

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Erliquiose monocítica canina subclínica, naturalmente
adquirida – diagnóstico, aspectos clínico-laboratoriais,
envolvimento renal e evolução com o tratamento**

Marcelo Augusto Moraes Koury Alves
Médico Veterinário

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Erliquiose monocítica canina subclínica, naturalmente
adquirida – diagnóstico, aspectos clínico-laboratoriais,
envolvimento renal e evolução com o tratamento**

Marcelo Augusto Moraes Koury Alves

Orientadora: Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, *campus* de Jaboticabal, como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária (área de concentração em
Clínica Médica)**

2013

Alves, Marcelo Augusto Moraes Koury
A474e Erliquiose monocítica canina subclínica, naturalmente adquirida –
diagnóstico, aspectos clínico-laboratoriais, envolvimento renal
evolução com o tratamento / Marcelo Augusto Moraes Koury Alves. –
– Jaboticabal, 2013
xvii, 55 p.; 28 cm

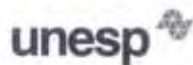
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Marileda Bonafim Carvalho
Banca examinadora: Luciano Henrique Giovaninni, Marcos Rogério
André
Bibliografia

1. Cães. 2. Erliquiose. 3. Função renal. 4. Proteinúria. 5. Excreção
fracionada. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:616.995.42:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento
da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP,
Câmpus de Jaboticabal.

e-mail: Marcelo_koury_vet@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA SUBCLÍNICA, NATURALMENTE ADQUIRIDA - DIAGNÓSTICO, ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS, ENVOLVIMENTO RENAL E EVOLUÇÃO COM O TRATAMENTO

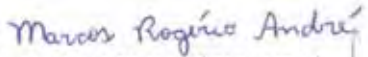
AUTOR: MARCELO AUGUSTO MORAES KOURY ALVES

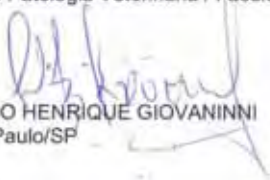
ORIENTADORA: Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. LUCIANO HENRIQUE GIOVANNINI
Ancivepa / São Paulo/SP

Data da realização: 25 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marcelo Augusto Moraes Koury Alves – Filho de José Antônio Koury Alves e Isis Moraes Koury Alves, nascido em 5 de outubro de 1983, na cidade de Belém, Estado do Pará, tornou-se Médico Veterinário pela Universidade Federal Rural da Amazônia aos 25 dias do mês de abril do ano de 2008. Um ano após, participou do programa de residência em Clínica Médica de Pequenos Animais, oferecido pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista (Unesp), *campus* de Jaboticabal, no período de 1 de fevereiro de 2009 a 31 de janeiro de 2011, perfazendo 3.520 horas de atividades, sob orientação da Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho. Em março de 2011, iniciou Curso de Mestrado oferecido pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica, da FCAV-Unesp, *campus* de Jaboticabal, também sob orientação da referida professora.

“Se o rouxinol não canta, esperarei até que ele cante”

Ieyassu Tokugawa

Dedico este trabalho a todos os animais que, por seus proprietários, a mim foram confiados durante este período de intenso aprendizado. Sem nenhuma dúvida foram de vital importância para minha formação não só profissional, mas como ser humano.

Tenho certeza que aprendi o sentido do amor puro muito mais com vocês, que vocês comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Meishusama por tudo que passei e passo, percebendo que até as coisas ruins possuem um grande, e por muitas vezes enigmático, lado bom.

Aos meus pais José Antônio Koury Alves e Isis Moraes Koury Alves, e ao meu irmão José Antônio Koury Alves Jr, por todo amor apoio e confiança, sem medida, depositados. Dizer quanto os amo, seria redundante.

