoquezia | 1/45 | 2,22 | 1/15 | 6,66 | 2/60 | 3,33 |
| Hifema | 1/45 | 2,22 | 1/15 | 6,66 | 2/60 | 3,33 |
| Petéquias | 1/45 | 2,22 | 1/15 | 6,66 | 2/60 | 3,33 |
| Hematúria | 1/45 | 2,22 | 0/15 | 0,00 | 1/60 | 1,66 |
| Epistaxe | 0/45 | 0,00 | 1/15 | 6,66 | 1/60 | 1,66 |
| Sinais Múltiplos | | | | | | |
| Melena e hematúria | 0/45 | 0,00 | 1/15 | 6,66 | 1/60 | 1,66 |
| Melena e sufusões | 0/45 | 0,00 | 1/15 | 6,66 | 1/60 | 1,66 |
| Petéquias e hifema | 0/45 | 0,00 | 1/15 | 6,66 | 1/60 | 1,66 |
| Melena, hifema e epistaxe | 0/45 | 0,00 | 1/15 | 6,66 | 1/60 | 1,66 |
| Melena, hifema e equimoses | 0/45 | 0,00 | 1/15 | 6,66 | 1/60 | 1,66 |
| Total | 7/45 | 15,55 | 11/15 | 73,33 | 18/60 | 30,0 |

Não ocorreu diferença significativa entre os animais VP e FN em relação aos sinais de hemorragia. No grupo controle, não foi registrada alteração clínica nos animais sugestiva de hemorragia.

Nos cães verdadeiros-positivos, apenas sete animais (15,56%) apresentaram algum tipo de hemorragia. Nos falsos-negativos, em 73,3% foram observados este distúrbio, com cinco animais, 45,45%, evidenciando múltiplos sinais hemorrágicos, que foram observados também por Huxsoll et al. (1969), Huxsoll et al. (1972) e Codner & Farris-Smith (1986).

Os sinais hemorrágicos mais comuns (Figura 4) apresentavam-se sob a forma de melena e na pele, como foi também verificado por Waddle & Littman (1988). Contudo, estes achados são contrários aos de Huxsoll et al. (1970), Walker et al. (1970), Harvey et al. (1979), Troy et al. (1980), Price et al. (1987), Harrus et al. (1997), Munhóz & Babo (1998) e Frank & Breitschwerdt (1999), que descreveram epistaxe como sinal mais comum em animais com desordem hemorrágica. Nesse caso, ocorreu uma provável variação na patogenicidade entre isolados.

Em relação às oftalmopatias, hifema foi o achado mais freqüente e em alguns casos foi acompanhado de descolamento de retina, concordando com os achados de Harrus et al. (1998b). Este distúrbio seria ocasionado pela estase das veias orbitais, como verificaram Gould et al. (2000), ao contrário de Panciera et al. (2001), que registraram inflamação mais intensa no corpo ciliar em relação à coróide, íris e retina.

Segundo Neer (1998), os distúrbios hemorrágicos ocorrem especialmente em animais em fase crônica, como conseqüência de disfunção plaquetária, vasculite, alteração da pressão oncótica (HARRUS et al., 1998b) ou conseqüência da deposição de imunocomplexos (PEDERSEN, 1999; HARRUS et al., 2001a). Para Frank & Breitschwerdt (1999), a presença de carrapatos nesses animais não passaria de mera casualidade. Este achado evidencia que em animais FN a infecção crônica poderia ser considerada mais freqüente, uma vez que ocorreu significativo aumento na relação de cães apresentando hemorragias, o que reforçaria a prerrogativa de que a ehrlichiose é de difícil classificação em relação à sua fase, especialmente em áreas endêmicas.

Alguns achados que ocorreram em baixa freqüência foram dificuldade locomotora (7; 11,66%), miosite (2; 3,33%), icterícia (1; 1,66%) e ataxia (1; 1,66%), que têm sido reportados na literatura como sinais pouco observados na ehrlichiose mas que podem estar associados à doença (BELLAH et al., 1986; MEINKOTH et al., 1989; THILAGAR et al., 1990; KEYSARY et al., 1996; HARRUS et al., 1997).

As alterações neurológicas bem como a miosite e dificuldade locomotora podem ser consequência de infiltrado plasmocitário ou deposição de imunocomplexos, segundo opinião de Hildebrandt et al. (1973) e Waddle & Littman (1988).

No animal que apresentou icterícia, diagnosticou-se co-infecção por *Babesia canis*, que foi o provável responsável pelo aparecimento deste sinal.

Quando utilizada a regressão logística, a infestação por carrapatos e a palidez de mucosas foram as variáveis clínicas relacionadas com o diagnóstico de ehrlichiose ($p < 0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Achados clínicos associados com ehrlichiose canina, verificados pela regressão logística ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Variável | b | EP-b | IC-95% | p-value |
|---------------------|--------|--------|-----------------|----------|
| Carrapato | 0,6920 | 0,0717 | 0,5491 – 0,8348 | < 0,0001 |
| Mucosas hipocoradas | 0,1085 | 0,0520 | 0,0048 – 0,2122 | 0,0403 |

β: valor da estatística; EP: erro-padrão; IC: intervalo de confiança

Esse resultado foi contraditório às frequências apresentadas na Tabela 4. Contudo, como a regressão múltipla agrupa todos os dados conjuntamente e os achados de mucosas hipocoradas e presença de carrapatos foram os únicos sinais observados em alguns casos, ao contrário do que aconteceu com a apatia, febre e anorexia, que ocorrem de forma simultânea na maioria dos cães, a sua correlação com a ehrlichiose foi maior.

4.3 ACHADOS HEMATOLÓGICOS

Na Tabela 8 são comparadas as médias do leucograma, contagem plaquetária, proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio plasmático dos animais.

Tabela 8 - Comparação dos resultados do hemograma, contagem plaquetária, proteínas plasmáticas totais (PPT) e fibrinogênio plasmático em cães infectados e não infectados (controle) por *Ehrlichia canis*, e valores normais de referência (Jain, 1993), pelo teste *t* de Student ou *u* de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisas de esfregaço de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Variável | Média* \pm Desvio-padrão | | Valor de Referência [#] | Estatística** | p-value |
|--|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------|----------|
| | Infectados | Controle | | | |
| Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) | 3,76 ^a \pm 1,62 | 6,27 ^b \pm 0,77 | 5,5 – 8,5 | <i>t</i> =8,62 | < 0,0001 |
| Hemoglobina (g/dl) | 8,87 ^a \pm 3,74 | 15,39 ^b \pm 2,03 | 12,0 – 18,0 | <i>t</i> =9,52 | < 0,0001 |
| Volume globular (%) | 27,53 ^a | 46,00 ^b | 37,0 – 55,0 | <i>u</i> =145,50 | < 0,0001 |
| VCM (fl) | 74,56 ^a \pm 9,02 | 71,76 ^a \pm 5,13 | 66,0 – 77,0 | <i>t</i> =1,68 | 0,0958 |
| CHCM (%) | 31,52 ^a \pm 2,78 | 33,88 ^b \pm 2,06 | 32,0 – 36,0 | <i>t</i> =4,36 | < 0,0001 |
| HCM (pg) | 23,87 ^a \pm 2,90 | 24,74 ^a \pm 2,48 | 19,5 – 24,5 | <i>t</i> =1,48 | 0,1425 |
| Leucócitos Totais ($\times 10^3/\mu\text{l}$) | 7,4 ^a | 10,90 ^b | 6,0 – 17,0 | <i>u</i> =698,50 | 0,0068 |
| Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) | | | | | |
| Bastonetes | 0,67 ^a | 0,00 ^b | 0 – 0,3 | <i>u</i> =699,00 | 0,0060 |
| Neutrófilos | 5,23 ^a | 7,18 ^a | 3,0 – 11,5 | <i>u</i> =801,00 | 0,0553 |
| Eosinófilos | 1,2 ^a | 0,17 ^b | 0,1 – 1,25 | <i>u</i> =496,00 | <0,0001 |
| Monócitos | 0,28 ^a \pm 0,29 | 0,35 ^a \pm 0,27 | 0,15 – 1,35 | <i>t</i> =1,06 | 0,2942 |
| Linfócitos | 2,49 ^a | 2,48 ^a | 1,0 – 4,8 | <i>u</i> =991,50 | 0,6545 |
| Plaquetas ($\times 10^5/\mu\text{l}$) | 2,25 ^a \pm 5,44 | 7,66 ^b \pm 1,24 | 2,0 – 5,0 | <i>t</i> =8,10 | < 0,0001 |
| PPT (g/dl) | 6,62 ^a \pm 1,83 | 7,25 ^a \pm 0,84 | 6,0 – 8,0 | <i>t</i> =1,89 | 0,0616 |
| Fibrinogênio (mg/dl) | 200,00 ^a | 200,00 ^a | 200 - 400 | <i>u</i> =952,00 | 0,4470 |

* ou mediana, nos casos em que o valor de *p* teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi $\geq 0,05$.

[#] Valores de referência (Jain, 1993). ** Teste *t* de Student ou *u* de Mann-Whitney, para dados não emparelhados. Médias ou medianas seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas

Nos animais infectados, as médias das contagens de hemácias e de plaquetas, e dos valores de hemoglobina e do volume globular foram inferiores aos descritos na literatura como de referência para a espécie canina (Jain, 1993), e significativamente inferiores para os animais do grupo controle, cujos parâmetros se enquadravam dentro da normalidade.

As contagens de leucócitos totais, bastonetes, eosinófilos também se mostraram significativamente diferentes do grupo controle, porém os valores estavam dentro daqueles considerados normais por Jain (1993).

Os achados hematológicos mais freqüentes nos animais infectados foram trombocitopenia e anemia, com respectivamente 96,66% e 86,67% de freqüência. Essas variáveis foram significativamente associadas com a ehrlichiose ($r^2=63,09\%$), que também apontou a tendência à associação significativa para a concentração de proteínas plasmáticas totais (Tabela 9).

Tabela 9 - Variáveis hematológicas e leucocitárias associadas ou não com ehrlichiose canina, pela análise de regressão logística ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Variável | b | EP-b | IC-95% | p-value |
|---------------|------------------------|-----------------------|---|---------|
| Hemácias | -0,1218 | 0,0268 | -0,1752 - -0,0685 | <0,0001 |
| Reticulócitos | -0,0055 | 0,0501 | -0,1054 - 0,0943 | 0,9121 |
| Leucócitos | 0,0003 | 0,0003 | -0,0003 - 0,0008 | 0,3225 |
| Bastonetes | 0,0003 | 0,0002 | -0,0002 - 0,0007 | 0,2867 |
| Neutrófilos | 0,0005 | 0,0003 | -0,0002 - 0,0011 | 0,1572 |
| Eosinófilos | -0,0003 | 0,0001 | -0,0006 - -1,01x10 ⁻⁵ | 0,0425 |
| Monócitos | 0,0002 | 0,0001 | -9,41x10 ⁻⁵ - 0,0004 | 0,2169 |
| Linfócitos | 1,399x10 ⁻⁵ | 0,0001 | -0,0002 - 0,0002 | 0,9082 |
| Plaquetas | -1,72x10 ⁻⁶ | 3,45x10 ⁻⁷ | -2,41x10 ⁻⁶ - -1,03x10 ⁻⁶ | <0,0001 |
| Fibrinogênio | -0,0001 | 0,0003 | -0,0008 - 0,0005 | 0,6448 |
| Proteína | 0,0421 | 0,0241 | -0,0058 - 0,0900 | 0,0839 |

β: valor da estatística; EP: erro-padrão; IC: intervalo de confiança

Anemia e trombocitopenia também foram os mais comuns achados hematológicos constatados por Troy et al. (1980), Waddle & Littman (1988), Woody & Hoskins (1991), Meneses (1995), Harrus et al. (1996b), Keysary (1996) e Frank & Breitschwerdt (1999).

Na Tabela 10 são apresentados os valores da sensibilidade e especificidade, e também os valores preditivos negativo e positivo para a anemia e trombocitopenia para o diagnóstico da ehrlichiose canina.

Tabela 10 - Avaliação da ocorrência de anemia e trombocitopenia como marcadores de ehrlichiose frente aos resultados da PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003. Estimativa \pm erro-padrão (intervalo de confiança de 95%)

| Estimativa | Anemia | Trombocitopenia |
|--------------------|--|--|
| Sensibilidade | 0,7833 \pm 0,0532 (0,6580 – 0,8793) | 0,9667 \pm 0,0232 (0,8847 – 0,9959) |
| Especificidade | 0,9143 \pm 0,0473 (0,7694 – 0,9820) | 0,5714 \pm 0,0836 (0,3935 – 0,7368) |
| Eficiência | 0,8316 \pm 0,0384 (0,7410 – 0,9006) | 0,8211 \pm 0,0393 (0,7290 – 0,8922) |
| VPP | 0,9400 \pm 0,0336 (0,8345 – 0,9875) | 0,7945 \pm 0,0473 (0,6838 – 0,8802) |
| VPN | 0,7111 \pm 0,0676 (0,5569 – 0,8363) | 0,9091 \pm 0,0613 (0,7084 – 0,9888) |
| Falso-positivo | 0,0857 \pm 0,0473 (0,0180 – 0,2306) | 0,4286 \pm 0,0836 (0,2632 – 0,6065) |
| Falso-negativo | 0,2167 \pm 0,0532 (0,1207 – 0,3420) | 0,0333 \pm 0,0232 (0,0041 – 0,1153) |
| Kappa (κ) | 0,6584 \pm 0,0760 (0,5094 – 0,8074) | 0,5832 \pm 0,0862 (0,4142 – 0,7522) |
| CRP | 0,8545 \pm 0,0360 (0,7840 – 0,9251) | 0,8722 \pm 0,0307 (0,8119 – 0,9324) |
| CRN | 0,8000 \pm 0,0490 (0,7040 – 0,8960) | 0,7018 \pm 0,0690 (0,5664 – 0,8371) |

VPP: valor preditivo do resultado positivo; VPN: valor preditivo do resultado negativo
CRP: concordância de resultados positivos; CRN: concordância de resultados negativos.

Os valores da sensibilidade, especificidade, e os valores preditivos registrados na Tabela 10 foram muito próximos daqueles reportados Davoust et al. (1991), que registraram VPP de 75,0% e VPN de 94,0%, ao passo que a variável apresentou-se 85,7% sensível e 88,8% específica para o diagnóstico da doença.

Pelo cálculo da sensibilidade e especificidade combinadas em paralelo

entre a trombocitopenia e anemia, verificou-se que estes índices foram, respectivamente, de 99,28 e 52,24%. Segundo Medronho & Perez (2002), os testes em paralelo geralmente são solicitados quando se necessita de um diagnóstico rápido. Os autores definem que esta análise aumenta a sensibilidade das variáveis quando utilizadas isoladamente, mas, por outro lado, diminui a especificidade.

A comparação dos achados hematológicos entre os animais verdadeiros-positivos e falsos-negativos estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11 - Achados hematológicos observados em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e comparação da frequência em animais verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN), pelo teste exato de Fisher ($\alpha=0,05$), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Achado | Total | | VP | | FN | | p-value |
|------------------|-------|-------|-------|--------------------|-------|--------------------|---------|
| | n/N | % | n/N | % | n/N | % | |
| Anemia | 52/60 | 86,67 | 37/45 | 82,12 ^a | 15/15 | 100,0 ^a | 0,1824 |
| Leucocitose | 5/60 | 8,33 | 5/45 | 11,11 ^a | 0/15 | 0,00 ^a | 0,3180 |
| Leucopenia | 19/60 | 31,66 | 11/45 | 24,44 ^a | 8/15 | 53,33 ^a | 0,0550 |
| Monocitose | 11/60 | 18,33 | 10/45 | 22,22 ^a | 1/15 | 6,7 ^a | 0,2615 |
| Neutrofilia | 6/60 | 10,00 | 5/45 | 11,21 ^a | 1/15 | 6,7 ^a | 1,0000 |
| Neutropenia | 16/60 | 26,66 | 4/45 | 8,88 ^a | 7/15 | 46,7 ^b | 0,0031 |
| Eosinofilia | 1/60 | 1,66 | 1/45 | 2,22 ^a | 0/15 | 0,0 ^a | 1,0000 |
| Monocitose | 11/60 | 18,33 | 10/45 | 22,22 ^a | 1/15 | 6,7 ^a | 0,2615 |
| Linfopenia | 27/60 | 45,00 | 16/45 | 35,55 ^a | 11/15 | 73,33 ^b | 0,0162 |
| Trombocitopenia | 58/60 | 96,66 | 44/45 | 97,77 ^a | 14/15 | 93,33 ^a | 0,4407 |
| Pancitopenia | 19/60 | 31,66 | 11/45 | 24,44 ^a | 8/15 | 53,33 ^a | 0,0550 |
| Hiperproteinemia | 11/60 | 18,33 | 5/45 | 11,11 ^a | 6/15 | 40,00 ^b | 0,0209 |
| Hipoproteinemia | 24/60 | 40,00 | 20/45 | 44,44 ^a | 4/15 | 26,7 ^a | 0,3618 |

Freqüências seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas

Os dados apresentados na Tabela 11 apontam para uma maior frequência de diminuição de valores hematológicos nos animais infectados.

Em relação à frequência de animais anêmicos e trombocitopênicos, não houve diferença significativa entre os subgrupos de animais infectados.

Entre os subgrupos, observou-se maior frequência de animais linfopênicos, neutropênicos e com hiperproteinemia.

Houve tendência para que o grupo de falsos-negativos apresentassem maior frequência de animais com leucopenia e pancitopenia.

Estes resultados mais uma vez contribuem para estimar que os animais em que não foram encontradas mórulas apresentassem a fase crônica da enfermidade, uma vez que a diminuição de leucócitos, acompanhado de anemia e trombocitopenia é comumente atribuída à cronicidade da ehrlichiose (SMITH et al., 1974; BUHLES Jr. et al., 1975; PRICE et al., 1987; HARRUS et al., 1999).

Embora uma baixa frequência (8,33%) de animais infectados tenha apresentado leucocitose, não houve diferença significativa entre os subgrupos.