Aos amigos, atual família-irmãos (Bruno; Fabio; Franco; Gabriel; Gustavo; Mauricio; Thiago; Sabrina) e a uma amiga-mãe (Sandrinha), obrigado por toda paciência, cuidado e zelo com este migrante perdido, denominado “Pará”. Por terem me acolhido e ensinado. Se hoje estou aqui, grande parte do mérito é de vocês.

À minha orientadora Marileda Bonafim Carvalho, obrigado por mais dois anos de apoio, cuidado e paciência, sou muito grato pela chance de crescer não só em minha vida profissional, como pessoal.

À minha coorientadora Professora Mirela Tinucci Costa, obrigado por toda confiança, apoio e conhecimento desde o período de residência. Serei eternamente grato.

Aos residentes do Hospital Veterinário, pela ajuda na seleção dos casos.

À professora Rosângela Zacarias Machado, pela disponibilidade em realizar os testes diagnósticos.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa, pela análise estatística dos resultados.

Aos professores Marcia Ferreira da Rosa Sobreir e Marcos Rogério André, pela colaboração com suas sugestões apresentadas por ocasião do Exame de Qualificação, que foram muito relevantes a forma que aqui se apresenta.

Ao Fabricio, amigo companheiro, obrigado pelos dois anos de residência de muito trabalho e estresse. Uma amizade para a vida inteira.

Ao técnico Eugenio do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária. Seu apoio e conhecimento, sem dúvida, foram imprescindíveis ao desenvolvimento do projeto.

Ao técnico Assis do Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose. Seu apoio e conhecimento, sem dúvida, foram imprescindíveis ao desenvolvimento do projeto.

Por último e não menos importante, aos animais e seus proprietários, que possibilitaram o desenvolver deste estudo. Não tenho como mensurar minha gratidão a vocês.

À empresa Ouro Fino[®] pela disponibilização do antibiótico (Doxifim[®]) o que viabilizou tratamento dos animais do presente estudo sem custo para os proprietários.

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela concessão de Bolsa de estudo e Reserva Técnica, que viabilizaram as atividades acadêmicas e o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa (Processo nº 2011/03548-1).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE TABELAS E QUADROS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
I-INTRODUÇÃO	1
II-REVISÃO DE LITERATURA	3
III-BJETIVOS	8
IV-MATERIAIS E MÉTODOS	9
V- RESULTADOS	19
VI-DISSCUSSÃO	40
VII-CONCLUSÕES	46
VIII- REFERÊNCIAS	47



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 010219/11 do trabalho de pesquisa intitulado **"Avaliação da função renal de cães com erliquiose naturalmente adquirida, com enfoque nas excreções urinárias de sódio e proteína e suas correlações com a homeostase, apresentação clínica e evolução"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Marileida Bonafim Carvalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de Junho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA SUBCLÍNICA, NATURALMENTE ADQUIRIDA – DIAGNÓSTICO, ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS, ENVOLVIMENTO RENAL E EVOLUÇÃO COM O TRATAMENTO

RESUMO - A erliquiose canina é uma doença causada pela bactéria Gram-negativa *Ehrlichia canis* transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. A enfermidade é endêmica em muitas regiões do mundo e motivo de investigação científica em muitos países. Independentemente dos muitos avanços sobre a patogênese e o diagnóstico da doença existem poucos conhecimentos sobre o acometimento renal. O presente estudo teve por escopo caracterizar a condição clínico-laboratorial, com enfoque na função renal, de cães com erliquiose monocítica canina (EMC) naturalmente adquirida, associada ou não à babesiose, ambas em fase subclínica, antes, durante e após tratamento convencional. Foram avaliados 30 cães adultos, sem distinção de sexo ou de raça, atendidos no Hospital Veterinário - Unesp – campus de Jaboticabal. Os animais foram distribuídos em 3 grupos – cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10). O diagnóstico de EMC foi feito com base nos achados hematológicos, testes de sorologia e PCR. Os achados das avaliações de função renal sugerem fortemente que cães com EMC subclínica, com ou sem coinfeção por *Babesia vogeli*, apresentam glomerulopatia de curso insidioso. Assim, pode ser sugerido que em áreas endêmicas para estas doenças, as avaliações de rotina incluam contagem de plaquetas e teste sorológico rápido dot-ELISA para diagnóstico de erliquiose para cães com histórico de parasitismo por carrapatos. Intervenções precoces poderão prevenir os casos, tão comuns em nosso meio, de erliquiose crônica diagnosticada somente quando a insuficiência renal crônica se manifesta.

Palavras chave: cães, *Ehrlichia canis*, função renal, proteinúria, excreção fracionada.

SUBCLINICAL CANINE MONOCYTIC EHRLICHIOSIS, NATURALLY ACQUIRED - DIAGNOSIS, CLINICAL AND LABORATORY ASPECTS, RENAL INVOLVEMENT AND EVOLUTION WITH TREATMENT

ABSTRACT - The canine ehrlichiosis is a disease caused by the Gram-negative bacterium *Ehrlichia canis* transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. The disease, endemic in many regions of the world, is an issue of scientific research in many countries. Regardless of many advances in studies on the pathogenesis and diagnosis of the disease, there are few knowledges about the renal involvement. The present study aimed to characterize the clinical and laboratory condition, focusing on renal function in dogs with canine naturally acquired monocytic ehrlichiosis (CME) associated or not with babesiosis in the subclinical phase, before, during, and after conventional treatment. For this purpose, it were evaluated 30 adult dogs, with no gender or breed distinction, selected at the Veterinary Hospital – Unesp – *campus* Jaboticabal. The animals were distributed in three groups – normal dogs (GN; n=5), dogs with subclinical ehrlichiosis (GE; n=15) and dogs with subclinical ehrlichiosis and babesiosis (GEB, n =10). The CME diagnosis was made based on hematologic findings, serological and PCR techniques. Renal function findings strongly suggest that dogs with subclinical CME, associated or not to *Babesia vogeli* coinfection, develop insidious glomerulopathy. Results suggest that in endemic areas for these diseases, the routine assessments including platelet count and quick serological test dot- ELISA are reliable for the diagnosis of canine ehrlichiosis for dogs with a history of parasitism by ticks. Early intervention may prevent cases, so common in our region, of chronic ehrlichiosis diagnosed only when chronic renal failure is manifested.

Key words: dogs, *Ehrlichia canis*, renal function, proteinuria, fractional excretion.

LISTA DE QUADROS ETABELAS

	Página
Quadro 1. Protocolo de avaliação dos animais.	13
Quadro. 2. Resultados positivos (P) e negativos (-) obtidos nos testes para diagnóstico de infecção ou exposição aos agentes <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia vogeli</i> e <i>Leptospira</i> spp de 30 cães. Unesp – Jaboticabal, 2013.	26
Tabela. 1. Características físicas dos 30 cães avaliados distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.	20
Tabela. 2. Aspectos clínicos verificados por ocasião dos exames preliminares de 30 cães distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.	21
Tabela. 3. Resultado dos hemogramas (média $\pm$ erro padrão da média) de cinco avaliações (basal, 15, 30, 45, e 60 dias) de 30 cães distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.	23
Tabela 4. Resultados dos testes para diagnóstico de infecção ou exposição aos agentes <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia vogeli</i> e <i>Leptospira</i> spp de 30 cães para. Unesp – Jaboticabal, 2013.	25
Tabela.5. Resultado (média $\pm$ erro padrão da média) das avaliações séricas de sódio, globulina, ureia, proteína total, creatinina, albumina, fósforo, alanina aminotransferase e dos resultados da razão proteína/creatinina urinária, excreção fracionada de sódio e das aferições da pressão arterial, no tempo zero (basal) de 30 cães distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.	29