Em relação aos achados do eritrograma, a distribuição nas contagens de hemácias, na concentração de hemoglobina e no valor do hematócrito entre animais verdadeiros-positivos e falsos-negativos pode ser observada nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

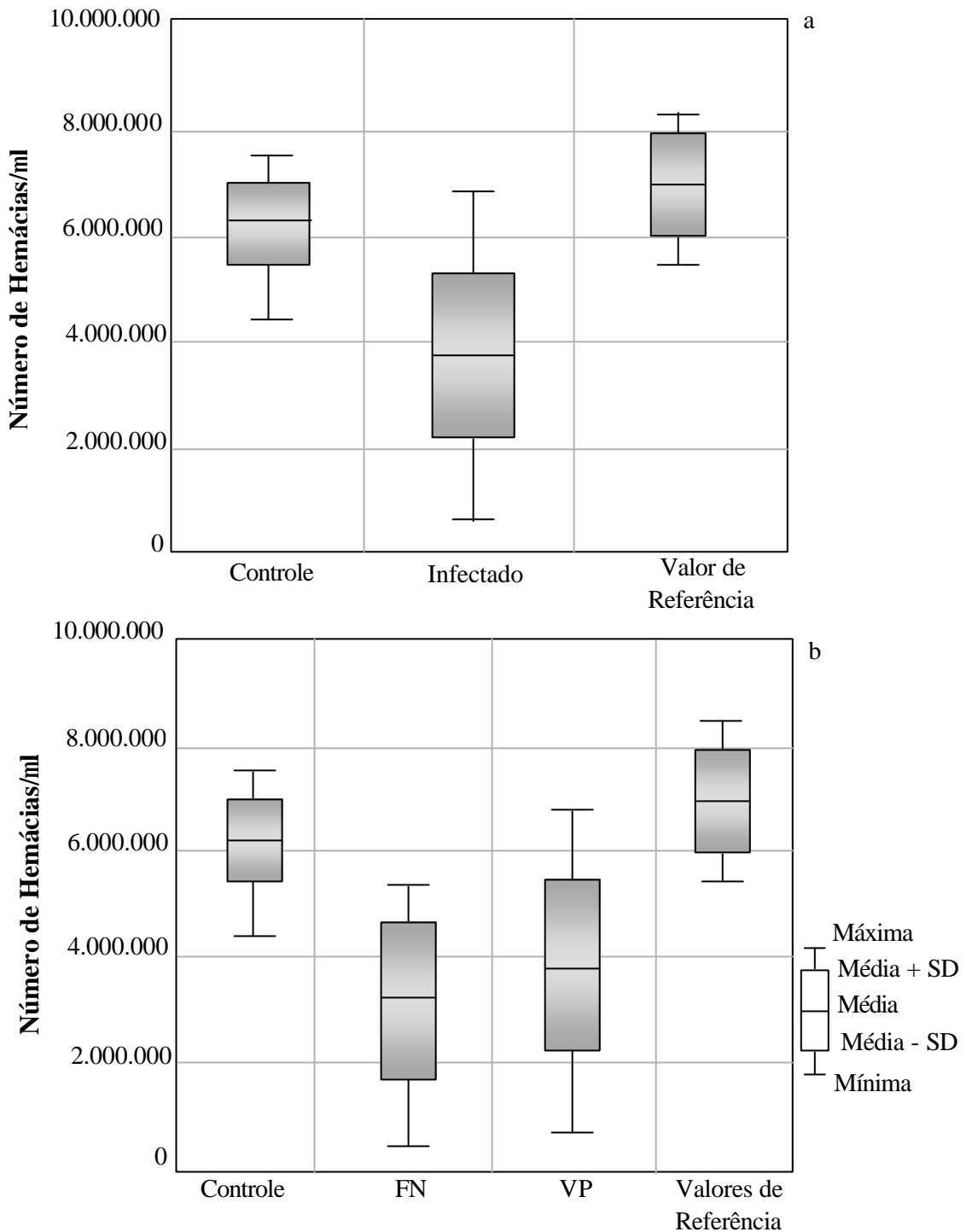


Figura 5 – Distribuição do número de hemácias (μl de sangue) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

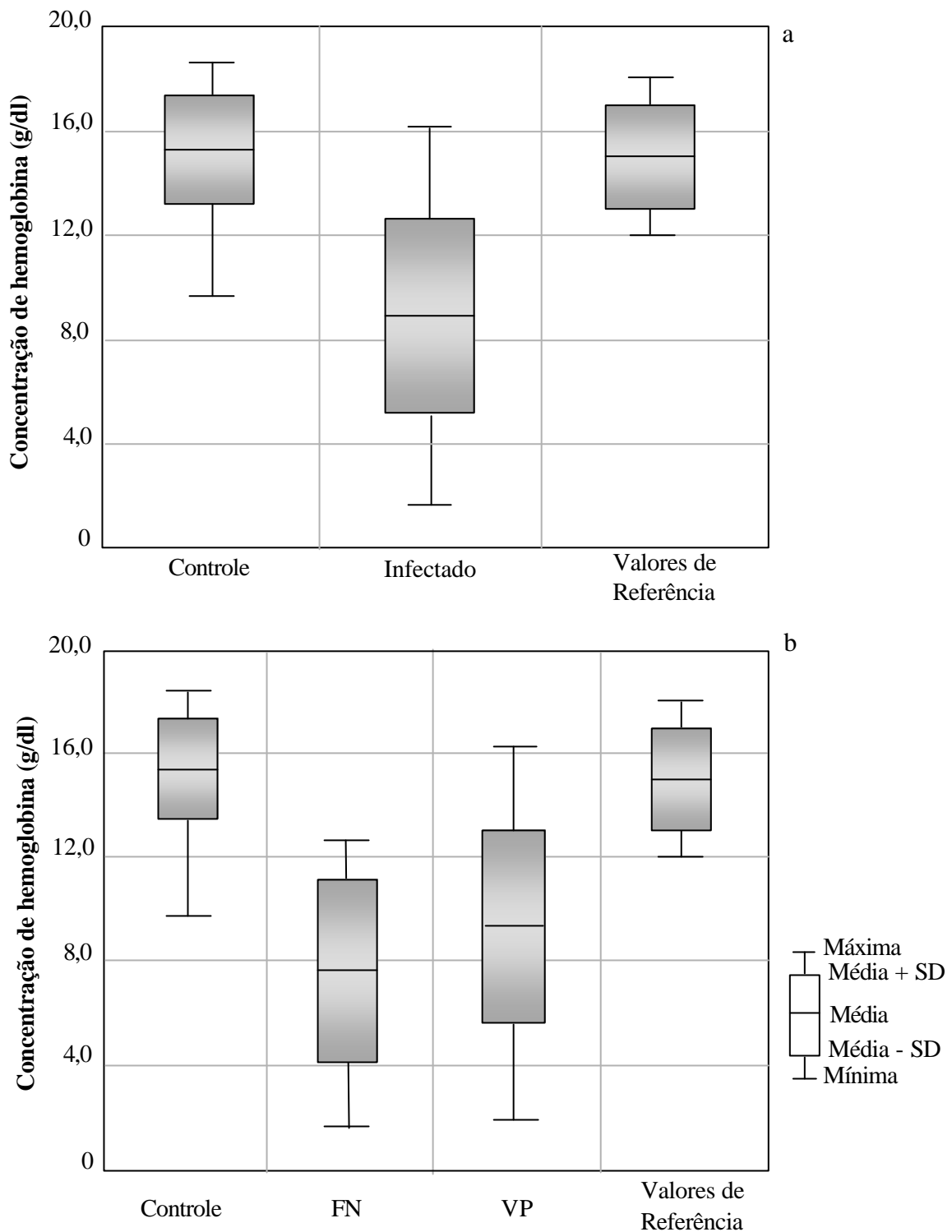


Figura 6 – Distribuição da concentração de hemoglobina (g/dl) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

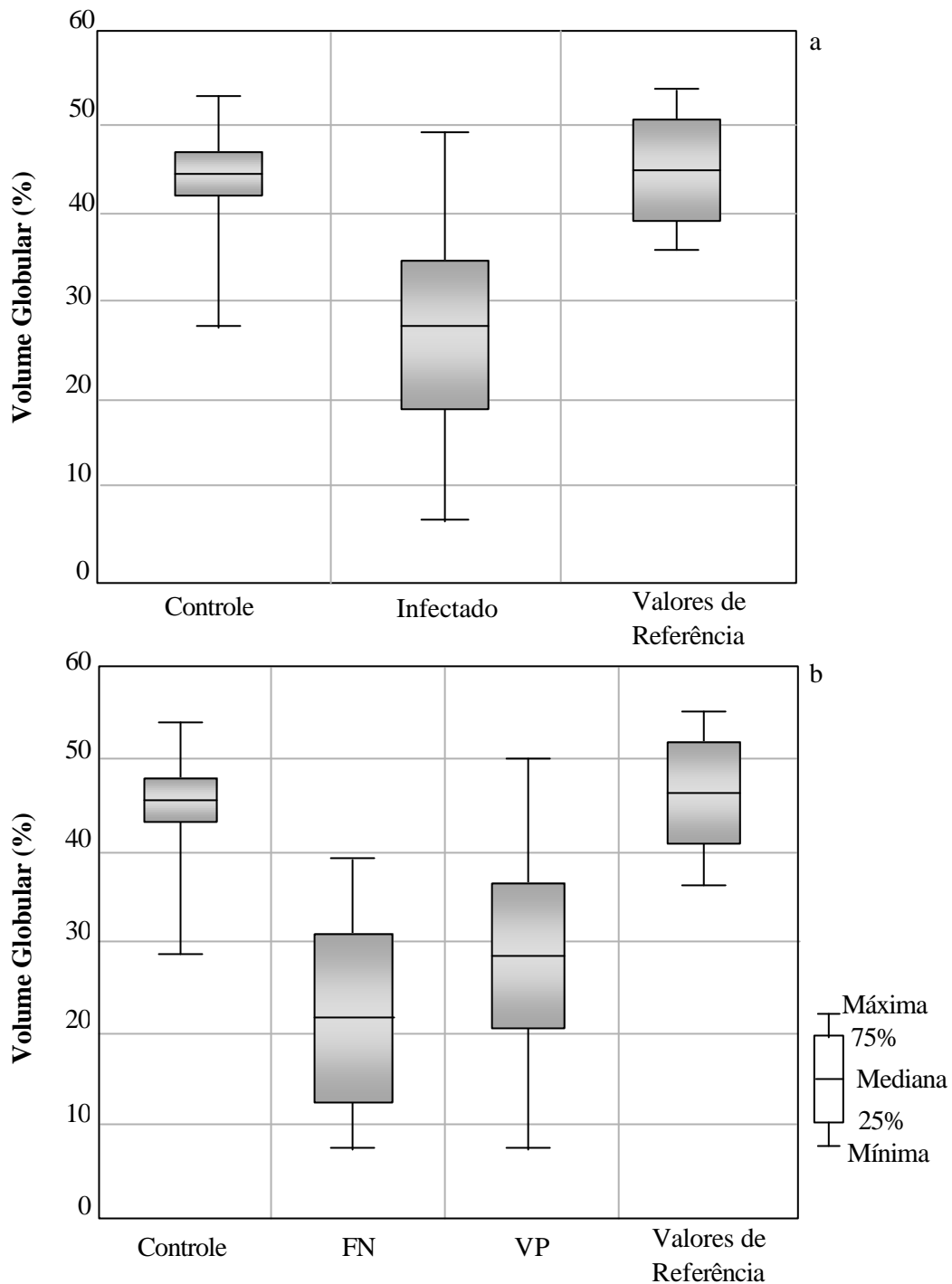


Figura 7 – Distribuição do volume globular (%) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

A anemia foi mais freqüente nos animais FN, ocorrendo em todos os animais. Contudo, não houve diferença significativa entre os subgrupos, mesmo sendo os valores médios dos FN para hemácias, hemoglobina e volume globular, inferiores aos encontrados nos VP (Tabela 11; Figuras 5, 6 e 7) .

Com base nos valores hematimétricos e contagem de reticulócitos, observou-se que 55,0% dos animais infectados apresentaram anemia arregenerativa, não havendo diferença entre os subgrupos. Este tipo de distúrbio é comum em animais com ehrlichiose (BUHLES Jr. et al., 1975; TROY et al., 1980; KUEHN & GAUNT, 1985; FRANK & BREITSCHWERDT, 1999) e pode ser conseqüência do encurtamento da vida e comprometimento na produção das hemácias e perda de sangue (JAIN, 1993).

Em 22,1% dos animais infectados foram observadas hemácias fagocitadas, sugerindo uma resposta imunomediada ocasionada pela *E. canis*, que contribuiria para a anemia. Na ehrlichiose canina, esta alteração tem sido associada ao aumento no seqüestro e destruição de células sangüíneas na fase aguda e à hipoplasia da medula óssea nos casos crônicos (SMITH et al., 1974; BUHLES Jr. et al., 1975; PRICE et al., 1987; WADDLE & LITTMAN, 1988; HARRUS et al., 1999). Estes postulados podem ser utilizados para reforçar a hipótese de que os animais em que foram constatadas mórulas estivessem no curso agudo da enfermidade, ao passo que a fase crônica seria observada naqueles em que a citologia foi negativa, como foi o caso dos FN, em que a anemia foi mais acentuada (Figuras 5, 6 e 7), provavelmente pelo comprometimento da medula óssea.

As diferenças entre as contagens de plaquetas dos animais não infectados e infectados e seus subgrupos estão dispostas na Figura 8.

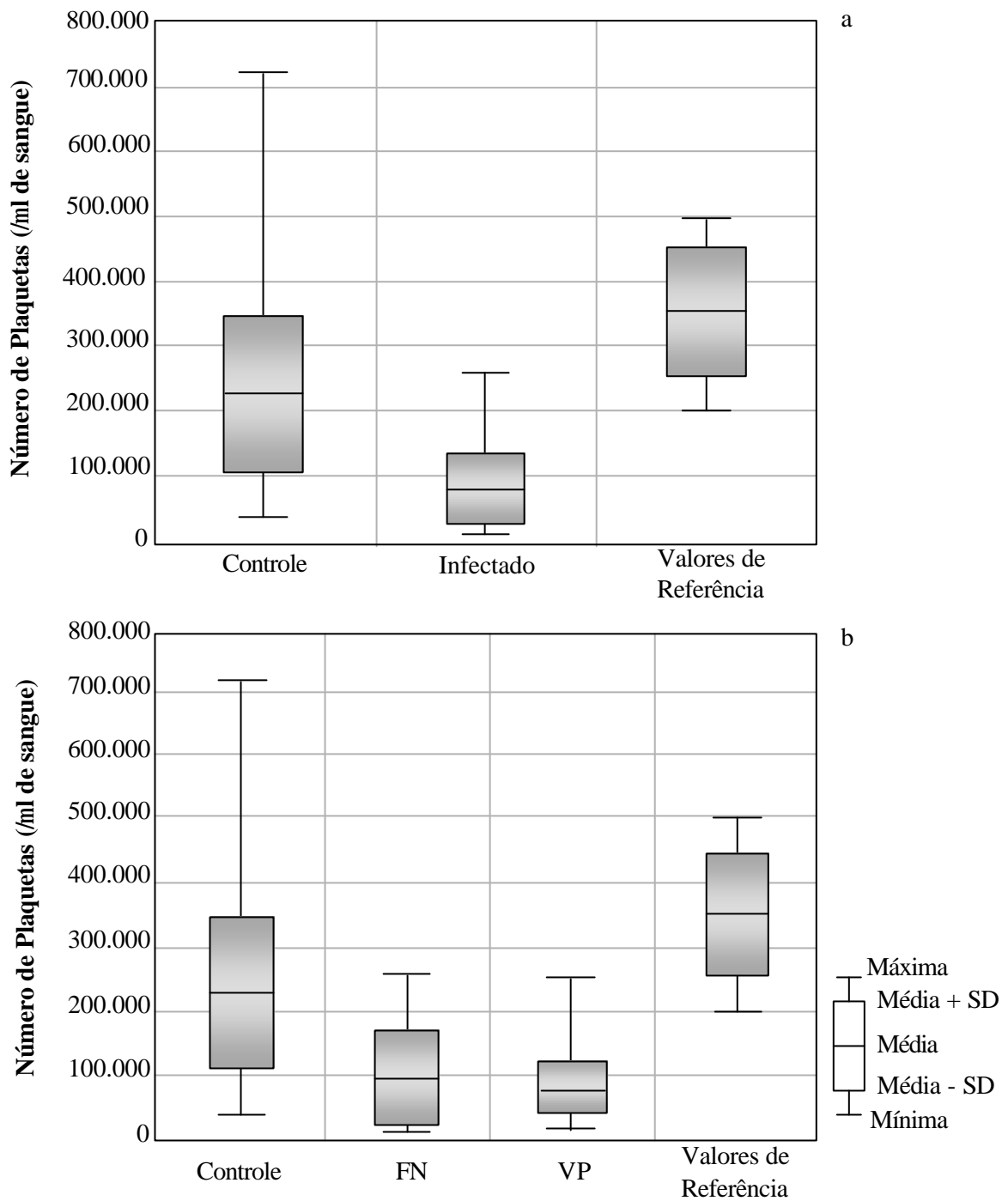


Figura 8 – Distribuição da contagem plaquetária (μl de sangue) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

No grupo controle a variação foi de 33.500 a 726.000/ μ l de sangue, porém os valores médios estavam dentro da normalidade.

No grupo infectado, a contagem plaquetária média esteve abaixo dos valores de referência (Figura 8), havendo uma distribuição homogênea nos subgrupos VP e FN. As menores plaquetometrias foram, respectivamente, de 18.000 e de 10.000, e a maior delas de 257.500/ μ l para ambos os subgrupos. Considerando-se valores médios, os presentes achados são compatíveis com aqueles apresentados por Kuehn & Gaunt (1985), Waddle & Littman (1988), Troy & Forrester (1990), Frank & Breitschwerdt (1999) e Bulla (2003). Contudo, considerando-se os valores inferiores, que variaram de 143 a 7.000 plaquetas/ μ l de sangue, pode-se considerar que a trombocitopenia dos cães estudados por estes autores foi muito mais severa que nos do presente estudo.

A frequência de trombocitopênicos foi de 90,0%, e muito próxima daquelas documentadas por Troy & Forrester (1990) e por Bulla (2003), que verificaram 100,0% e 98,5% de animais com plaquetopenia, respectivamente, e superiores às encontradas por Kuehn & Gaunt (1985), Harrus et al. (1997), Waddle & Littman (1988) e Frank & Breitschwerdt (1999), correspondentes a 64,0%, 74,0%, 84,0% e 71,0%.

Segundo Pedersen (1999), quando a contagem trombocitária é inferior a 60.000/ μ L de sangue, as plaquetas são de maior tamanho e forma bizarra. Essas alterações foram visualizadas em aproximadamente 50,0% das amostras, que continham macroplaquetas. O consumo e destruição de plaquetas poderiam justificar a presença destes elementos, como foi postulado por Smith et al. (1975), embora a trombocitopenia tenha sido associada a outros fatores em animais com ehrlichiose, destacando-se entre elas a produção de anticorpos anti-plaquetas (WANER et al., 1995), redução da vida média (PIERCE et al., 1977) e da adesão plaquetária (LOVERING et al., 1980).