Página

Tabela 6. Resultado (média $\pm$ erro padrão da média) das avaliações séricas de sódio, globulina, ureia, proteína total, creatinina, albumina, fósforo, alanina aminotransferase e dos resultados da razão proteína/creatinina urinária, excreção fracionada de sódio e das aferições da pressão arterial, nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias, de 30 cães distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.	30
Tabela 7. Resultados da análise de variância para todos os parâmetros avaliados nos cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB), levando em consideração o fator grupo, fator tempo e a interação grupo vs tempo. Unesp – Jaboticabal, 2013	32
Tabela 8. Número de plaquetas (média $\pm$ erro padrão da média e dados da análise estatística) de cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB), avaliados em cinco tempos. Unesp – Jaboticabal, 2013	33
Tabela 9. Classificação dos resultados da excreção urinária de proteína, estimada pela razão proteína/creatinina urinária em urina de 25 cães, apresentada como número de animais e percentual em relação ao total do grupo. Cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB), nos tempos: basal e 15, 30, 45 e 60 dias de avaliação. Os pacientes foram tratados ⁽¹⁾ durante os 30 dias iniciais. Unesp – Jaboticabal, 2013.	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. – Representação gráfica das médias dos números de plaquetas por grupo (superior) e por tempo em cada grupo (inferior) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.	24
Figura 2 – Representação gráfica dos resultados dos testes para diagnóstico de infecção ou exposição ao agente <i>Ehrlichia canis</i> em amostras de sangue de 30 cães avaliados por meio de testes sorológicos (dot-ELISA e RIFI), Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e presença de mórulas em esfregaço sanguíneo de capilar periférico. Unesp – Jaboticabal, 2013.	27
Figura 3. Representação gráfica das médias dos valores séricos de ureia por grupo (superior) e por tempo em cada grupo (inferior) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.	31
Figura 4. – Representação gráfica das médias da excreção fracionada de sódio por grupo (superior) e por tempo em cada grupo (intermediário) e sódio (inferior) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. O asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.	34
Figura 5 – Representação gráfica das médias dos valores séricos de proteína, albumina e globulina por grupo (superior) e da razão proteína/creatinina urinária por grupo e tempo em cada grupo (intermediário e inferior, respectivamente) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.	35

Página

Figura 6 – Representação gráfica das médias dos valores de pressão por grupo (superior) e por tempo em cada grupo (inferior) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.

36

Figura 7 – Representação gráfica das médias da razão proteína/creatinina urinária, do grupo de animais doentes, cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) acima e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10) abaixo, avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.

37

1. INTRODUÇÃO

A *Ehrlichia canis* (*E. canis*), bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória, é considerada um patógeno de distribuição mundial, endêmico nas áreas urbanas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a região sudeste figura entre as com maior número de cães infectados e, por conseguinte, o patógeno vem sendo alvo de vários estudos.

A erliquiose monocítica canina, como é conhecida a doença infectocontagiosa causada pela *E. canis*, pode acometer animais de todas as idades, independente de sexo ou raça. A doença se desenvolve após transmissão da *E. canis* pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*.

O ciclo de vida do agente nos cães acometidos ocorre no citoplasma de células da medula óssea, predominantemente monócitos e macrófagos, com período de incubação variando entre oito e vinte dias, após o qual aparecem os sinais que caracterizam a fase aguda da doença. Se não houver eliminação do agente, podem se seguir as fases subclínica e crônica.

O diagnóstico clínico da erliquiose monocítica canina é feito com base no histórico e nos resultados do exame físico e hematológico. A confirmação laboratorial pode ser feita por meio de testes sorológicos, incluindo a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o dot-ELISA. Já o diagnóstico etiológico é feito pela detecção do DNA do agente por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Classicamente, são descritas diversas manifestações clínicas e laboratoriais que caracterizam a erliquiose canina. Entretanto, a patogenia ainda não é plenamente conhecida, principalmente no que se refere às lesões renais. Alguns animais infectados pela *E. canis* apresentam glomerulopatia, teoricamente, relacionada à deposição de imunocomplexos. Relata-se a ocorrência de proteinúria ao longo do curso da enfermidade, mas não há informações sobre o possível envolvimento do componente túbulo-intersticial.

Na prática clínica, em nosso meio, são muito frequentes os casos de cães com glomerulopatia que já se encontram com insuficiência renal crônica. As investigações sobre os possíveis fatores causais, muitas vezes, apontam para a

erliquiose monocítica canina e, mesmo que sejam instituídos os cuidados e tratamentos visando à doença de base, a condição de insuficiente renal crônico não pode ser revertida. Considerando o fato de que o diagnóstico precoce de lesão renal é determinante para a implementação de tratamento para impedir ou retardar a progressão da doença, justificam-se os estudos que possam ampliar o número de informações sobre a patogenia e os sinais clínicos e laboratoriais que caracterizem a condição em pauta.

Assim, o estudo aqui descrito teve por objetivo avaliar cães com erliquiose monocítica canina, naturalmente adquirida, em fase subclínica da doença, quando já houve, supostamente, tempo suficiente para o desenvolvimento de lesão renal sem, contudo, ocorrer comprometimento severo das funções do órgão, como observado em casos de erliquiose crônica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infectocontagiosa causada pela *Ehrlichia canis*, bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória (LEWIS et al., 1977; DUMLER et al., 2001), que acomete animais de todas as idades, independente de sexo ou raça (ISOLA; CADIOLI; NAKAGE, 2012).

O gênero *Ehrlichia*, da família Anaplasmataceae, atualmente compreende cinco espécies de bactérias Gram-negativas, quais sejam, *Ehrlichia ruminantium*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. canis* (DUMLER et al., 2001). Segundo Cohn (2003), a *E. canis* foi a primeira relatada como patógeno de importância veterinária, e, talvez, seja a melhor estudada. No Brasil, a única espécie descrita em cães era a *E. canis* (LABRUNA et al., 2007), mas, recentemente, foram relatados cinco casos de cães infectado por *E. ewingii* (OLIVEIRA et al., 2009). Entretanto, somente a *E. canis* foi isolada com sucesso em cultura celular (VIEIRA et al., 2011).

Quanto à transmissão do patógeno, o vetor responsável é o carrapato, que pode vir a repassar de forma horizontal a infecção erliquial aos hospedeiros vertebrados. A *E. canis* é usualmente transmitida através da secreção salivar do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, fato este, que ocorre no momento do repasto sanguíneo (COHN, 2003). O vetor é de difícil erradicação (ISOLA; CADIOLI; NAKAGE, 2012) e a infecção ocorre principalmente nas estações quentes quando o carrapato está mais ativo (HARRUS; WANER, 2011). Entretanto, há suspeita de que outra espécie de carrapato, *Amblyomma cajennense*, seja um vetor ativo da *E. canis* em áreas rurais (COSTA et al., 2007), embora estudos de competência vetorial ainda não tenham sido desenvolvidos.

Há algum tempo, sabe-se que a *E. canis* é um patógeno de distribuição mundial (DAGNONE et al., 2003), que causa enfermidade endêmica, comum em áreas urbanas (LABRUNA; PEREIRA, 2001; AGUIAR et al., 2007; NAKAGHI et al., 2008; VIEIRA et al., 2011). Na atualidade encontra-se distribuída especialmente em áreas tropicais e subtropicais, onde a morbidade e a mortalidade são expressivas (RIKIHISA, 1991; COHN, 2003). Os primeiros relatos de EMC no Brasil foram feitos na década de 70. Desde então, cresceu acentuadamente o número de animais diagnosticados com o parasita. Segundo Labarthe et al. (2003), o número de

animais infectados avaliados nos hospitais e clínicas veterinárias do Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste, havia chegado a 20% do atendimento. Em publicação recente, Vieira et al. (2011) relataram a persistência de incidência alta entre cães domésticos no Brasil.