Com apenas uma exceção, em que a plaquetometria estava dentro dos valores de normalidade (257.500/ μ l de sangue), houve relação direta entre a trombocitopenia e a observação de distúrbios hemorrágicos. Todavia, não houve uma faixa de contagem para a presença destas alterações, excetuando-se as sufusões, que ocorreram quando as plaquetas foram inferiores a 20.000/ μ l. Estes achados contradizem às afirmações de Green (1983), ao considerar que as petéquias e equimoses são observadas quando o valor plaquetário é inferior a 40.000/ μ l de sangue e outros sinais como epistaxe, hematúria e hemorragias do trato gastrintestinal surgem quando eles são inferiores a 20.000/ μ l.

Embora a frequência de animais trombocitopênicos tenha sido alta na investigação realizada por Bulla (2003), o autor referiu que a contagem plaquetária é importante no diagnóstico da ehrlichiose, mas deve ser associada a um teste mais específico, uma vez que esta alteração é comum em outros distúrbios ou infecções. Esta consideração é muito pertinente ao presente estudo, uma vez que no grupo controle 42,86% apresentaram trombocitopenia, sendo que destes, 60,05% tiveram contagem mínima de 100.000 plaquetas/ μ l, considerada como de caráter discreto pelo autor.

Na figura 9 está representada a comparação da contagem leucocitária entre os animais infectados e não infectados por *E. canis*.

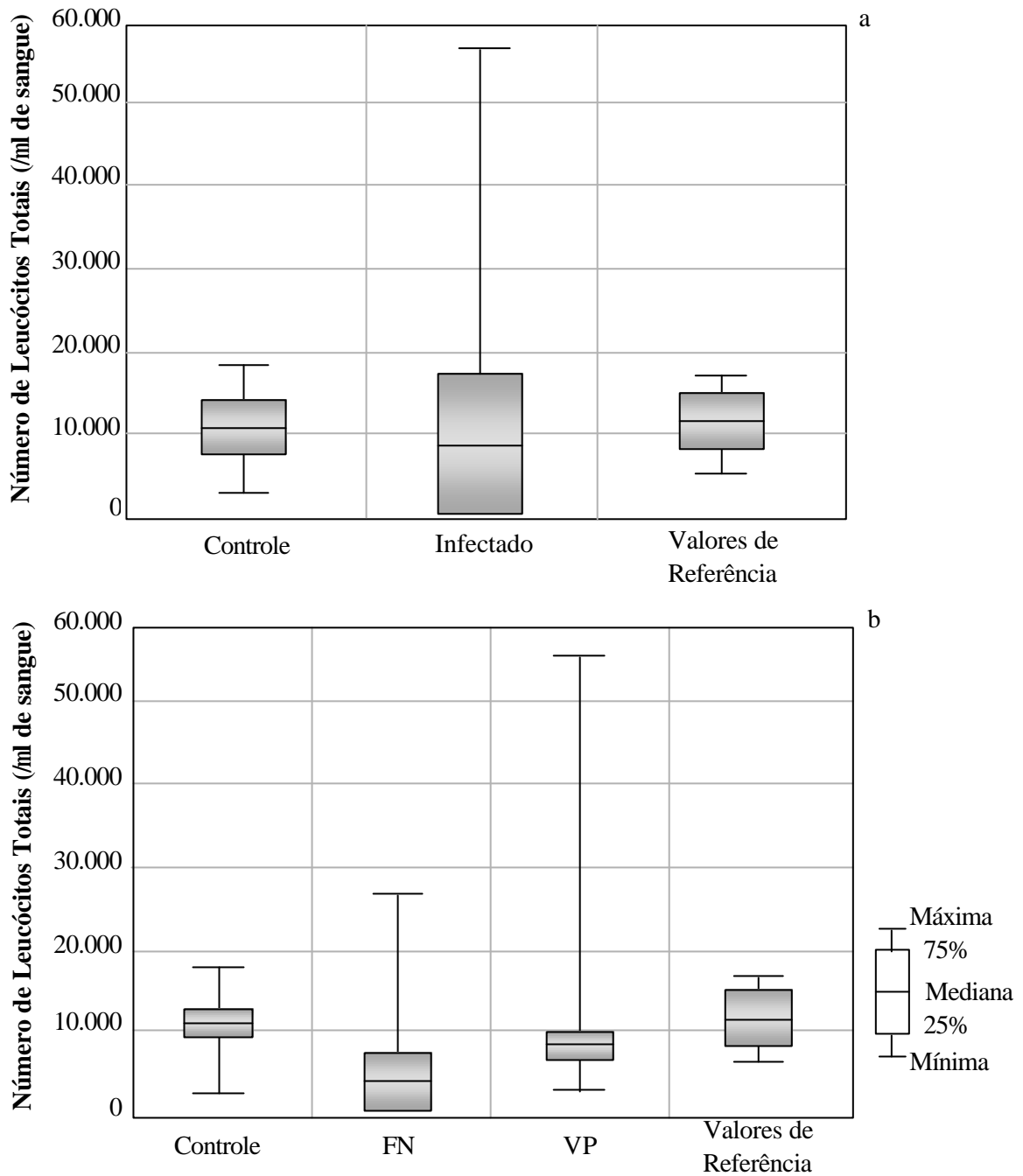


Figura 9 – Distribuição da contagem do número total de leucócitos (/µl de sangue) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

Em relação à contagem leucocitária, houve diferença entre os animais infectados e não infectados por *E. canis* (Tabela 8), porém a variável não foi relacionada à ehrlichiose pela regressão múltipla (Tabela 9). A média nos animais FN foi menor, correspondendo a 4.000 células/ μ l, com variação de 500 a 27.900. Nos cães VP, a média obtida foi de 7.200 leucócitos/ μ l, que esteve dentro dos valores normais de referência, variando de 1.100 a 56.500.

Pancitopenia ocorreu em 31,67% dos animais infectados, não havendo diferença entre a frequência nos VP e FN (Tabela 11). Contudo, neste último subgrupo, o caráter da pancitopenia foi mais grave, com as menores contagens entre os subgrupos (Figura 9), especialmente pela diminuição de neutrófilos e linfócitos, que foi também observada nos estudos conduzidos por Kuehn & Gaunt (1985), Waddle & Littman (1988) e Frank & Breitschwerdt (1999).

Ao contrário da anemia e trombocitopenia, a pancitopenia pode ocorrer transitoriamente em cursos agudos mas é um achado mais comum na fase crônica (SMITH et al., 1974; PRICE et al., 1987; HARRUS et al., 1999), em que o prognóstico torna-se reservado, uma vez que a resposta à terapia medicamentosa é muito pequena para evitar que os pacientes evoluam para o óbito (BUHLES Jr. et al., 1975).

Com base nestes resultados, mais uma vez pode-se afirmar que os cães FN, em sua maioria, estavam em fase crônica, considerando-se que a contagem leucocitária foi muito baixa e que os cães nestas condições evoluíram para óbito mesmo após o tratamento e terapia de suporte recomendada pela literatura (NEER, 1998).

No que diz respeito às proteínas plasmáticas totais, houve uma tendência para sua correlação com ehrlichiose (Tabela 11).

Na Figura 10 está representada a variação da dosagem de proteínas em animais infectados e não infectados por *E. canis* e a comparação entre os animais VP e FN.

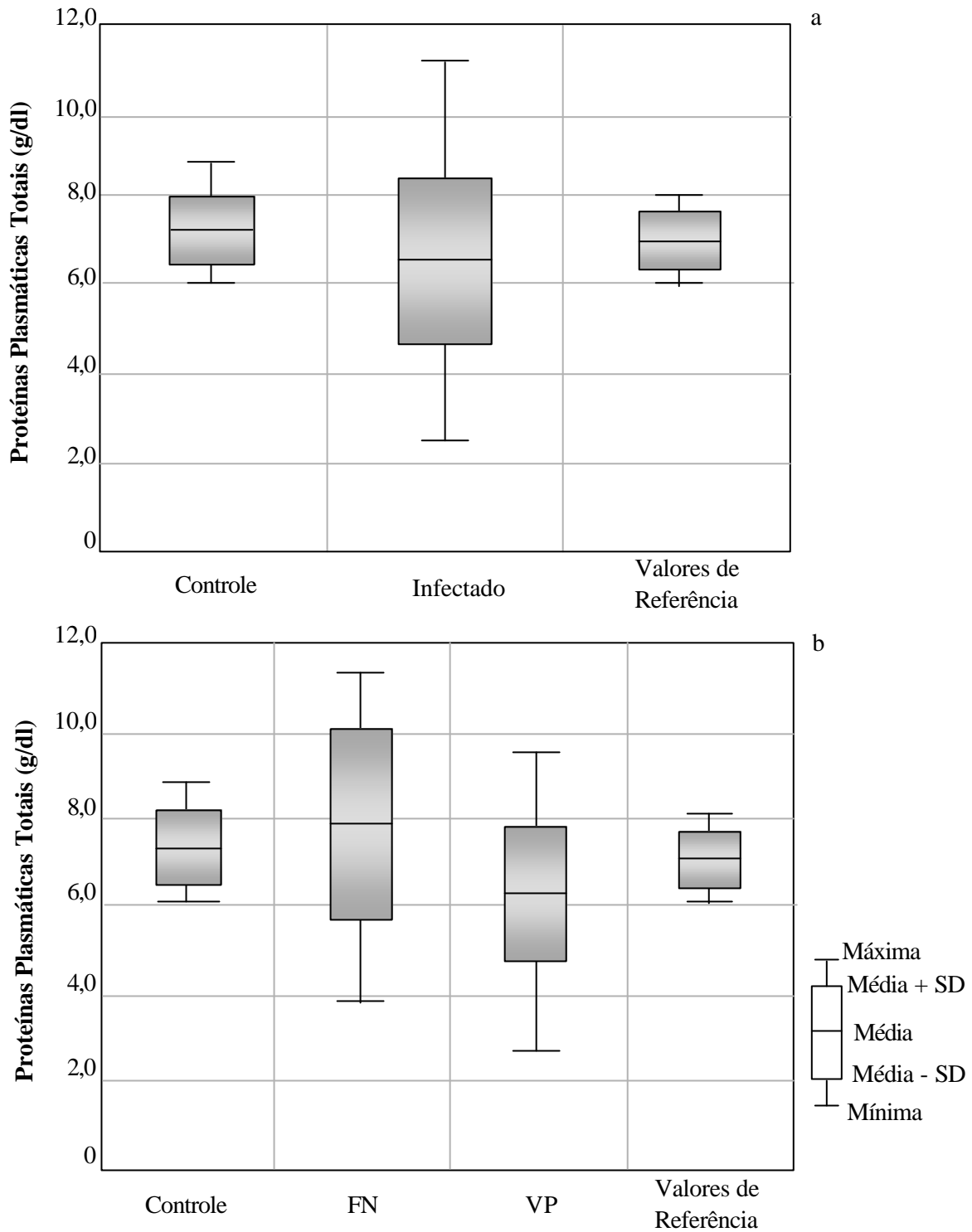


Figura 10 – Distribuição das concentrações plasmáticas das proteínas totais (g/dl) em animais controle e infectados por *Ehrlichia canis* (a), e comparação dos subgrupos de verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) com o grupo controle e os valores de referência (b) descritos por Jain (1993), com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

Verificou-se que hiperproteinemia ocorreu em maior frequência nos animais FN (Tabela 11; Figura 10). Segundo Burghen et al. (1971), nos casos crônicos de ehrlichiose, ocorre resposta imune aos componentes celulares danificados em consequência da doença. Na fase aguda, a elevação de proteína sérica tem sido associada ao aumento de gamaglobulinas em resposta à circulação e imunogenicidade da rickettsia (HOSKINS et al., 1983; PERILLE & MATUS, 1991; RIKIHISA et al., 1994; MICHELS et al., 1995; HARRUS et al., 1996^a; BREITSCHWERDT et al., 1998). Nos animais VP, entretanto, houve considerável número de animais com hipoproteinemia (44,44%), o que poderia ser consequência da anemia ou, como sugerem Woody & Hoskins (1991), da perda de albumina pela urina como mecanismo compensatório para a elevação de proteínas plasmáticas com o objetivo de evitar a hiperviscosidade do sangue.

Houve co-infecção *E. canis* e outros agentes infecciosos transmitidos por carrapatos, que foram diagnosticados pela citologia, conforme apresenta a Tabela 12.

Tabela 12 - Frequência (%) de co-infecção de agentes transmitidos por carrapatos entre cães considerados verdadeiros-positivos (VP) e falsos-negativos (FN) para *Ehrlichia canis*, com base nas técnicas de leucoconcentração, pesquisa de esfregaços de margem de orelha e de sangue periférico, e de PCR, Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Agente | Grupo de Infectados | | | | Total | |
|-------------------------|---------------------|-------|------|------|-------|-------|
| | VP | | FN | | n/N | % |
| | n/N | % | n/N | % | | |
| <i>Anaplasma platys</i> | 12/45 | 26,67 | 1/15 | 6,67 | 13/60 | 21,67 |
| <i>Babesia canis</i> | 5/45 | 11,11 | 0/15 | 0,0 | 5/60 | 8,33 |
| <i>Hepatozoon canis</i> | 1/45 | 2,22 | 1/15 | 6,67 | 2/60 | 3,33 |

A co-infecção de *E. canis* com outros agentes transmitidos por carrapatos (Figuras 11 e 12), especialmente por *Anaplasma platys* ocorreu em maior frequência em animais VP para aquela rickettsia. *Babesia canis* e *Hepatozoon canis* também foram diagnosticados, mas esses protozoários ocorreram em um pequeno número de indivíduos.

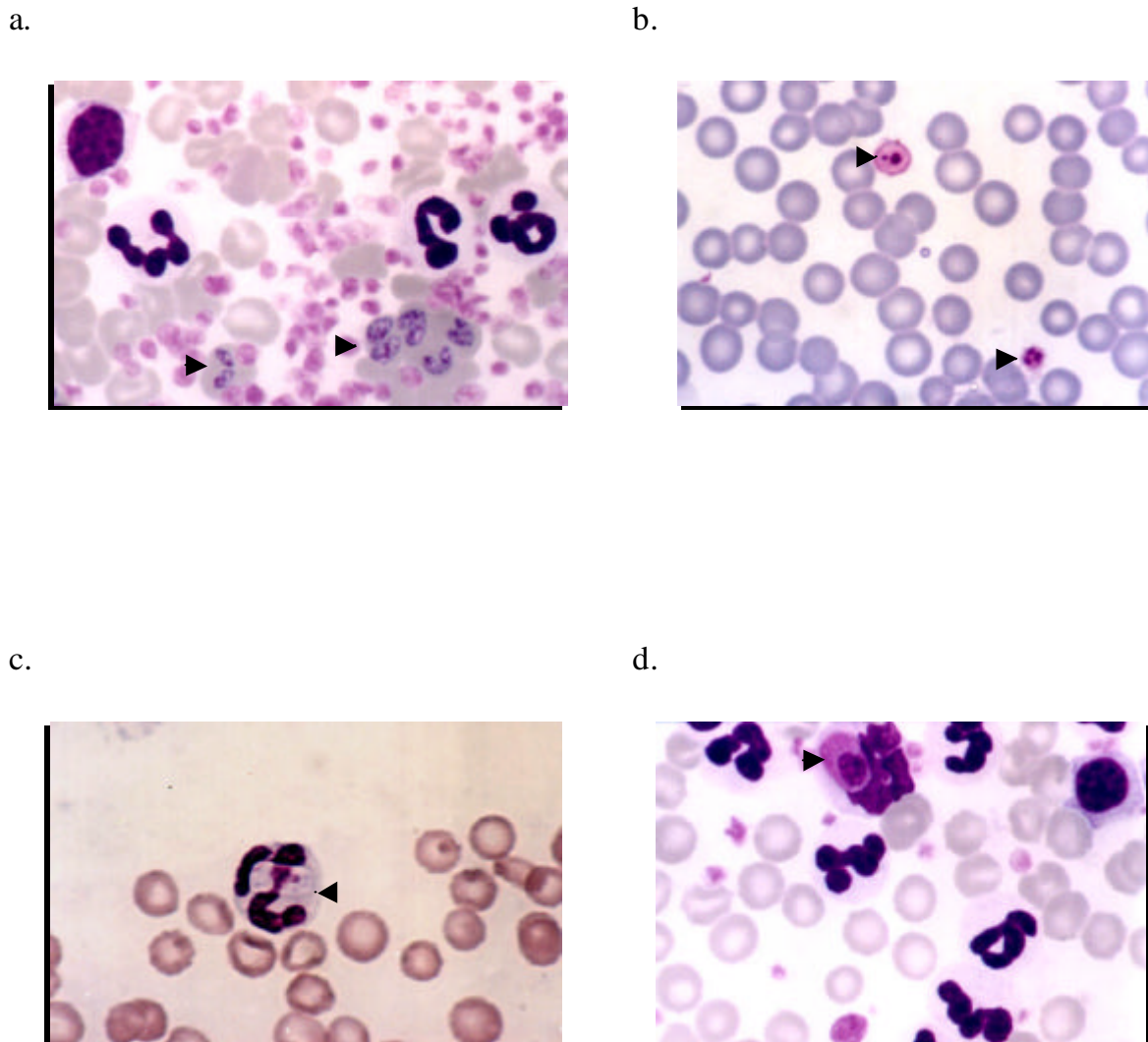


Figura 11 – Agentes transmitidos por carrapatos observados em esfregaços sanguíneos de animais naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*: a. merozoítos de *Babesia canis* em eritrócitos; b. mórulas de *Anaplasma platys* em plaquetas; c. gametócito de *Hepatozoon canis* em neutrófilo. (Diff-quick. 1000X). d. gametócito de *Hepatozoon canis* em neutrófilo corado pelo Leishman para evidenciação do núcleo (1000X). Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

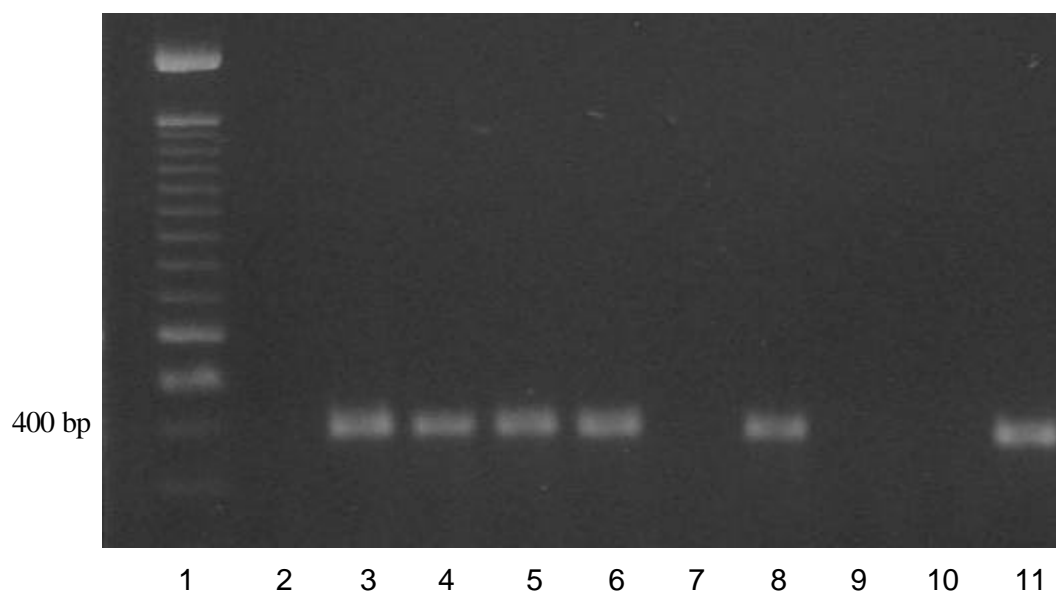


Figura 12 – Resultado de *nested* PCR em gel de agarose, para *Ehrlichia canis* (*E. canis*) e *Anaplasma platys* (*A. platys*), em gel de agarose, corado pelo brometo de etidium. Representação das colunas: 1. Biomarcador (em pares de base (bp)). 2. Amostra negativa; 3. Amostra positiva para *E. canis*; 4. Amostra positiva para *E. canis*; 5. Amostra positiva para *A. platys*; 6. Amostra positiva para *A. platys*; 7. Amostra negativa; 8. Controle positivo para *E. canis*; 9. Controle negativo; ; 10. Controle negativo; 11. Controle positivo para *A. platys*. Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

Segundo Du Pleiss et al. (1990), as infecções múltiplas podem agravar o quadro clínico dos animais. Estes autores e também Klag et al. (1991), postularam que a definição do diagnóstico de ehrlichiose pode ser dificultado por infecções concorrentes uma vez que os sinais clínicos e alterações laboratoriais podem ser semelhantes.

Nesse ensaio, *A. platys* foi o agente que mais concorreu em infecções com *E. canis*. Contudo, torna-se difícil avaliar se a rickettsia contribuiu para a redução plaquetária nos VP, especialmente pelo seu caráter de ocasionar episódios cíclicos de trombocitopenia (HARVEY et al., 1978).

Em dois cães do subgrupo VP foram observados merozoítos de *B. canis* e mórulas de *E. canis* e *A. platys* em uma única amostra. Estes mesmos achados também foram relatados por Kontos & Koutinas (1997) e Kordick et al. (1999). Como o número de animais infectados por estes agentes foi baixo, torna-se difícil afirmar se estes protozoários tiveram participação importante na patogenia da ehrlichiose, como propuseram Du Pleiss et al. (1990).

4.4 COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS

As mórulas de *E. canis* foram detectadas em 73,33% (44/60), 26,67% (16/60) e 13,33% (8/60), quando utilizadas as técnicas de leucoconcentração, esfregaço de margem de orelha e com sangue obtido da jugular, respectivamente.

A frequência de mórulas foi alta, inclusive com a utilização de esfregaço de sangue, contrariando a opinião de Woody & Hoskins (1991) de que apenas um a quatro por cento dos cães apresentam tais estruturas por esta técnica. Provavelmente, o curso agudo observado na maioria dos animais possibilitou o encontro de tais estruturas, como sugerem aqueles autores e Harrus et al. (1997).

A sensibilidade e especificidade das técnicas citológicas, e ainda os valores preditivos negativo e positivo, o valor κ e a concordância dos resultados positivos e negativos com a PCR (padrão-ouro) são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Comparação dos resultados obtidos nos esfregaços realizados com a técnica de leucoconcentração (LC), de sangue obtido da margem de orelha (MO) e de veia jugular (SP), para pesquisa de mórulas de *Ehrlichia canis* frente aos resultados da PCR. Estimativa \pm erro-padrão (intervalo de confiança de 95%). Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Estimativa | Técnicas | | |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | SP | MO | LC |
| Sensibilidade | 13,33 \pm 4,39 (5,94-24,59) | 26,67 \pm 5,71 (16,07-39,66) | 73,33 \pm 5,71 (60,34-83,93) |
| Especificidade | 100,00 \pm 0,00 (90,00-100,00) | 97,14 \pm 2,82 (85,08-99,93) | 100,00 \pm 0,00 (90,00-100,00) |
| Eficiência | 45,26 \pm 5,11 (35,02-55,81) | 52,63 \pm 5,12 (42,12-62,97) | 83,16 \pm 3,84 (74,10-90,06) |
| VPP | 100,00 \pm 0,00 (63,06-100,00) | 94,12 \pm 5,71 (71,31-99,85) | 100,00 \pm 0,00 (91,96-100,00) |
| VPN | 40,23 \pm 5,26 (29,85-51,29) | 43,59 \pm 5,61 (32,39-55,30) | 68,63 \pm 6,50 (54,11-80,89) |
| Falsos-positivos | 0,00 \pm 0,00 (0,00-10,00) | 2,86 \pm 2,82 (0,07-14,92) | 0,00 \pm 0,00 (0,00-10,00) |
| Falsos-negativos | 86,67 \pm 4,39 (75,41-94,06) | 73,33 \pm 5,71 (60,34-83,93) | 26,67 \pm 5,71 (16,07-39,66) |
| Kappa (κ) | 10,18 \pm 3,68 (2,96-17,40) | 18,96 \pm 5,67 (7,84-30,07) | 66,96 \pm 7,11 (53,02-80,89) |
| CRP | 23,53 \pm 6,83 (10,14-36,92) | 41,56 \pm 7,07 (27,70-55,41) | 84,62 \pm 3,80 (77,17-92,06) |
| CRN | 57,38 \pm 5,35 (46,90-67,86) | 60,18 \pm 5,45 (49,50-70,85) | 81,40 \pm 4,57 (72,44-90,35) |

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

CRP: concordância de resultados positivos; CRN: concordância de resultados negativos.

A leucoconcentração apresentou maior sensibilidade (73,33%), especificidade (100,0%) e eficiência (83,16%) em relação às demais técnicas empregadas para pesquisa de mórulas de *E. canis*. Mylonakis et al. (2003) utilizando um método de concentração leucocitária em tubos de ensaio, também notaram aumento na sensibilidade no diagnóstico citológico de ehrlichiose.

Na detecção do agente pela elaboração de distensão sangüínea de margem de orelha, com sensibilidade de 26,67%, houve uma diferença muito grande dos achados de Elias (1991), que encontrou 88,0% de células infectadas por esta técnica.

Não houve diferença significativa entre a localização de mórulas, que foram observadas tanto em linfócitos como em monócitos e, em alguns casos, em ambas as células, como foi descrito por Seibert et al. (1997). Quando a presença de tais estruturas foi restrita a apenas um tipo celular, o seu número na amostra caiu proporcionalmente, o que poderia justificar os dados contraditórios da literatura que indicam a predileção da rickettsia para um determinado leucócito (THILAGAR et al., 1990; MENESES, 1995; KEYSARY et al., 1996).

A presença de mórulas de *E. canis* variou de duas a oito por lâmina, sendo que na leucoconcentração elas ocorreram em maior número. As mórulas apresentavam coloração púrpura e como estruturas compactas ou com corpúsculos difusos no citoplasma das células mononucleares, sendo ainda observada a presença de corpúsculos iniciais (Figura 13). Estas características morfológicas são concordantes com as descritas por Huxsoll et al. (1970), Davoust (1993) e Beaufils et al. (1995).

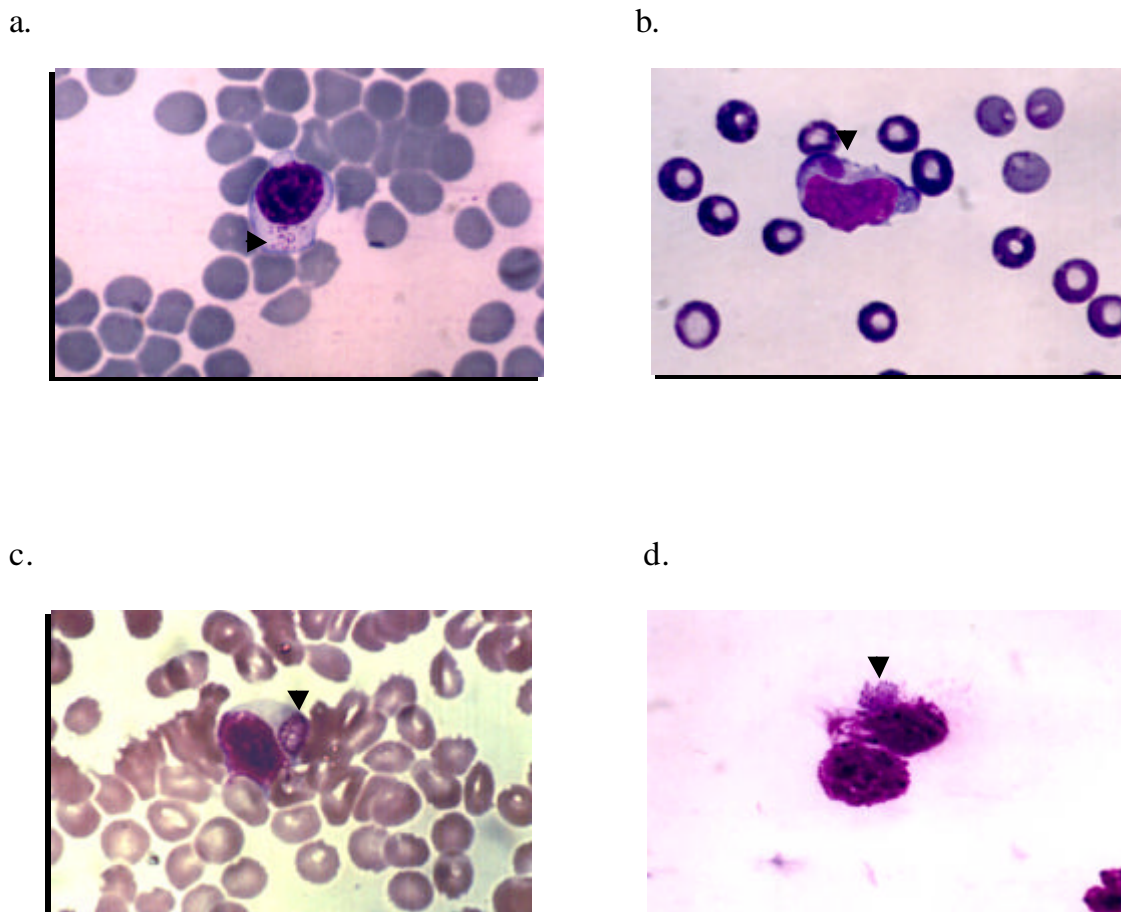


Figura 13 – Estruturas de *Ehrlichia canis* observadas em esfregaços de sangue de cães infectados naturalmente: a. corpúsculos iniciais em linfócitos; b. mórula com corpúsculos condensados no interior de monócito; c. mórula com corpúsculos frouxos no interior de linfócito; d. mórula com corpúsculos de inclusão sendo liberados após ruptura de monócito (Diff-quick. 1000X). Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

Na Tabela 14 são apresentadas as estimativas de sensibilidade e especificidade das técnicas citológicas utilizadas nesse estudo, e também os valores preditivos negativo e positivo, o valor κ e a concordância dos resultados positivos e negativos com a PCR (padrão-ouro), para pesquisa de corpúsculos iniciais de *E. canis*.

Tabela14 - Resultados obtidos nos esfregaços de sangue realizados a partir de técnica de leucoconcentração (LC), e da margem de orelha (MO) e de sangue periférico (SP) em animais infectados por *Ehrlichia canis* para pesquisa de corpúsculos iniciais da rickettsia, em cães naturalmente infectados, frente aos resultados da PCR. Estimativa \pm erro-padrão (intervalo de confiança de 95%). Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Estimativa | Técnicas | | |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | SP | MO | LC |
| Sensibilidade | 26,67 \pm 5,71 (16,07-39,66) | 25,00 \pm 5,59 (14,72-37,86) | 50,00 \pm 6,45 (36,81-63,19) |
| Especificidade | 88,57 \pm 5,38 (73,26-96,80) | 91,43 \pm 4,73 (76,94-98,20) | 80,00 \pm 6,76 (63,06-91,56) |
| Eficiência | 49,47 \pm 5,13 (39,05-59,93) | 49,47 \pm 5,13 (39,05-59,93) | 61,05 \pm 5,00 (50,50-70,89) |
| VPP | 80,00 \pm 8,94 (56,34-94,27) | 83,33 \pm 8,78 (58,58-96,42) | 81,08 \pm 6,44 (64,84-92,04) |
| VPN | 41,33 \pm 5,69 (30,08-53,30) | 41,56 \pm 5,62 (30,43-53,36) | 48,28 \pm 6,56 (34,95-61,78) |
| Falsos-positivos | 11,43 \pm 5,38 (3,20-26,74) | 8,57 \pm 4,73 (1,80-23,06) | 20,00 \pm 6,76 (8,44-36,94) |
| Falsos-negativos | 73,33 \pm 5,71 (60,34-83,93) | 75,00 \pm 5,59 (62,14-85,28) | 50,00 \pm 6,45 (36,81-63,19) |
| Kappa (κ) | 12,31 \pm 6,53 (-0,50-25,11) | 13,14 \pm 6,11 (1,16-25,13) | 26,29 \pm 8,57 (9,58-43,19) |
| CRP | 40,00 \pm 6,93 (26,42-53,58) | 38,46 \pm 7,00 (24,74-52,18) | 61,86 \pm 5,80 (50,49-73,22) |
| CRN | 56,36 \pm 5,67 (45,26-67,47) | 57,14 \pm 5,59 (46,19-68,10) | 60,22 \pm 6,00 (48,45-71,98) |

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

CRP: concordância de resultados positivos; CRN: concordância de resultados negativos.

Detectou-se 38,95% de amostras com inclusões citoplasmáticas semelhantes a corpúsculos iniciais, especialmente nos animais verdadeiros-positivos e pela técnica de leucoconcentração. Estes dados são coincidentes com os apresentados por Thirunavukkarasu et al. (1994), ao registrarem a presença de corpúsculos iniciais apenas em capa flogística em cães com ehrlichiose canina.

Apesar de Elias (1991) e Beaufils et al. (1995) considerarem a detecção de corpúsculos iniciais como importante ferramenta para o diagnóstico da ehrlichiose, constatou-se baixa sensibilidade e eficiência nas técnicas citológicas utilizadas nesse ensaio.

A técnica de leucoconcentração apresentou maior sensibilidade na detecção de *Anaplasma platys* e de *Hepatozoon canis*. Porém, para a pesquisa de *Babesia canis*, os esfregaços confeccionados com sangue periférico e da margem de orelha mostraram maior frequência de merozoítos (Tabela 15).

Tabela 15 - Comparação dos resultados obtidos nos esfregaços realizados pela técnica de leucoconcentração (LC), e de sangue obtido da margem de orelha (MO) e da veia jugular (SP) para pesquisa de agentes transmitidos por carrapato, em animais naturalmente infectados, analisados pelo teste Q de Cochran ($\alpha=0,05$). Presidente Prudente, São Paulo, 2003

| Variável | Amostras Positivas (%) | | | Q | p-value |
|-------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------|----------|
| | LC | MO | SP | | |
| <i>Anaplasma platys</i> | 15,79 ^a | 3,16 ^b | 3,16 ^b | 22,15 | < 0,0001 |
| <i>Babesia canis</i> | 3,16 ^a | 5,26 ^a | 5,26 ^a | 4,00 | 0,1353 |
| <i>Hepatozoon canis</i> | 3,16 ^a | 0,00 ^b | 0,00 ^b | 6,00 | 0,0498 |

Frequências seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas.

Esse fato alerta para a necessidade de se realizar pelo menos duas das técnicas para aumentar as chances de diagnóstico de co-infecções por agentes transmitidos por carrapatos, possibilitando a adequação dos tratamentos, especialmente em áreas onde as condições climáticas são favoráveis à perpetuação de carrapatos.

Algumas alterações morfológicas nas células sangüíneas dos animais infectados, das quais se destacaram as macroplaquetas, monócitos ativados, leucofagocitose e eritrofagocitose (Figura 14), foram mais frequentes quando foi utilizada a técnica de leucoconcentração (Tabela 16).

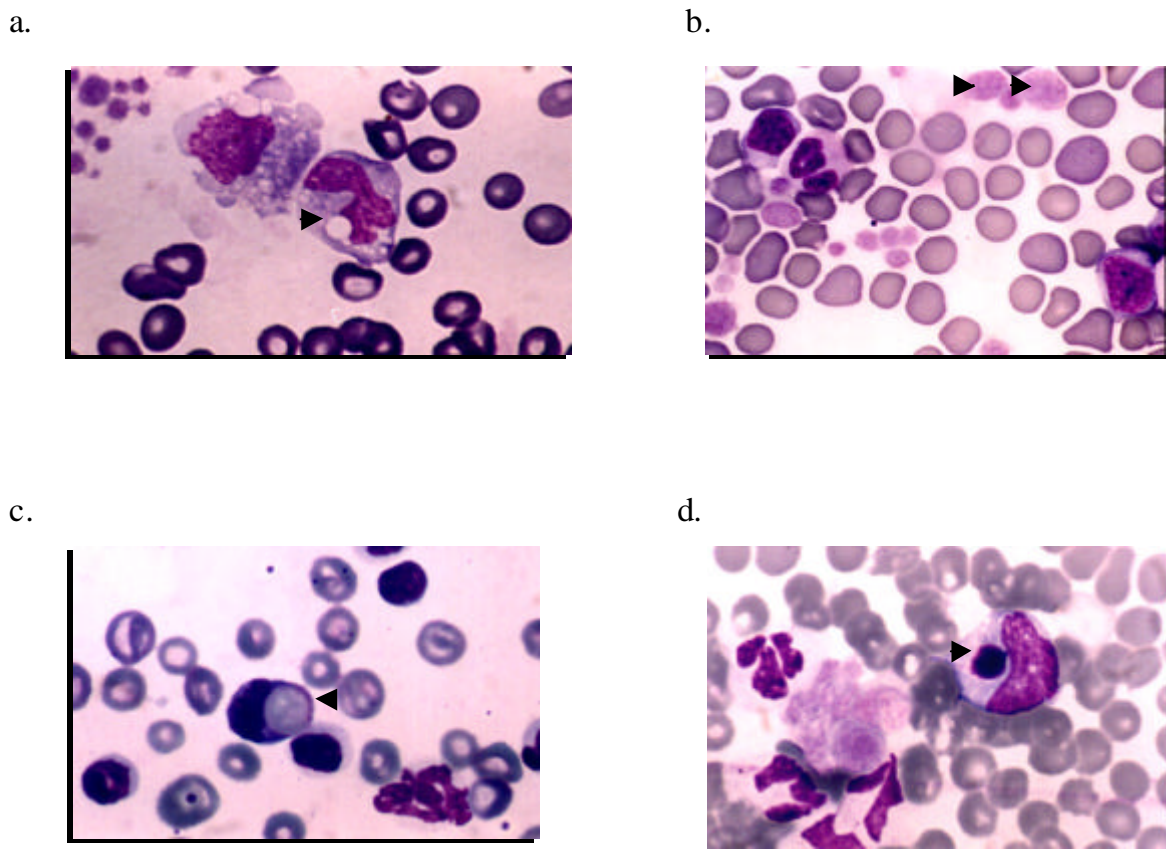


Figura 14 – Alterações morfológicas observadas em esfregaços sanguíneos de animais infectados naturalmente por *Ehrlichia canis*: a. vacuolizações em monócitos; b. macroplaquetas; c. eritrofagocitose; d. leucofagocitose. (Diff-quick. 1000X). Presidente Prudente, São Paulo, 2003.