Após o contágio e período de incubação, que varia entre oito e vinte dias, aparecem os sinais que caracterizam a fase aguda da doença. Se não houver eliminação do agente, podem se seguir as fases subclínica e crônica (HARRUS et al., 1997).

A fase aguda, que perdura por duas a quatro semanas (HARRUS; NEER, 2006), é caracterizada por hipertermia, perda de peso, descarga óculo-nasal, anorexia, palidez de mucosas, depressão, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, distúrbios cardiorrespiratórios, vasculite, petéquias, equimoses, sinais neurológicos, musculares, oculares, poliartrite e proteinúria (WANER et al., 1999; HARRUS; NEER, 2006). As anormalidades hematológicas mais comuns são trombocitopenia e leucopenia branda (DAVOUST et al., 1991; WANER et al., 1995; FARIA; RIBEIRO; TINUCCI-COSTA., 2003; CASTRO et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008). Os sinais clínicos da fase aguda podem, aparentemente, se resolver sem tratamento. Porém a eliminação da *E. canis* é difícil e os cães, permanecendo infectados, passam à fase subclínica da doença (HARRUS et al., 1998).

A fase subclínica pode estender-se por meses ou anos, sem sinais clínicos. Por este motivo, recomendam-se avaliação hematológica e sorológica periódica de animais em áreas endêmicas (BANETH et al., 1996; WANER et al., 1997). Nesta fase, podem ocorrer trombocitopenia e leucopenia (HARRUS et al., 2004), com aumento dos títulos de anticorpos contra *E. canis* no soro (IQBAL; RIKIHISA, 1994).

Os cães, incapazes de desenvolver resposta imune efetiva, passam à fase crônica e apresentam depressão, fraqueza, anorexia, emagrecimento, palidez de mucosas, febre, diátese hemorrágica, edemas periféricos, sinais pulmonares, glomerulonefrite, artrite, desordens reprodutivas, sinais oftálmicos, alterações neurológicas e pancitopenia (HARRUS et al., 1999). O prognóstico torna-se ruim quando o quadro pancitopênico está presente (WANER et al., 1999).

O diagnóstico precoce da infecção pode conduzir a um tratamento imediato, e assim, aumentar as chances de sucesso (WANER et al., 1999; MUNHOZ et al.,

2012). Entretanto, o diagnóstico é desafiador em função das diferentes fases e manifestações clínicas múltiplas da doença. Portanto, deve-se suspeitar de EMC quando houver histórico compatível, sinais clínicos, características hematológicas e anormalidades bioquímicas típicas da doença (HARRUS; WANER, 2011).

O diagnóstico clínico da erliquiose canina é feito com base no histórico e nos resultados do exame físico e hematológico (NAKAGHI et al., 2008; FARIA et al., 2010). Dentre as alterações hematológicas destaca-se a trombocitopenia e, portanto, a contagem de plaquetas tem sido usada como um teste de triagem em regiões endêmicas (HARRUS; WANER, 2011).

O ciclo do agente ocorre no citoplasma de células maduras ou imaturas da medula óssea, predominantemente as da linhagem monocítica. As inclusões intracitoplasmáticas do microrganismo podem ser individuais ou compactas, denominadas mórulas (COHN, 2003; NAKAGHI et al., 2008; DUMLER et al., 2011). O diagnóstico etiológico para o gênero erliquia pode ser feito por meio da detecção do DNA do agente pela PCR, a partir de amostra de sangue circulante (NAKAGHI et al., 2008; FARIA et al., 2010) ou do baço (FARIA et al., 2010). A detecção molecular de *Ehrlichia spp* constitui o teste diagnóstico definitivo (DAGNONE et al., 2003; BULLA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2005). Porém, os casos de animais infectados nem sempre positivos à PCR, podem ser diagnosticados pelo concurso de provas sorológicas (NAKAGHI et al., 2008; FARIA et al., 2010). Eventualmente, na fase aguda, podem ser identificadas mórulas de *E. canis* nos leucócitos ou plaquetas (NAKAGHI et al., 2008; DAGNONE et al., 2010). O diagnóstico diferencial com leptospirose é recomendado, em virtude da semelhança dos sinais clínicos e laboratoriais com a erliquiose monocítica canina (HARRUS; NEER, 2006).

Dentre os testes sorológicos, a RIFI tem sido considerada a mais aceita e amplamente usada para o diagnóstico da infecção por *Ehrlichia spp* (NAKAGHI et al., 2008; HARRUS; WANER, 2011). Entretanto, na atualidade, vários outros métodos sorológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico rápido da enfermidade, sendo considerados ferramentas valiosas. Dentre estes, o Immunocomb¹ (kit dot-ELISA), tem demonstrado sensibilidade e especificidade altas para *E. canis* (HARRUS; WANER, 2011). Labarthe et al. (2003) recomendam o uso

¹ fabricante Biogal, Galed Laboratories.

de testes sorológicos, como métodos confiáveis de diagnóstico em cães alocados em regiões de alto risco no Brasil.

Nakaghi et al. (2008) concluíram que os exames de sorologia e PCR são considerados os mais adequados para confirmação do diagnóstico da EMC. No entanto, devem sempre ser tratados como um conjunto de dados complementares à avaliação clínica e hematológica. Segundo Harrus e Waner (2011), apesar da técnica de PCR ser um método confirmatório definitivo para infecção por *E. canis*, os resultados negativos devem ser interpretados com cuidado, uma vez que não se pode excluir totalmente a presença do agente na amostra e que a contagem de plaquetas e a sorologia funcionam como um bom painel diagnóstico.

Além das várias alterações classicamente descritas como parte da patogenia da erliquiose, também ocorrem lesões renais que podem evoluir desfavoravelmente e resultar em déficit funcional (TROY; VULGAMONT; TURNWALD, 1980; BREITSCHWERDT et al., 1987; HARRUS; NEER, 2006). Porém, a patogênese das lesões renais na erliquiose ainda não é bem compreendida.

Alguns animais infectados pela *Ehrlichia canis* podem desenvolver glomerulopatia relacionada à deposição de imunocomplexos (CODNER et al., 1992), associada com proteinúria (FRANCK; BREITSCHWERDT.,1999). Castro et al. (2004) sugerem que o quadro de vasculite imunomediada pode desempenhar papel central na patogênese da EMC e no desenvolvimento das lesões encontradas nos diversos tecidos e órgãos de animais infectados.

Em alguns casos de EMC os pacientes podem apresentar aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina, como constatado em estudo retrospectivo (HARRUS et al., 1997). Também ocorre proteinúria na maioria dos pacientes e, como revelado pela razão proteína/creatinina urinária, há variação possivelmente relacionada à gravidade da enfermidade, (CODNER; MASLIN, 1992). Pode ocorrer hipoalbuminemia associada à proteinúria (CODNER; MASLIN, 1992; KATAOKA; SANTANA; SEKI, 2006). Em relato de caso de um paciente humano apresentando síndrome nefrótica, Scaglia et al. (1999) levantaram a hipótese de ter havido glomerulopatia de lesão mínima em decorrência de infecção por *E. canis*. Bonfanti et al. (2004) relatam que há aumento da excreção urinária de proteínas de cadeia leve em cães acometidos por agentes infecciosos, incluindo *Ehrlichia* spp e

Babesia spp, e que deve ser considerada a possibilidade de haver envolvimento tubular, além do glomerular, embora ainda não existam evidências conclusivas.