Tabela 16 - Comparação da frequência (%) de alterações morfológicas de células sangüíneas observadas em esfregaços confeccionados após leucoconcentração (LC), a partir de sangue de margem de orelha (MO) e de sangue periférico (SP) de animais infectados naturalmente por *Ehrlichia canis*, pelo teste Q de Cochran ($\alpha=0,05$). Presidente Prudente, São Paulo, Brasil, 2003

| Variável | Amostras Positivas (%) | | | Q | p-value |
|------------------|------------------------|--------------------|--------------------|-------|----------|
| | LC | MO | SP | | |
| Macroplaqueta | 50,74 ^a | 31,58 ^b | 50,53 ^a | 21,68 | < 0,0001 |
| Monócito ativado | 49,47 ^a | 29,47 ^b | 33,68 ^b | 24,08 | < 0,0001 |
| Eritrofagocitose | 22,10 ^a | 5,26 ^b | 3,16 ^b | 27,81 | < 0,0001 |
| Leucofagocitose | 21,05 ^a | 6,32 ^b | 6,32 ^b | 23,06 | < 0,0001 |

Frequências seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas.

A presença de hemofagocitose e ativação de monócitos em amostras de cães com ehrlichiose pode ser explicada pela destruição de células sangüíneas como resposta inflamatória à infecção pelo seu agente (BUHLES Jr. et al., 1975; PRICE et al., 1987), ao passo que a presença de vacuolizações nestas células poderiam também ser resultado da multiplicação do microrganismo no interior do leucócitos, conforme achados de McDade (1989).

A PCR apresentou alta sensibilidade para o diagnóstico de ehrlichiose, especialmente nos animais em fase crônica com contagem leucocitária abaixo de mil células por microlitro de sangue, em que a citologia mostrou-se pouco sensível. Dessa forma, a PCR seria complementar ao diagnóstico citológico, inclusive para avaliação do tratamento, como sugerem Wen et al. (1997) e HARRUS et al. (1998a).

A escolha de sangue para amplificação de DNA deveu-se ao fato de ser o mesmo material biológico utilizado para confecção dos esfregaços, embora a PCR admita a utilização de outros tecidos como medula óssea e linfonodos (IQBAL & RIKIHISA, 1994a,b; IQBAL et al., 1994) para amplificação de *E. canis*.

O uso do imunodiagnóstico é limitado pela possibilidade de resultados imprecisos. Os animais podem apresentar sinais clínicos antes da produção de anticorpos, que ocorre entre dez a vinte dias pós-infecção (KEYSARY et al., 1996; WANER et al., 1996; HARRUS et al., 1998b), o que pode implicar em resultados falsos-negativos em casos agudos, que foram freqüentes no ensaio. Contraditoriamente, podem ser detectados títulos de anticorpos para *E. canis* em animais que se recuperam da enfermidade pela contínua estimulação antigênica ocasionada pelo agente mesmo após tratamento (PERILLE & MATUS, 1991; BARTSCH & GREENE, 1996; HARRUS et al., 1998a; NEER, 1998), tornando difícil a diferenciação de animais ativamente infectados daqueles convalescentes (MATHEW et al. (1996).

Devido a esses fatores, nenhuma técnica sorológica foi empregada como padrão-ouro, sendo selecionada para este intuito a PCR, que foi utilizada com a mesma finalidade no estudo conduzido por Bulla (2003). McBride et al. (1996) e La Scola & Raoult (1997). Os autores consideraram a PCR o método de escolha para o diagnóstico de ehrlichiose em casos iniciais de infecção, uma vez que o agente pode ser detectado antes mesmo da formação de mórulas ou da soroconversão.

Em relação à operacionalização das técnicas citológicas empregadas, o consumo de tempo médio foi de aproximadamente 45 minutos, desde a chegada da amostra de sangue no laboratório até a leitura das lâminas, sendo mínimo o material de consumo exigido e o aparelho mais caro a microcentrífuga, ao contrário do que acontece em técnicas de alta sensibilidade e especificidade. A PCR, RIFI e cultivo *in vitro*, por exemplo, exigem tempo para processamento do material e obtenção de resultados e requerem aparelhos sofisticados (Kakoma et al., 2000). Em virtude destas considerações, as técnicas citológicas, especialmente a de leucoconcentração em microcapilar mostrou-se uma boa ferramenta para o clínico que necessita de um diagnóstico preciso e rápido da ehrlichiose canina, particularmente em países onde a doença pode ser considerada enzoótica como o Brasil.

5 CONCLUSÃO

O estudo sobre a correlação entre os achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e a comparação de técnicas citológicas para detecção de mórulas de *Ehrlichia canis*, permitiu as seguintes conclusões:

- A ehrlichiose canina pode acometer animais de todas as idades, sexos e raças, mas é mais comum em cães com menos de um ano de idade, que vivem em contato com terra e outros cães e tiveram histórico de infestação por carrapatos.
- A ehrlichiose canina é uma enfermidade enzoótica em Presidente Prudente, ocorrendo em todos os meses do ano.
- Trombocitopenia e anemia são importantes indicativos de ehrlichiose em casos agudos. Em infecções crônicas, pancitopenia é o mais importante achado hematológico na ehrlichiose. A presença de macroplaquetas, hemofagocitose e de vacuolizações em monócitos e linfócitos em esfregaços de sangue também é sugestivo de ehrlichiose.
- A leucoconcentração em microcapilar é a melhor técnica citológica para detecção de mórulas e corpúsculos iniciais de *E. canis* e de *Anaplasma platys* a partir de amostras de sangue, sendo de fácil execução, baixo custo, requerendo infraestrutura mínima para sua execução. A técnica deve ser empregada especialmente nos casos agudos, uma vez que nos casos crônicos a sua sensibilidade diminui.

- A leucoconcentração deve ser associada à pesquisa de hemoprotozoários com esfregaços confeccionados a partir da margem de orelha para diagnóstico de infecções concorrentes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALLEMAN, A.R.; MCSHERRY, L.J.; BARBET, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; SORENSON, H.L.; BOWIE, M.V.; BÉLANGER, M. Recombinant major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis*: a potential diagnostic tool. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 2494-2499, 2001.

ALLSOPP, M.T.E.; ALSOPP, B.A. Novel *Ehrlichia* genotype detected in dogs in South Africa. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 4204-4207, 2001.

ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda, em cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 202 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, 1998.

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

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

BANETH, G.; BREITSCHWERDT, G.D.; HEGARTY, B.C.; PAPPALANDO, B.; RYAN, J. A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 74, p. 133-142, 1998.

BARTSCH, R.C.; GREENE, R.T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **J. Vet. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 10, p. 271-274, 1996.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. Grupo de Trabalho Normalização Documentária da Unesp. **Normalização documentária para a produção científica da Unesp: normas para apresentação de referências segundo a NBR 6023:2002 da ABNT**. São Paulo, 2003. Disponível em <http://www.biblioteca.unesp.br/pages/normalizacao.pdf>> Acesso em 25 de julho de 2003.

BEAUFILS, J.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P. Intérêt des corps d'inclusion dans le diagnostic cytologique de l'ehrlichiose canine. **Bull. Acad. Vét. de France.**, Paris, v. 68, p. 57-62, 1995.

BÉLANGER, M.; SORENSON, H.L.; FRANCE, M.K.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, p. 3506-3508, 2002.

BELLAH, J.R.; SHULL, R.M.; SELZER, E.V.S. *Ehrlichia canis*-related polyarthritis in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 189, p. 922-923, 1986.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; HANCOCK, S.I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonni*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, p. 2645-2651, 1998.

BUHLES Jr., W.C.; HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K. Tropical canine pancytopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. **J. Comp. Pathol.**, Edinburgh, v. 85, p. 511-521, 1975.

BULLA, C. **Contagem de plaquetas como um teste de triagem para o diagnóstico da infecção por *Ehrlichia canis***. 2003. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2003.

BULLA, C.; LANGRAFE, L.; PAES, P.R.O.; KOHAYAGAWA, A.; LOPES, R.S.; TAKAHIRA, R.K. Estudo hematológico dos casos de ehrlichiose canina diagnosticada pela presença de mórula, nos últimos dez anos. In: MOSTRA CIENTÍFICA DA FMVZ, 4., 2000, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2000. p. 29.

BUORO, I.B.J.; KANUI, T.I.; ATWELL, R.B. Polymiositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. **J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v. 31, p. 624-627, 1990.

BURGHEN, G.A.; BEISEL, W.R.; WALKER, J.S.; NIMS, R.N.; HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K. Development of hypergammaglobulinemia in Tropical Canine Pancytopenia. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 32, p. 749-759, 1971.

CADMAN, H.F.; KELLY, P.J.; MATTHEWMAN, L.A.; ZHOU, R.; MASON, P.R. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Vet. Rec.**, London, v. 135, p. 362, 1994.

CARRILO, B.J.; RESENDE, H.E.B.; MASSARD, C.L. Ehrlichiose canina no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15., 1976, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1976. p. 162.

CASTRO, M.B. **Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães por *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) Moshkovsky, 1945.** 1997. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 1997.

CERUNDOLO, R.; CAPRARIIS, D.; MANNA, L.; GRAVINO, A.E. Recurrent deep pyoderma in german shepherds dogs with underlying ehrlichiosis and hypergammaglobulinemia. **Vet. Dermatol.**, Oxford, v. 19, p. 135-142, 1998.

CHANG, W,-L.; PAN, MING,-J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimes by two-step PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p. 3142-3146, 1996.

CHEN, S.-M.; CULLMAN, L.; WALKER, D.H. Western immunoblotting analysis of the antibody responses of patients with human monocytotropic ehrlichiosis to different strains of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, Washington, v. 4, p. 731-735, 1997.

COCCO, R.; SANNA, G.; CILLARA, M.G.; TOLA, S.; XIMENES, L.; PINNAPAPPAGLIA, M.L.; MASALA, G. Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 990, p. 126-130, 2003.

CODNER, E.C.; FARRIS-SMITH, L.L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 189, p. 47-50, 1986.

CODNER, E.C.; ROBERTS, R.E.; AINSWORTH, A.G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 186, p. 166-169, 1985.

COSTA, J.O.; SILVA, M.; BATISTA Jr., J.A.; GUIMARÃES M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arq. Esc. Vet. Univ. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 25, p. 199-200, 1973.

DAVOUST, B. L'ehrlichiose canine. **Poin Vet.**, Maison Alfort, v. 25, p. 43-51, 1993.

DAVOUST, B.; BROUQUI, P.; RAFFI, A.; RAOULT, D. L'ehrlichiose canine dans les chenils militaires du Sud-Est: à propos de 14 cas. **Point. Vet.**, Maison Alfort, v. 21, p. 63-67, 1990.

DAVOUST, B.; PARZY, D.; OTT, D.; HASSELOT, N. Ehrlichiose canine chronique: intérêt de la numération plaquettaire. **Rev. Méd. Vét.**, Toulouse, v. 142, p. 287-292, 1991.

DAWSON, J.E.; CANDALL, F.J.; GEORGE, V.G.; ADES, E.W. Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *Rickettsia rickettsii*. **Pathobiology**, Basel, v. 61, p. 293-296, 1993.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chein. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, Paris, v. 28, p. 418-419, 1935.

DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S. Human ehrlichiosis: newly recognized infections transmitted by dogs. **Annu. Rev. Med.**, Palo Alto, v. 49, p. 201-213, 1998.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophyla*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DUNN, J.K. Introdução à resolução de problemas médicos. In_____. (Org.). **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2001. p . 3-12.

Du PLEISS, J.L.; FOURIE, N.; NEL, P.W.; EVEZARD, D.N. Concurrent babesiosis and ehrlichiosis in the dog: blood smear examination supplemented by the indirect fluorescent antibody test, using *Cowdria ruminantium* as antigen. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, Pretoria, v. 57, p. 151-155, 1990.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v. 33, p. 540-543, 1991.

ENG, T.R.; GILES, R. Ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 194, p. 497-500, 1989.

EWING, S.A.; BUCKNER, R.G. Manifestation of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infections in the dogs. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 26, p. 815-828, 1965.

FIRNEISZ, G.D.; COCHRANE, S.M.; PARENT, J.; HOUSTON, D.M. Canine ehrlichiosis in Ontario. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v. 3, p. 652-653, 1990.

FRANK, J.R.; BREITSCHWERDT, E.B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 13, p. 194-201, 1999.

GAUNT, S.D.; CORSTVET, R.E.; BERRY, C.M.; BRENNAN, B. Isolation of *Ehrlichia canis* from dogs following subcutaneous inoculation. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p. 1429-1432, 1996.

GOPEGUI, R.R.; FELDMAN, B.F. Acquired and inherited platelet dysfunction in small animals. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, Princeton Junction, v. 20, p. 1039-1052, 1998.

GOSSET, K.A.; GAUNT, S.D.; AJA, D.S. Hepatozoonosis and ehrlichiosis in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Denver, v. 21, p. 265-267, 1985.

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

GREEN, R.A. Bleeding disorders. In: ETTINGER, S.J. (Org.). **Textbook of veterinary internal medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1983. p. 2094-2097.

GRINDEM, C.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; CORBETT, W.T.; JANS, H.E. Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases. **Vet. Clin. Pathol.**, Santa Barbara, v. 20, p. 38-43, 2002.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 36, p. 937-940, 1975.

HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 66, p. 241-249, 1996a.

HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A.; ZWANG, E.; BARK, H. J. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Rec.**, London, v. 139, p. 290-293, 1996b.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, Princeton Junction, v. 19, p. 431-447, 1997.

HARRUS, S.; OFRI, R.; AIZENBERG, I.; BARK, H. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, p. 2140-2142, 1998a.

HARRUS, S.; OFRI, R.; AIZENBERG, I.; WANER, T. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 78, p. 155-160, 1998b.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H.J. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 62, p. 15-27, 1998c.

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

HARRUS, S.; DAY, M.J.; WANER, T.; BARK, H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 83, p. 343-349, 2001a.

HARRUS, S.; WANER, T.; STRAUSS-AYALY, D.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; HECHT, G.; BANETH, G. Dynamics of IgG1 and IgG2 subclasses response in dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 99, p. 63-71, 2001b.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H.; MANAH, S.M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 24, p. 361-368, 2002.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 137, p. 182-187, 1978.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M.; SAMECK, J.H. Ehrlichiosis in wolves, dogs, and wolf-dog crosses. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 175, p. 901-905, 1979.

HASEGAWA, M.Y.; SARTOR, I.F.; SANTARÉM, V.A. Fases evolutivas de *Ehrlichia canis* em leucócitos de caninos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 10.; SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1., 1997, Itajaí, SC. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, São Paulo, v. 6, supl. 1, p. 333, 1997.

HEGARTY, B.C.; LEVY, M.G.; GAGER, R.F. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 9, p. 32-38, 1997.

HIBBLER, C.S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infection in dogs. Part II: Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, Princeton Junction, v. 8, p. 106-113, 1986.

HILDEBRANDT, P.K.; HUXSOLL, D.L.; WALKER, J.S.; NIMS, R.M.; TAYLOR, R.; ANDREWS, M. Pathology of canine ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia). **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 34, p. 1309-1320, 1973.

HOSKINS, J.D.; BARTA, O.; ROTHSCHIMITT, J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 183, p. 1011-1012, 1983.

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

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; FERGUSON, J.A.; WALKER, J.S. *Ehrlichia canis*. The causative agent of a hemorrhagic disease of dogs? **Vet. Rec.**, London, v. 85, p. 587, 1969.

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; WALKER, J.S. *Ehrlichia canis*. Tropical Canine Pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 157, p. 1627-1632, 1970.

HUXSOLL, D.L.; AMYX, H.L.; HEMELT, I.E.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; GOCHENOUR Jr., W.S. Laboratory studies of tropical canine pancytopenia. **Exp. Parasitol.**, San Diego, v. 31, p. 53-59, 1972.

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

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 1644-1649, 1994b.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWUTHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with others tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 1658-1662, 1994.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1993. 417p.

KAKOMA, I. Autologus lymphocyte mediated cytotoxicity against monocyte in canine ehrlichiosis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 38, p. 557-559, 1977.

KAKOMA, I.; SAINZ, A.; TESOURO, M.; AMUSATEGUI, I.; KIM, C.; BIGGERSTAFF, J.; McPEAK, J.; LEVY, M.G. Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis: towards a universal case definition. **Ann. N. Y. Acad. Sc.**, New York, v. 916, p. 396-403, 2000.

KANEKO, J.J. Serum proteins and dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Org.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. San Diego: Academic Press, p. 117-138, 1997.

KEEFE, T.J.; HOLLAND, C.J.; SALYER, P.E.; RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v. 181, p. 236-238, 1982.

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

KEYSARY, A.; WANER, T.; STRENGER, C.; HARRUS, S. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 13, p. 521-523, 2001.

KLAG, A.R.; DUNBAR, L.E.; GIRARD, C.A. Concurrent ehrlichiosis and babesiosis in a dog. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v. 32, p. 305-307, 1991.

KNOWLES, T.T.; ALLEMAN, A.R.; SORENSON, H.L.; MARCIANO, D.C.; BREITSCHWERDT, E.B.; HARRUS, S.; BARBET, A.F.; BÉLANGER, M. Characterization of the major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and its application for serodiagnosis of ehrlichiosis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, Washington, v. 10, p. 520-524, 2003.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Clinical observations in 15 spontaneous cases of canine babesiosis. **Canine Pract.**, Santa Barbara, v. 22, p. 5-6, 1997.

KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; SOUTHWICK, K.L.; COLITZ, C.M.; HANCOCK, S.I.; BRADLEY, J.M.; RUMBOUGH, R.; McPHERSON, J.T.; McCORMACK, J.N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, p. 2631-2638, 1999.

KUEHN, N.F.; GAUNT, S.D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 186, p. 355-358, 1985.

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M. de; BALBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C.A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Vet. Ther.**, Trenton, v. 4, p. 67-75, 2003.

La SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of an old and new rickettsial diseases. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 2715-2727, 1997.

LATHA, B.R.; JOSEPH, S.A. Incidence of *Hepatozoon canis* infection in dogs of Madras city. **Cheiron**, Madras, v. 23, p. 32-36, 1994.

LEWIS Jr., G.E.; RISTIC, M.; SMITH, R.D.; LINCOLN, T.; STEPHENSON, E.H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 38, p. 1953-1955, 1977.

LOVERING, S.L.; PIERCE, K.R.; ADAMS, L.G. Serum complement and blood platelets adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 41, p. 1266-1271, 1980.

MACKINNON, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Comput. Biol. Med.**, Elmsford, v. 30, 127-134, 2000.

MATHEW, J.S.; EWING, S.A.; BAKER, R.W. Attempt transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* after passage in cell culture. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 57, p. 1594-1598, 1996.

MATHEW, J.S.; EWING, S.A.; MALAYEZ, J.R.; FOX, J.C.; KOCAN, K.M. Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of *Ehrlichia canis* infection. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 12, p. 456-459, 2000.

MATTHEWMANN, L.A.; KELLY, P.J.; BOBADE, P.A.; TAGWIRA, M.; MASON, P.R.; MAJOK, A.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in dogs in Zimbabwe. **Vet. Rec.**, London, v. 133, p. 344-346, 1993a.

MATTHEWMANN, L.A.; KELLY, P.J.; MANAH, S.M.; SEMU, D.; TAGWIRA, M.; BOBADE, P.A.; BROUQUI, P.; MASON, P.R.; RAOULT, D. Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe. **Jl. S. Afr. vet. Ass.**, Pretoria, v. 64, p. 111-115, 1993b.

MAUEL, M.J.; CARLTON, S.J.; MATHER, T.N. Polymerase chain reaction detection efficacy of the human granulocytic agent (Rickettsiaceae: Ehrlichiae) in ticks (Acari: Ixodidae) is dependent on the DNA extraction method. **J. Med. Entomol.**, Lanham, v. 36, p. 649-652, 1999.

McBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G.Y.; OSBURD, B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 8, p. 441-447, 1996.

McBRIDE, J.W.; YU, X.-J.; WALKER, D.H. Molecular cloning for the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, Washington, v. 6, p. 392-399, 1999.

McBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; BREITSCHWERDT, E.B.; WALKER, D.H. Immunodiagnostic of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 315-322, 2001.

McBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; BOUDREAUX, C.; GUEDRY, T.; WALKER, D.H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infect. Immun.**, Washington, v. 71, p. 2516-2524, 2003.

McDADE, J. Ehrlichiosis – a disease of animals and humans. **J. Infec. Dis.**, Chicago, v. 161, p. 609-617, 1989.

MEDRONHO, R.A.; PEREZ, M.A. Testes Diagnósticos. In: **Epidemiologia**. MEDRONHO, R.A.; CARVALHO, D.M.de; BLOCH, K.V.; WERNECK, G.L. 2002, São Paulo: Atheneu. P. 259-270.

MEINKOTH, J.H.; HOOVER, J.P.; COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; LINK, J. Ehrlichiosis in a dog with seizures and nonregenerative anemia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 195, p. 1754-1755, 1989.

MENESES, A. First report of canine ehrlichiosis in Costa Rica. **Vet. Rec.**, London, v. 137, p. 46-47, 1995.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Evaluation of homeostasis: coagulation and platelet disorders. In: _____. (Org.). **Veterinary laboratory medicine: Interpretation & diagnosis**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1998, p. 111-137.

MICHELS, G.M.; BOON, G.D.; JONES, B.D.; PUGET, B. Hypergammaglobulinemia in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 207, p. 567-570, 1995.

MORAIS, H.A.; HOSKINS, J.; ALMOSNY, N.R.P.; LABARTHE, N. Erliquiose. In: CONGRESSO ESTADUAL DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS DO RIO DE JANEIRO, 4., 2002, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: ANCLIVEPA, 2002. (não paginado)

MUÑANA, K.R. Encephalitis and meningitis. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, Philadelphia, v. 26, p. 851-874, 1996.

MUNHÓZ, A.L.F.; BABO, V.J. Estudo retrospectivo das características da Ehrlichiose canina. **Hora Vet.**, Porto Alegre, n. 106, p. 39-43, 1998.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 79, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BAILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RAILLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 91, 197-204, 2003.

NEER, T.M. Ehrlichiosis: Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. (Org.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1998, p. 139-154.

NIMS, R.M.; FERGUSON, J.A.; WALKER, J.L.; HILDEBRANDT, P.K.; HUXSOLL, D.L.; REARDON, M.J.; VARLEY, J.E.; KOLAJA, G.J.; WATSON, W.T.; SHROYER, E.L.; ELWELL, P.A.; VACURA, G.W. Epizootiology of Tropical Canine Pancytopenia in southeast Asia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 158, p. 53-63, 1971.

NYINDO, M.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; SMITH, A.R. Tropical Canine Pancitopenia: *In vitro* cultivation of the causative agent - *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 32, p. 1651-1658, 1971.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J.L.; CARSON, C.A.; STEPHENSON, E.H. Cell-mediated and humoral immune response of german shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 14, p. 250-254, 1980.

NYINDO, M.; KAKOMA, I.; HANSEN, R. Antigenic analysis of four species of the genus *Ehrlichia* by use of protein immunoblot. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 52, p. 1225-1230, 1991.

OHASHI, N.; UNVER, A.; RIKIHISA, Y. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and an application of the recombinant protein for serodiagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, p. 2671-2680, 1998.

OHASHI, N.; RIKIHISA, Y.; UNVER, A. Analysis of transcriptionally active gene clusters of major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 69, p. 2083-2091, 2001.

PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; CONFER, A.W. Ocular histopathology of ehrlichial infections in the dog. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 38, p. 43-46, 2001.

PEDERSEN, N.C. A review of immunologic diseases of the dog. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 69, p. 251-342, 1999.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p. 2133-2139, 1996.

PERILLE, A.L.; MATUS, R.E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **J. Vet. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 5, p. 185-198, 1991.

PIERCE, K.R.; MARS, G.E.; HIGHTOWER, D. Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 38, p. 1821-1825, 1977.

POPOV, V.L.; HAN, V.C.; CHEN, -M.; DUMLER, J.S.; FENG, H.-M.; ANDREADIS, T.G.; TESH, R.B.; WALKER, D.H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **J. Med. Microbiol.**, Essex, v. 47, p. 2235-251, 1998.

PRICE, J.E.; DOLAN, T.T. A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. **Vet. Rec.**, London, v. 107, p. 275-277, 1980.

PRICE, J.E.; SAYER, P.D.; DOLAN, T.T. Improved clinical approach to the diagnosis of canine ehrlichiosis. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, Edinburgh, v. 19, p. 1-8, 1987.

REARDON, M.F.; PIERCE, K.R. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 18, p. 48-61, 1981.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichiae and ehrlichial diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 4, p. 286-308, 1991.

RIKIHISA, Y.; YAMAMOTO, S.; KWAK, I.; IQBAL, Z.; KOCIBA, G.; MOTT, J.; CHICHANASIRIWITHAYA, W. C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 912-917, 1994.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M.; HILDEBRANDT, P.K.; NYINDO, B.A. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infect. Immun.**, Washington, v. 6, p. 226-231, 1972.

ROBERTS, R.B.; SOAVE, R. Emerging pathogens associated with tick-borne infections. **Braz J. Infec. Dis.**, Salvador, v. 1, p. 17-26, 1997.

SEAMER, J.; SNAPE, T. Tropical canine Pancytopenia and *Ehrlichia canis* infection. **Vet. Rec.**, London, v. 86, p. 375, 1970.

SEIBERT, M.; SILVA, N.R.S.; CHAPLIN, E.L.; ARAÚJO, F.A.P. Ocorrência de *Ehrlichia* em cães conduzidos ao Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, p. 84-94, 1997.

SHIMADA, T.; ISHIDA, Y.; SHIMIZU, M.; NOMURA, M.; KAWATO, K.; IGUCHI, K.; JINBO, T. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. **Vet. Res. Communic.**, Dordrecht, v. 26, p. 171-177, 2002.

SILVA, C.F.; CARVALHO, C.B.; PEREIRA, N.R.; FAN, L.C.R. Ehrlichiose canina: relato de caso. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15., 1985, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1985. p. 31.

SIMPSON, F.C. Structure of *Ehrlichia canis* in blood monocytes of a dog. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 33, p. 2451-2454, 1972.

SMITH, R.D.; HOOK, J.E.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M. Canine ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia): Survival of phosphorus-32 labeled blood platelets in normal and infected dogs. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 35, p. 269-273, 1974.

SMITH, R.D.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; BAYLOR, R.A. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infect. Immun.**, Washington, v. 11, p. 1216-1221, 1975.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 37, p. 120-126, 1976.

STEPHENSON, E.H.; OSTERMAN, J.V. Canine peritoneal macrophages: cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. **Am J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 38, p. 1815-1819, 1977.

STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M. Retrospective study of an *Ehrlichia canis* epizootic around Phoenix, Arizona. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 172, p. 63-64, 1978.

STEPHENSON, E.H.; CLOTHIER, E.R.; RISTIC, M. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Virginia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 167, p. 71-72, 1975.

STICH, R.W.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; NEEDHAM, G.R.; GROVER, D.L.; JITTAPALAPONG, S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a *p-30* based PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, p. 540-546, 2002.

STILES, J. Canine rickettsial infectious. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, Philadelphia, v. 30, p. 1135-1150, 2000.

STOCKHAN, S.L.; SCHMIDT, D.A.; CURTIS, K.S.; SCHAUF, B.G.; TYLER, J.W.; SIMPSON, S.T. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Borrelia burgdoferi*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 53, p. 63-68, 1992.

SUTO, Y.; SUTO, A.; INOKUMA, H.; OBAYASHI, H.; HAYASHI, T. First confirmed canine case of *Ehrlichia canis* infection in Japan. **Vet. Rec.**, London, v. 148, p. 809-811, 2001.

TENG, C.H.; PALANIAPPA, R.U.; CCHANG, Y.F. Cloning and characterization of na *Ehrlichia canis* gene encoding a protein localized to the morula membrane. **Infect. Immun.**, Washington, v. 71, p. 2218-2225, 2003.

THILAGAR, S.; BASHEER, A.M.; DHANAPALAN, P. A usual case of ehrlichiosis associated with polyarthritis in a dog. A case report. **Ind. Vet. J.**, Madras, v. 67, p. 267-268, 1990.

THIRUNAVUKKARASU, P.S.; DHANAPALAN, P.; GNANAPRAKASAM, V. Incidence of canine ehrlichiosis in Madras city. **Cheiron**, Madras, v. 22, p. 222-224, 1993.

THIRUNAVUKKARASU, P.S.; SRINIVASAN, S.R.; RAJAN, T.S.S.; GNANAPRAKASAM, V. Ophthalmoscopic evaluation of canine ehrlichiosis. **Ind. Vet. J.**, Madras, v. 71, p. 1215-1216, 1994.

TIZARD, I.R. Innate immunity: inflammation. In:_____. (Org.). **Veterinary immunology: an introduction**. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p. 36-46.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. 410p.

TROY, G.R.; FORRESTER, J.D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. (Org.). **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 48-59.

TROY, G.C.; VULGAMMOTT, J.C.; TURNWALD, G.H. Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Denver, v. 6, p. 181-187, 1980.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 2788-2793, 2001.

VAN HEERDEN, J.; IMMELMAN, A. The use of doxycycline in the treatment of canine ehrlichiosis. **Jl. S. Afr. vet. Ass.**, Pretoria, v. 50, p. 241-244, 1979.

VARELA, F.; FONT, X.; VALLADARES, J.E.; ALBEROLA, J. Thrombocytopenia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with *Ehrlichia canis*. **J. Vet. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 11, p. 309-311, 1997.

WADDLE, J.R.; LITTMAN, M.P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Denver, v. 24, p. 615-620, 1988.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. **Emerg. Inf. Dis.**, Atlanta, v. 2, p. 18-29, 1996.

WALKER, J.S.; RUNDQUIST, J.D.; TAYLOR, R.; WILSON, B.L.; ANDREWS, M.R.; BARCK, J.; HOGGE Jr.; A.L.; HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M. Clinical and clinicopathologic findings in Tropical Canine Pancitopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 157, p. 43-55, 1970.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D.J.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 48, p. 177-182, 1995.

WANER, T.; ROSNER, M.; HARRUS, S.; NAVEH, A.; ZASS, R.; KEYSARY, A. Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 63, p. 331-335, 1996.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 69, p. 307-317, 1997.

WANER, T.; STRENGER, C.; KEYSARY, A. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence tests for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 12, p. 240-244, 2000a.

WANER, T.; LEYKIN, I.; SHINITSKY, M.; SHARABANI, E.; BUCH, H.; KEYSARY, A.; BRAK, H.; HARRUS, S. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infections with *Ehrlichia canis*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 77, p. 145-150, 2000b.

WANER, T.; HARRUS, S.; JOGENJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 95, p. 1-15, 2001.

WARNER, C.K.; DAWSON, J.E. Genus- and species-level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. In: PERSING, D.H. (Org.). **PCR Protocols for emerging infectious diseases: a supplement to diagnostic molecular microbiology-principles and applications**. Washington: ASM, 1996. p. 100-105.

WEISER, M.G. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Denver, v. 27, p. 84-88, 1991.

WEISIGER, R.M.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 36, p. 689-694, 1975.

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

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. In: HOSKINS J.D. Tick-transmitted diseases. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, Philadelphia, v. 21, p. 75-98, 1991.

YU, X.-J.; McBRIDGE, J.W.; MARCELA DIAZ, C.; WALKER, D.H. Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, p. 369-374, 2000.

ANEXO A – Dados de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, com resultado positivo para PCR

| Animal | Mórula | Raça | Sexo | Idade |
|---------------|---------------|-----------------------|-------------|--------------|
| 1 | Positivo | Rottweiler | Macho | 3 anos |
| 2 | Positivo | SRD | Macho | 11 anos |
| 3 | Positivo | Rottweiler | Macho | 8 meses |
| 4 | Positivo | SRD | Macho | 10 meses |
| 5 | Positivo | Pastor | Macho | 2 anos |
| 6 | Positivo | SRD | Fêmea | 11 anos |
| 7 | Positivo | Rottweiler | Macho | 3 meses |
| 8 | Positivo | Pinscher | Macho | 10 anos |
| 9 | Positivo | SRD | Fêmea | 1 ano |
| 10 | Positivo | SRD | Fêmea | 3 anos |
| 11 | Positivo | Basset Hund | Fêmea | 3 meses |
| 12 | Positivo | Poodle | Fêmea | 4 meses |
| 13 | Positivo | Daschund | Macho | 2 anos |
| 14 | Positivo | Australian Cattle Dog | Macho | 9 meses |
| 15 | Positivo | Pastor Alemão | Macho | 1 ano |
| 16 | Positivo | Australian Cattle Dog | Macho | 1 ano |
| 17 | Positivo | Cocker Spaniel | Fêmea | 2 meses |
| 18 | Positivo | Australian Cattle Dog | Fêmea | 6 meses |
| 19 | Positivo | Rottweiler | Fêmea | 7 meses |
| 20 | Positivo | SRD | Fêmea | 2 anos |
| 21 | Positivo | Australian Cattle Dog | Fêmea | 1 ano |
| 22 | Positivo | Poodle | Fêmea | 8 anos |
| 23 | Positivo | Setter Irlandês | Macho | 7 anos |
| 24 | Positivo | Bull Terrier | Macho | 5 anos |
| 25 | Positivo | Australian Cattle Dog | Macho | 7 meses |
| 26 | Positivo | Pinscher | Fêmea | 5 anos |
| 27 | Positivo | SRD | Macho | 3 anos |
| 28 | Positivo | Rottweiler | Macho | 2 meses |
| 29 | Positivo | Basset Hund | Macho | 3 anos |
| 30 | Positivo | Border Collie | Macho | 2 meses |

ANEXO A – Dados de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, com resultado positivo para PCR (continuação)

| Animal | Mórula | Raça | Sexo | Idade |
|---------------|---------------|-----------------|-------------|--------------|
| 31 | Positivo | Husky Siberiano | Macho | 3 anos |
| 32 | Positivo | SRD | Macho | 4 meses |
| 33 | Positivo | SRD | Fêmea | 9 meses |
| 34 | Positivo | Cocker Spaniel | Fêmea | 3 anos |
| 35 | Positivo | SRD | Fêmea | 3 meses |
| 36 | Positivo | SRD | Macho | 2 meses |
| 37 | Positivo | SRD | Macho | 9 anos |
| 38 | Positivo | SRD | Macho | 3 meses |
| 39 | Positivo | SRD | Fêmea | 7 anos |
| 40 | Positivo | Dogue Alemão | Fêmea | 3 anos |
| 41 | Positivo | SRD | Fêmea | 1 ano |
| 42 | Positivo | Poodle | Macho | 3 meses |
| 43 | Positivo | Pit Bull | Macho | 1 mês |
| 44 | Positivo | Pit Bull | Macho | 1 ano |
| 45 | Positivo | SRD | Fêmea | 6 anos |
| 46 | Negativo | Rottweiler | Fêmea | 4 meses |
| 47 | Negativo | SRD | Macho | 4 anos |
| 48 | Negativo | Poodle | Macho | 7 anos |
| 49 | Negativo | Pastor Alemão | Fêmea | 3 anos |
| 50 | Negativo | Border Collie | Fêmea | 4 anos |
| 51 | Negativo | Bulldog | Fêmea | 4 anos |
| 52 | Negativo | Fila Brasileiro | Macho | 1 ano |
| 53 | Negativo | Fila Brasileiro | Macho | 1 ano |
| 54 | Negativo | SRD | Fêmea | 11 anos |
| 55 | Negativo | Poodle | Macho | 10 meses |
| 56 | Negativo | SRD | Macho | 10 anos |
| 57 | Negativo | Cocker Spaniel | Macho | 5 anos |
| 58 | Negativo | SRD | Fêmea | 6 anos |
| 59 | Negativo | Dogue Alemão | Macho | 4 anos |
| 60 | Negativo | SRD | Fêmea | 5 anos |

ANEXO B – Dados de cães não infectados por *Ehrlichia canis* (PCR negativa)

| Animal | Mórula | Raça | Sexo | Idade |
|---------------|---------------|-------------------|-------------|--------------|
| 1 | Negativo | SRD | Fêmea | 6 anos |
| 2 | Negativo | SRD | Macho | 9 anos |
| 3 | Negativo | SRD | Fêmea | 3 anos |
| 4 | Negativo | SRD | Fêmea | 8 anos |
| 5 | Negativo | Pastor Alemão | Macho | 6 anos |
| 6 | Negativo | SRD | Macho | 5 anos |
| 7 | Negativo | Pastor Alemão | Fêmea | 5 anos |
| 8 | Negativo | SRD | Macho | 2 anos |
| 9 | Negativo | SRD | Fêmea | 3 anos |
| 10 | Negativo | Fila Brasileiro | Fêmea | 6 anos |
| 11 | Negativo | SRD | Fêmea | 4 anos |
| 12 | Negativo | Doberman Pinscher | Macho | 9 anos |
| 13 | Negativo | Fila Brasileiro | Macho | 6 anos |
| 14 | Negativo | SRD | Fêmea | 1 ano |
| 15 | Negativo | SRD | Fêmea | 1 ano |
| 16 | Negativo | SRD | Fêmea | 1 ano |
| 17 | Negativo | SRD | Fêmea | 1 ano |
| 18 | Negativo | SRD | Fêmea | 6 meses |
| 19 | Negativo | SRD | Fêmea | 2 anos |
| 20 | Negativo | SRD | Fêmea | 2 anos |
| 21 | Negativo | Dachs hund | Fêmea | 3 anos |
| 22 | Negativo | SRD | Fêmea | 1 ano |
| 23 | Negativo | Poodle | Fêmea | 2 anos |
| 24 | Negativo | SRD | Fêmea | 5 anos |
| 25 | Negativo | SRD | Fêmea | 4 anos |
| 26 | Negativo | SRD | Fêmea | 4 anos |
| 27 | Negativo | SRD | Fêmea | 3 anos |
| 28 | Negativo | SRD | Fêmea | 1 ano |
| 29 | Negativo | SRD | Fêmea | 3 anos |
| 30 | Negativo | SRD | Fêmea | 3 anos |
| 31 | Negativo | SRD | Fêmea | 2 anos |
| 32 | Negativo | SRD | Fêmea | 3 anos |
| 33 | Negativo | SRD | Fêmea | 2 anos |
| 34 | Negativo | SRD | Fêmea | 5 anos |
| 35 | Negativo | SRD | Fêmea | 7 anos |

ANEXO C – Eritrograma de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, com resultado positivo para PCR

| ERITROGRAMA | | | | | | | |
|-------------|----------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Animal | Mórula | Hemácias (x10 ⁶ /ml) | Hemoglobina (g/dl) | Volume Globular (%) | VCM (fl) | CHCM (%) | HCM (pg) |
| 1 | Positivo | 3,69 | 8,3 | 25,0 | 67,8 | 33,2 | 22,5 |
| 2 | Positivo | 4,14 | 11,5 | 35,0 | 84,5 | 32,9 | 27,8 |
| 3 | Positivo | 4,72 | 11,8 | 33,0 | 69,9 | 35,8 | 25,0 |
| 4 | Positivo | 5,47 | 12,9 | 37,0 | 67,6 | 34,9 | 23,6 |
| 5 | Positivo | 5,46 | 11,9 | 37,0 | 67,8 | 32,2 | 21,8 |
| 6 | Positivo | 5,29 | 13,9 | 42,0 | 79,4 | 33,1 | 26,3 |
| 7 | Positivo | 3,44 | 8,6 | 26,0 | 75,6 | 33,1 | 25,0 |
| 8 | Positivo | 4,38 | 10,7 | 36,0 | 82,2 | 29,7 | 24,4 |
| 9 | Positivo | 4,83 | 10,3 | 31,0 | 64,2 | 33,2 | 21,3 |
| 10 | Positivo | 6,46 | 15,4 | 45,0 | 69,7 | 34,2 | 23,8 |
| 11 | Positivo | 3,92 | 8,9 | 28,0 | 71,4 | 31,8 | 22,7 |
| 12 | Positivo | 4,18 | 11,6 | 35,0 | 83,7 | 33,1 | 27,8 |
| 13 | Positivo | 4,00 | 9,0 | 29,0 | 72,5 | 31,0 | 22,5 |
| 14 | Positivo | 4,05 | 10,2 | 31,0 | 76,5 | 32,9 | 25,2 |
| 15 | Positivo | 5,27 | 11,9 | 32,0 | 60,7 | 37,2 | 22,6 |
| 16 | Positivo | 5,13 | 12,8 | 40,0 | 78,0 | 32,0 | 25,0 |
| 17 | Positivo | 3,17 | 8,1 | 25,0 | 78,9 | 32,4 | 25,6 |
| 18 | Positivo | 4,39 | 9,5 | 29,0 | 66,1 | 32,8 | 21,6 |
| 19 | Positivo | 1,45 | 3,5 | 12,0 | 82,8 | 29,2 | 24,1 |
| 20 | Positivo | 2,95 | 8,4 | 26,0 | 88,1 | 32,3 | 28,4 |
| 21 | Positivo | 3,67 | 9,9 | 31,0 | 84,5 | 31,9 | 27,0 |
| 22 | Positivo | 6,40 | 16,2 | 50,0 | 78,1 | 32,4 | 25,3 |
| 23 | Positivo | 3,23 | 9,4 | 29,0 | 89,8 | 32,4 | 29,1 |
| 24 | Positivo | 3,45 | 8,6 | 26,0 | 75,3 | 33,0 | 24,9 |
| 25 | Positivo | 5,04 | 12,3 | 37,0 | 73,4 | 33,2 | 24,4 |
| 26 | Positivo | 2,29 | 5,7 | 18,0 | 78,6 | 31,6 | 24,8 |
| 27 | Positivo | 5,82 | 13,0 | 43,0 | 73,9 | 30,2 | 22,3 |
| 28 | Positivo | 1,66 | 4,1 | 15,0 | 90,4 | 27,3 | 24,7 |
| 29 | Positivo | 4,84 | 10,6 | 33,0 | 68,2 | 32,1 | 21,9 |
| 30 | Positivo | 1,27 | 2,4 | 9,0 | 70,9 | 26,7 | 18,9 |

ANEXO C – Eritrograma de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, com resultado positivo para PCR (continuação)

| Animal | Mórula | ERITROGRAMA | | | | | |
|--------|----------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Hemácias (x10 ⁶ /ml) | Hemoglobina (g/dl) | Volume Globular (%) | VCM (fl) | CHCM (%) | HCM (pg) |
| 31 | Positivo | 6,41 | 13,0 | 41,0 | 64,0 | 31,7 | 20,3 |
| 32 | Positivo | 5,66 | 11,9 | 39,0 | 68,9 | 30,5 | 21,0 |
| 33 | Positivo | 1,90 | 4,5 | 15,0 | 78,9 | 30,0 | 23,7 |
| 34 | Positivo | 1,65 | 2,8 | 10,0 | 60,6 | 28,0 | 17,0 |
| 35 | Positivo | 2,84 | 5,3 | 16,0 | 56,3 | 33,1 | 18,7 |
| 36 | Positivo | 0,83 | 1,9 | 8,0 | 96,4 | 23,8 | 22,9 |
| 37 | Positivo | 3,37 | 8,5 | 28,0 | 83,1 | 30,4 | 25,2 |
| 38 | Positivo | 2,86 | 7,0 | 23,0 | 80,4 | 30,4 | 24,5 |
| 39 | Positivo | 2,23 | 6,0 | 21,0 | 94,2 | 28,6 | 26,9 |
| 40 | Positivo | 6,97 | 14,0 | 42,0 | 60,3 | 33,3 | 20,1 |
| 41 | Positivo | 5,3 | 11,0 | 36,0 | 67,9 | 30,6 | 20,8 |
| 42 | Positivo | 1,38 | 3,4 | 12,0 | 87,0 | 28,3 | 24,6 |
| 43 | Positivo | 3,41 | 7,7 | 25,0 | 73,3 | 30,8 | 22,6 |
| 44 | Positivo | 1,6 | 3,2 | 11,0 | 68,8 | 29,1 | 20,0 |
| 45 | Positivo | 6,34 | 15,8 | 47,0 | 74,1 | 24,9 | 33,6 |
| 46 | Negativo | 2,72 | 6,4 | 19,0 | 69,8 | 33,6 | 23,5 |
| 47 | Negativo | 1,59 | 3,8 | 13,0 | 81,7 | 29,2 | 23,8 |
| 48 | Negativo | 4,53 | 7,70 | 23,0 | 50,70 | 33,4 | 16,9 |
| 49 | Negativo | 3,98 | 10,5 | 31,0 | 77,9 | 33,9 | 26,4 |
| 50 | Negativo | 3,94 | 9,8 | 30,0 | 76,1 | 32,6 | 24,8 |
| 51 | Negativo | 3,53 | 8,4 | 26,0 | 73,6 | 32,3 | 23,7 |
| 52 | Negativo | 1,33 | 3,4 | 10,0 | 75,1 | 34,0 | 25,5 |
| 53 | Negativo | 1,72 | 4,2 | 12,0 | 69,8 | 35,0 | 24,4 |
| 54 | Negativo | 5,42 | 12,6 | 39,0 | 71,9 | 32,3 | 23,2 |
| 55 | Negativo | 0,6 | 1,7 | 8,0 | 73,3 | 21,3 | 28,3 |
| 56 | Negativo | 5,46 | 11,7 | 35,0 | 64,1 | 33,4 | 21,4 |
| 57 | Negativo | 5,04 | 12,6 | 39,0 | 77,3 | 32,3 | 25,0 |
| 58 | Negativo | 2,49 | 6,4 | 21,0 | 84,3 | 30,5 | 25,7 |
| 59 | Negativo | 3,81 | 9,0 | 27,0 | 70,9 | 33,3 | 23,6 |
| 60 | Negativo | 2,75 | 6,6 | 20,0 | 72,7 | 33,0 | 24,0 |

ANEXO D – Eritrograma de cães não infectados por *Ehrlichia canis* (PCR negativa)

| Animal | Mórula | ERITROGRAMA | | | | | |
|--------|----------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Hemácias (x10 ⁶ /ml) | Hemoglobina (g/dl) | Volume Globular (%) | VCM (fl) | CHCM (%) | HCM (pg) |
| 1 | Negativo | 6,92 | 18,6 | 53,0 | 76,5 | 35,0 | 26,8 |
| 2 | Negativo | 7,31 | 14,3 | 43,0 | 58,9 | 33,2 | 19,5 |
| 3 | Negativo | 6,32 | 15,3 | 45,0 | 71,2 | 34,0 | 24,2 |
| 4 | Negativo | 6,59 | 15,3 | 45,0 | 68,2 | 34,0 | 23,2 |
| 5 | Negativo | 6,50 | 17,6 | 49,0 | 75,3 | 35,9 | 27,0 |
| 6 | Negativo | 5,65 | 14,2 | 44,0 | 77,8 | 32,2 | 25,1 |
| 7 | Negativo | 6,75 | 15,5 | 41,0 | 60,7 | 37,9 | 22,9 |
| 8 | Negativo | 7,10 | 16,9 | 51,0 | 71,8 | 33,1 | 23,8 |
| 9 | Negativo | 5,74 | 13,5 | 41,0 | 71,4 | 32,9 | 23,5 |
| 10 | Negativo | 5,93 | 16,0 | 44,0 | 74,1 | 36,3 | 26,9 |
| 11 | Negativo | 6,11 | 16,3 | 45,0 | 73,6 | 36,2 | 26,6 |
| 12 | Negativo | 6,93 | 18,0 | 49,0 | 70,7 | 36,7 | 25,9 |
| 13 | Negativo | 7,64 | 16,4 | 47,0 | 61,5 | 34,8 | 21,4 |
| 14 | Negativo | 6,24 | 15,7 | 46,0 | 73,7 | 34,1 | 25,2 |
| 15 | Negativo | 6,41 | 15,9 | 48,0 | 74,9 | 33,1 | 24,8 |
| 16 | Negativo | 6,38 | 15,9 | 47,0 | 73,7 | 33,8 | 24,9 |
| 17 | Negativo | 6,42 | 16,4 | 47,0 | 73,2 | 25,5 | 34,9 |
| 18 | Negativo | 6,78 | 16,9 | 49,0 | 72,3 | 34,5 | 24,9 |
| 19 | Negativo | 4,49 | 9,7 | 29,0 | 64,5 | 33,4 | 21,6 |
| 20 | Negativo | 5,79 | 13,3 | 39,0 | 67,3 | 34,1 | 22,9 |
| 21 | Negativo | 4,46 | 10,9 | 37,0 | 82,9 | 29,4 | 24,4 |
| 22 | Negativo | 6,28 | 16,3 | 46,0 | 73,2 | 35,4 | 25,9 |
| 23 | Negativo | 6,79 | 18,2 | 54,0 | 79,5 | 33,7 | 26,8 |
| 24 | Negativo | 6,79 | 16,3 | 48,0 | 70,7 | 34,0 | 24,0 |
| 25 | Negativo | 6,63 | 14,1 | 43,0 | 64,9 | 32,8 | 21,3 |
| 26 | Negativo | 6,21 | 14,6 | 43,0 | 69,2 | 34,0 | 23,5 |
| 27 | Negativo | 5,41 | 14,2 | 42,0 | 77,6 | 33,8 | 26,2 |
| 28 | Negativo | 6,88 | 17,5 | 52,0 | 75,6 | 33,7 | 25,4 |
| 29 | Negativo | 5,00 | 11,7 | 35,0 | 70,0 | 33,4 | 23,4 |
| 30 | Negativo | 6,71 | 15,9 | 48,0 | 71,5 | 33,1 | 23,7 |
| 31 | Negativo | 7,06 | 17,6 | 52,0 | 73,7 | 33,8 | 24,9 |
| 32 | Negativo | 6,17 | 15,9 | 46,0 | 75,0 | 35,0 | 26,0 |
| 33 | Negativo | 6,22 | 15,1 | 44,0 | 70,7 | 34,3 | 24,3 |

| | | | | | | | |
|----|----------|------|------|------|------|------|------|
| 34 | Negativo | 5,04 | 12,5 | 36,0 | 71,4 | 34,7 | 24,8 |
| 35 | Negativo | 6,44 | 16,3 | 48,0 | 74,5 | 34,0 | 25,3 |

ANEXO E – Leucograma de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, com resultado positivo para PCR

| Animal | Mórula | Leucócitos (/ml) | | | | | |
|--------|----------|------------------|------------|-------------|-------------|-----------|------------|
| | | Totais | Bastonetes | Segmentados | Eosinófilos | Monócitos | Linfócitos |
| 1 | Positivo | 19.400 | 194 | 10.088 | 1.164 | 4.074 | 3.880 |
| 2 | Positivo | 7.100 | 0 | 5.112 | 497 | 284 | 1.207 |
| 3 | Positivo | 24.600 | 1.353 | 18.819 | 123 | 2.337 | 1.968 |
| 4 | Positivo | 11.200 | 112 | 5.488 | 1.232 | 784 | 3.584 |
| 5 | Positivo | 7.400 | 0 | 5.106 | 0 | 666 | 1.628 |
| 6 | Positivo | 11.900 | 833 | 7.378 | 0 | 1.904 | 1.785 |
| 7 | Positivo | 9.200 | 0 | 6.624 | 0 | 1.380 | 1.196 |
| 8 | Positivo | 22.200 | 1.332 | 18.315 | 111 | 888 | 1.554 |
| 9 | Positivo | 6.100 | 0 | 4.575 | 0 | 488 | 1.037 |
| 10 | Positivo | 6.800 | 0 | 5.236 | 0 | 680 | 884 |
| 11 | Positivo | 8.300 | 0 | 6.059 | 166 | 996 | 1.079 |
| 12 | Positivo | 4.500 | 0 | 2.565 | 45 | 270 | 1.620 |
| 13 | Positivo | 7.400 | 74 | 6.142 | 74 | 74 | 1.036 |
| 14 | Positivo | 4.900 | 245 | 2.793 | 0 | 196 | 1.666 |
| 15 | Positivo | 8.600 | 344 | 6.278 | 172 | 516 | 1.290 |
| 16 | Positivo | 7.600 | 0 | 6.232 | 0 | 836 | 532 |
| 17 | Positivo | 6.000 | 0 | 4.740 | 60 | 360 | 840 |
| 18 | Positivo | 4.900 | 0 | 3.528 | 0 | 147 | 1.225 |
| 19 | Positivo | 6.100 | 61 | 4.880 | 122 | 183 | 854 |
| 20 | Positivo | 8.000 | 80 | 6.560 | 80 | 720 | 560 |
| 21 | Positivo | 5.800 | 0 | 4.002 | 174 | 348 | 1.276 |
| 22 | Positivo | 5.800 | 0 | 4.176 | 0 | 522 | 1.102 |
| 23 | Positivo | 4.900 | 294 | 3.480 | 392 | 342 | 392 |
| 24 | Positivo | 14.800 | 0 | 13.320 | 0 | 1.184 | 296 |
| 25 | Positivo | 6.000 | 60 | 3.120 | 60 | 480 | 2.280 |
| 26 | Positivo | 2.900 | 319 | 2.088 | 0 | 58 | 406 |
| 27 | Positivo | 7.100 | 0 | 5.538 | 71 | 284 | 1.207 |
| 28 | Positivo | 10.300 | 0 | 7.313 | 0 | 1.236 | 1.751 |
| 29 | Positivo | 8.000 | 0 | 5.120 | 160 | 400 | 2.320 |
| 30 | Positivo | 7.800 | 0 | 5.226 | 78 | 1.014 | 1.482 |

Anexo E – Leucograma de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, com resultado positivo para PCR (continuação)

| Animal | Mórula | Leucócitos (/ml) | | | | | |
|--------|----------|------------------|------------|-------------|-------------|-----------|------------|
| | | Totais | Bastonetes | Segmentados | Eosinófilos | Monócitos | Linfócitos |
| 31 | Positivo | 8.600 | 6 | 5.676 | 86 | 172 | 2.660 |
| 32 | Positivo | 7.200 | 0 | 5.112 | 144 | 648 | 1.296 |
| 33 | Positivo | 10.100 | 505 | 8.282 | 0 | 909 | 404 |
| 34 | Positivo | 5.300 | 318 | 3.816 | 0 | 159 | 1.007 |
| 35 | Positivo | 6.300 | 126 | 5.292 | 0 | 189 | 693 |
| 36 | Positivo | 17.200 | 0 | 12.040 | 0 | 2.064 | 3.096 |
| 37 | Positivo | 8.000 | 0 | 5.200 | 0 | 1.440 | 1.360 |
| 38 | Positivo | 4.100 | 0 | 3.813 | 41 | 164 | 82 |
| 39 | Positivo | 56.500 | 3.300 | 50.600 | 0 | 1.639 | 961 |
| 40 | Positivo | 14.100 | 0 | 9.588 | 564 | 1.692 | 2.256 |
| 41 | Positivo | 1.800 | 0 | 756 | 36 | 684 | 324 |
| 42 | Positivo | 6.700 | 201 | 5.963 | 67 | 201 | 268 |
| 43 | Positivo | 1.100 | 22 | 660 | 0 | 220 | 198 |
| 44 | Positivo | 5.700 | 342 | 1.881 | 0 | 684 | 2.793 |
| 45 | Positivo | 5.300 | 0 | 3.975 | 424 | 212 | 689 |
| 46 | Negativo | 7.400 | 666 | 5.476 | 0 | 1.110 | 148 |
| 47 | Negativo | 13.100 | 131 | 10.611 | 0 | 1.048 | 1.310 |
| 48 | Negativo | 2.300 | 115 | 1.932 | 23 | 161 | 69 |
| 49 | Negativo | 600 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | Negativo | 900 | 18 | 306 | 54,0 | 108 | 414 |
| 51 | Negativo | 500 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 52 | Negativo | 27.900 | 4.371 | 18.135 | 0 | 1.395 | 3.534 |
| 53 | Negativo | 2.000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 54 | Negativo | 6.400 | 192 | 5.056 | 192 | 320 | 640 |
| 55 | Negativo | 3.700 | 148 | 3.367 | 0 | 37 | 148 |
| 56 | Negativo | 4.000 | 0 | 2.960 | 160 | 360 | 520 |
| 57 | Negativo | 8.400 | 0 | 4.872 | 0 | 756 | 2.772 |
| 58 | Negativo | 700 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 59 | Negativo | 8.800 | 88 | 6.952 | 176 | 88 | 1.496 |
| 60 | Negativo | 10.300 | 412 | 7.828 | 721 | 412 | 927 |

ANEXO F – Leucograma de cães não infectados por *Ehrlichia canis* (PCR negativa)

| Animal | Mórula | Leucócitos (/ml) | | | | | |
|--------|----------|------------------|------------|-------------|-------------|-----------|------------|
| | | Totais | Bastonetes | Segmentados | Eosinófilos | Monócitos | Linfócitos |
| 1 | Negativo | 7.500 | 0 | 5.100 | 975 | 225 | 1.200 |
| 2 | Negativo | 10.900 | 0 | 5.886 | 1.526 | 981 | 2.507 |
| 3 | Negativo | 18.700 | 0 | 11.407 | 3.740 | 1.496 | 2.057 |
| 4 | Negativo | 9.400 | 0 | 7.238 | 564 | 846 | 752 |
| 5 | Negativo | 9.200 | 0 | 6.532 | 644 | 828 | 1.196 |
| 6 | Negativo | 13.200 | 0 | 8.184 | 2.508 | 396 | 2.112 |
| 7 | Negativo | 12.500 | 0 | 9.125 | 1.250 | 125 | 2.000 |
| 8 | Negativo | 13.800 | 0 | 8.004 | 1.380 | 1.242 | 3.174 |
| 9 | Negativo | 10.400 | 0 | 6.032 | 2.080 | 416 | 1.872 |
| 10 | Negativo | 11.100 | 0 | 6.107 | 2.331 | 331 | 2.331 |
| 11 | Negativo | 11.500 | 0 | 7.245 | 1.035 | 575 | 2.645 |
| 12 | Negativo | 10.400 | 0 | 8.528 | 416 | 936 | 520 |
| 13 | Negativo | 17.800 | 0 | 8.544 | 1.602 | 1.424 | 6.230 |
| 14 | Negativo | 14.800 | 0 | 10.360 | 592 | 444 | 3.404 |
| 15 | Negativo | 12.100 | 0 | 9.559 | 121 | 242 | 2.178 |
| 16 | Negativo | 13.400 | 0 | 8.978 | 804 | 134 | 3.484 |
| 17 | Negativo | 12.900 | 0 | 9.288 | 129 | 129 | 3.354 |
| 18 | Negativo | 16.100 | 0 | 10.948 | 483 | 483 | 4.186 |
| 19 | Negativo | 3.100 | 186 | 1.457 | 62 | 62 | 1.333 |
| 20 | Negativo | 5.400 | 0 | 4.050 | 270 | 162 | 918 |
| 21 | Negativo | 9.700 | 291 | 7.178 | 388 | 291 | 1.552 |
| 22 | Negativo | 14.700 | 0 | 7.350 | 1.617 | 588 | 5.145 |
| 23 | Negativo | 10.300 | 0 | 6.798 | 412 | 618 | 2.472 |
| 24 | Negativo | 5.700 | 0 | 4.161 | 171 | 57 | 1.311 |
| 25 | Negativo | 11.400 | 114 | 7.410 | 912 | 684 | 2.280 |
| 26 | Negativo | 10.600 | 106 | 9.010 | 424 | 212 | 848 |
| 27 | Negativo | 6.900 | 69 | 4.140 | 828 | 207 | 1.656 |
| 28 | Negativo | 11.800 | 0 | 7.080 | 1.888 | 118 | 2.714 |
| 29 | Negativo | 12.700 | 0 | 3.937 | 254 | 127 | 8.382 |
| 30 | Negativo | 11.700 | 0 | 4.329 | 936 | 351 | 6.084 |
| 31 | Negativo | 10.800 | 108 | 7.668 | 216 | 324 | 2.484 |
| 32 | Negativo | 10.600 | 0 | 6.678 | 1.696 | 318 | 1.908 |
| 33 | Negativo | 5.600 | 0 | 3.864 | 448 | 392 | 896 |

| | | | | | | | |
|----|----------|-------|---|-------|-------|-----|-------|
| 34 | Negativo | 5.700 | 0 | 3.762 | 114 | 399 | 1.425 |
| 35 | Negativo | 7.800 | 0 | 4.524 | 1.092 | 156 | 2.028 |

ANEXO G – Proteínas plasmáticas totais (PPT), fibrinogênio plasmático, contagem de plaquetas e contagem de reticulócitos de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, com resultado positivo para PCR

| Animal | Mórula | PPT (g/dl) | Fibrinogênio (mg/dl) | Plaquetas (/µl) | Reticulócitos (%) |
|--------|----------|------------|----------------------|-----------------|-------------------|
| 1 | Positivo | 5,2 | 200 | 70.500 | 1,2 |
| 2 | Positivo | 9,4 | 400 | 61.000 | <0,5 |
| 3 | Positivo | 8,4 | 400 | 257.500 | 0,5 |
| 4 | Positivo | 7,2 | 400 | 132.500 | 0,8 |
| 5 | Positivo | 5,4 | 400 | 45.000 | 2,0 |
| 6 | Positivo | 7,6 | 400 | 70.000 | <0,5 |
| 7 | Positivo | 5,4 | 200 | 54.000 | 0,4 |
| 8 | Positivo | 6,0 | 200 | 49.500 | 2,6 |
| 9 | Positivo | 4,6 | 100 | 45.300 | 0,1 |
| 10 | Positivo | 5,4 | 400 | 45.000 | 2,0 |
| 11 | Positivo | 6,2 | 500 | 82.500 | 0,8 |
| 12 | Positivo | 5,8 | 200 | 22.500 | 0,4 |
| 13 | Positivo | 5,0 | 200 | 45.000 | 0,5 |
| 14 | Positivo | 6,4 | 400 | 18.000 | <0,5 |
| 15 | Positivo | 7,0 | 400 | 62.000 | 0,8 |
| 16 | Positivo | 7,8 | 400 | 45.000 | <0,5 |
| 17 | Positivo | 5,6 | 200 | 109.500 | 1,4 |
| 18 | Positivo | 5,6 | 200 | 103.000 | <0,06 |
| 19 | Positivo | 5,0 | 400 | 124.500 | 1,9 |
| 20 | Positivo | 6,2 | 200 | 67.500 | <0,5 |
| 21 | Positivo | 5,6 | 400 | 63.750 | <0,5 |
| 22 | Positivo | 7,4 | 200 | 35.700 | 1,0 |
| 23 | Positivo | 8,0 | 200 | 25.500 | 0,2 |
| 24 | Positivo | 8,4 | 400 | 73.950 | 0,8 |
| 25 | Positivo | 7,6 | 400 | 62.500 | <0,5 |
| 26 | Positivo | 4,0 | 400 | 30.000 | <0,5 |
| 27 | Positivo | 9,0 | 400 | 120.000 | 2,0 |
| 28 | Positivo | 4,6 | 200 | 34.500 | 0,8 |
| 29 | Positivo | 8,2 | 200 | 73.200 | 0,4 |
| 30 | Positivo | 4,0 | 200 | 105.000 | <0,1 |

ANEXO G – Proteínas plasmáticas totais (PPT), fibrinogênio plasmático, contagem de plaquetas e contagem de reticulócitos de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, com resultado positivo para PCR (continuação)

| Animal | Mórula | PPT (g/dl) | Fibrinogênio (mg/dl) | Plaquetas (/μl) | Reticulócitos(%) |
|--------|----------|------------|----------------------|-----------------|------------------|
| 31 | Positivo | 8,0 | 100 | 105.000 | 2,0 |
| 32 | Positivo | 6,4 | 500 | 152.000 | 0,9 |
| 33 | Positivo | 5,0 | 200 | 47.500 | <0,5 |
| 34 | Positivo | 4,4 | 200 | 42.000 | <0,5 |
| 35 | Positivo | 3,8 | 200 | 27.500 | <0,5 |
| 36 | Positivo | 2,6 | 200 | 77.500 | <0,5 |
| 37 | Positivo | 7,8 | 100 | 79.00 | <0,5 |
| 38 | Positivo | 5,4 | 400 | 37.500 | 1,4 |
| 39 | Positivo | 6,8 | 400 | 75.500 | 1,3 |
| 40 | Positivo | 7,2 | 200 | 87.300 | 2,0 |
| 41 | Positivo | 6,4 | 400 | 97.500 | <0,5 |
| 42 | Positivo | 6,2 | 200 | 19.500 | 1,6 |
| 43 | Positivo | 5,6 | 600 | 87.500 | <0,5 |
| 44 | Positivo | 4,4 | 200 | 67.500 | 0,8 |
| 45 | Positivo | 8,0 | 200 | 140.250 | 1,4 |
| 46 | Negativo | 5,4 | 400 | 106.000 | 0,1 |
| 47 | Negativo | 5,8 | 200 | 10.000 | 0,6 |
| 48 | Negativo | 11,2 | 400 | 120.000 | <0,5 |
| 49 | Negativo | 7,6 | 600 | 12.500 | <0,5 |
| 50 | Negativo | 7,2 | 500 | 257.500 | <0,5 |
| 51 | Negativo | 7,4 | 400 | 30.000 | <0,5 |
| 52 | Negativo | 5,6 | 200 | 12.700 | 0,75 |
| 53 | Negativo | 7,0 | 200 | 11.250 | <0,5 |
| 54 | Negativo | 9,6 | 200 | 175.950 | >1,5 |
| 55 | Negativo | 3,8 | 400 | 10.000 | <0,5 |
| 56 | Negativo | 8,2 | 200 | 170.000 | <0,5 |
| 57 | Negativo | 10,8 | 200 | 130.000 | 0,6 |
| 58 | Negativo | 8,8 | 600 | 112.500 | <0,5 |
| 59 | Negativo | 10,6 | 400 | 100.000 | <0,5 |
| 60 | Negativo | 8,4 | 200 | 127.500 | <0,5 |

ANEXO H – Proteínas plasmáticas (PPT), fibrinogênio plasmático, contagens de plaquetas e reticulócitos de cães não infectados por *Ehrlichia canis* (PCR negativa)

| Animal | Mórula | PPT (g/dl) | Fibrinogênio (mg/dl) | Plaquetas (/μl) | Reticulócitos(%) |
|--------|----------|------------|----------------------|-----------------|------------------|
| 1 | Negativo | 8,0 | 200 | 205.500 | 1,3 |
| 2 | Negativo | 8,0 | 400 | 274.500 | 0,7 |
| 3 | Negativo | 7,0 | 200 | 211.500 | 1,7 |
| 4 | Negativo | 8,0 | 200 | 186.000 | 1,8 |
| 5 | Negativo | 6,6 | 200 | 184.500 | 1,3 |
| 6 | Negativo | 7,0 | 200 | 315.000 | 1,7 |
| 7 | Negativo | 7,0 | 200 | 232.000 | 0,5 |
| 8 | Negativo | 7,6 | 200 | 186.150 | 1,8 |
| 9 | Negativo | 8,8 | 200 | 300.000 | 2,3 |
| 10 | Negativo | 8,4 | 200 | 265.200 | 0,5 |
| 11 | Negativo | 8,0 | 400 | 280.500 | <0,5 |
| 12 | Negativo | 8,8 | 400 | 153.000 | <0,5 |
| 13 | Negativo | 8,2 | 400 | 321.300 | 1,1 |
| 14 | Negativo | 6,4 | 200 | 321.300 | 0,5 |
| 15 | Negativo | 6,4 | 200 | 295.800 | 0,8 |
| 16 | Negativo | 6,2 | 200 | 331.500 | <0,5 |
| 17 | Negativo | 6,4 | 200 | 265.200 | <0,5 |
| 18 | Negativo | 6,4 | 400 | 280.500 | <0,5 |
| 19 | Negativo | 8,6 | 200 | 53.600 | <0,5 |
| 20 | Negativo | 7,2 | 200 | 150.500 | <0,5 |
| 21 | Negativo | 6,0 | 200 | 726.000 | 1,2 |
| 22 | Negativo | 7,4 | 400 | 255.000 | 1,5 |
| 23 | Negativo | 6,4 | 400 | 117.300 | <0,5 |
| 24 | Negativo | 6,8 | 400 | 89.200 | <0,5 |
| 25 | Negativo | 7,0 | 400 | 104.500 | <0,5 |
| 26 | Negativo | 7,6 | 400 | 132.600 | 0,6 |
| 27 | Negativo | 7,2 | 200 | 328.900 | <0,5 |
| 28 | Negativo | 6,2 | 200 | 293.250 | 1,15 |
| 29 | Negativo | 8,4 | 200 | 140.250 | 1,08 |
| 30 | Negativo | 7,4 | 200 | 127.500 | 1,38 |
| 31 | Negativo | 6,6 | 200 | 288.150 | 1,2 |
| 32 | Negativo | 7,0 | 400 | 255.000 | 0,5 |
| 33 | Negativo | 8,0 | 400 | 33.500 | 4,2 |

| | | | | | |
|----|----------|-----|-----|---------|------|
| 34 | Negativo | 6,0 | 400 | 76.500 | <0,5 |
| 35 | Negativo | 6,6 | 400 | 109.650 | 2,9 |

Santarém, V.A. Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*. Botucatu, 2003. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Com o objetivo de estudar os achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos associados com ehrlichiose, e comparar técnicas citológicas para detecção de mórulas de *Ehrlichia canis* a partir de um método de leuconcentração (LC) e pela citologia de sangue periférico da veia jugular (SP) e de margem de orelha (MO), foram obtidas amostras de 60 cães naturalmente infectados, utilizando-se outros 35 como controle. Para validação das técnicas, adotou-se a PCR como técnica padrão-ouro. Verificou-se que a doença foi mais comum nos meses frios e secos, nos cães com idade inferior a um ano e com definição racial, que habitavam locais com presença de terra e outros cães e tinham histórico de infestação por carrapatos. Os sinais clínicos mais comuns foram apatia, anorexia, linfadenomegalia, febre e palidez de mucosas. Melena e hemorragias na pele foram os principais sinais hemorrágicos. Anemia e trombocitopenia constituíram-se nas alterações hematológicas mais frequentes, e tiveram sua sensibilidade aumentada quando foram associadas. A leuconcentração mostrou-se a melhor técnica, especialmente para animais em fase aguda. A sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 13,33% e 100% em SP, 26,67% e 97,14% na PO, e de 73,33% e 100% para a LC. Os valores preditivos positivo e negativo corresponderam a 100% e 40,23% em SP; 94,12% e 43,59% em MO; e a 100% e 68,63% na LC.

Palavras-chave: achados clínico-laboratoriais; canino; diagnóstico; ehrlichiose; epidemiologia

Santarém, V.A. Epidemiological, clinical and hematological findings, and comparison between techniques for the diagnosis of *Ehrlichia canis*. Botucatu, 2003. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The subject of this work was to correlate the epidemiological, clinical and hematological findings with ehrlichiosis, and to compare the citological diagnostic based on the detection of *Ehrlichia canis* morulae using a leukoconcentration technique (LT) with the blood smear of peripheral vein (PV) and ear margin (EM). Sixty animals with natural infection entered in the study and others 35 were used as control. The methods were compared to the PCR “gold standard”. The disease was most frequent in the coldest and driest months. The prevalence was higher in purebred. The majority were one to twelve months old, they lived in contact with earth and dogs, and the tick infestation was related by their owners. Apathy, anorexia, lymphadenopathy, fever and pale mucous membranes were the most consistent clinical signs. The most striking hemorrhagic signals were melena e disturbes in the skin. Thrombocytopenia and anemia were the most common hematological findings, and their sensibilities were highest when they were used in combination. The LT presented the best results for the detection of morulae, specially in the acute phase of the disease. Sensibility and specificity were, respectively, of 13,33% and 100% for PV; 26,67% and 97,14% for EM; and 73,33% and 100% for LT. The predictive positive and negative values were 100% and 40,23% for PV; 94,12% and 43,59% for EM; 100% and 68,63% for LT.

Key words: clinical and laboratorial findings; canine; diagnosis; ehrlichiosis; epidemiology