Sabe-se que os rins possuem múltiplas funções como filtração glomerular, reabsorção e excreção tubulares, papel endócrino e metabólico. Quaisquer dessas funções podem ser investigadas com propósito diagnóstico, mas não há um único teste que sirva para avaliação de todas elas. Os eletrólitos presentes na urina podem ser mensurados diretamente e servem também para estimar o trabalho tubular de reabsorção dessas substâncias. Pode ser calculado, para cada eletrólito, o percentual excretado em relação à quantidade filtrada na urina, ou seja, a excreção fracionada. Em indivíduos sadios, a excreção fracionada (EF) pode variar em função das flutuações das quantidades de eletrólitos que ingressam no organismo. Os resultados imediatos são a manutenção da homeostase e alterações da composição da urina. Diversas condições patológicas de caráter sistêmico levam a alterações da homeostase de água e eletrólitos e, conseqüentemente, das respectivas EF. Sob condições normais, aproximadamente 99% da carga de sódio filtrada pelos glomérulos são reabsorvidos pelos túbulos e o 1% restante é excretado na urina, movimento este que é acompanhado por igual percentual de água (FINCO, 1995). A excreção fracionada de sódio é a mais conhecida e pode ser utilizada clinicamente para diferenciar azotemias pré-renais e renais (LEFEBVRE et al., 2008). Nos casos de doenças renais crônicas, especialmente quando a taxa de filtração glomerular já está diminuída, ocorre aumento da excreção fracionada de sódio e outros eletrólitos (FINCO, 1995; LEFEBVRE et al., 2008), mas os resultados obtidos, deverão sempre ser avaliados em relação à concentração plasmática do eletrólito e dos achados clínicos (LEFEBVRE, 2011).

Embora seja amplamente difundida a informação de que existe relação entre a EMC o desenvolvimento de lesão renal nos cães acometidos, pouco se sabe sobre este tema. Existem alguns indicadores de que as lesões sejam predominantemente glomerulares, mas não se pode descartar um possível envolvimento tubular. Considerando válida esta hipótese, foi elaborado o presente estudo que contempla a avaliação clínica, por meio de exames de rotina para avaliação de função glomerular e tubular de cães com EMC subclínica.

3. OBJETIVOS

GERAL – Caracterizar a condição clínico-laboratorial, com enfoque em função renal, de cães com EMC naturalmente adquirida associada ou não com babesiose, em fase subclínica, antes, durante e após tratamento convencional.

ESPECÍFICOS

1. Identificar cães com EMC subclínica por meio de testes para diagnóstico molecular e sorológico e dos sinais clínicos e laboratoriais predominantes.
2. Identificar cães com EMC e coinfeção por *Babesia vogeli* por meio de testes sorológicos.
3. Avaliar parâmetros relacionados direta ou indiretamente à função renal – densidade urinária, sedimentoscopia urinária, excreção urinária de proteína, excreção fracionada de sódio e concentrações séricas de ureia, creatinina, proteína total, albumina e sódio, e pressão arterial sistólica.
4. Investigar as relações de interesse clínico, para fins diagnósticos, entre os parâmetros direta e indiretamente relacionados à função renal e aqueles que classicamente caracterizam clínica e laboratorialmente a EMC, com ou sem infecção mista por *B. vogeli*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização da pesquisa

O estudo foi realizado nas dependências dos Laboratórios de Nefrologia e Urologia do Grupo de Pesquisa em Nefrologia e Urologia Veterinária (GPNUV), Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária e Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – *campus* de Jaboticabal – SP.

4.2 Animais

Os trabalhos foram iniciados após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *campus* de Jaboticabal (nº 010219/11).

Foram estudados 30 cães adultos, sem distinção de sexo ou raça, provenientes dos Serviços Especializados de Atendimento do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e Hospital Veterinário - Unesp – *campus* de Jaboticabal - SP. A inclusão de pacientes deu-se sob anuência dos proprietários e os exames necessários, bem como o tratamento dos doentes, foram custeados pelo projeto.

4.3 Avaliação preliminar dos animais elegíveis para o estudo

A fim de compor o grupo de cães com erliquiose em fase subclínica, primeiramente selecionavam-se, diretamente no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, os casos com trombocitopenia (<180.000 plaquetas/ μL) com ou sem leucopenia, alteração que também pode estar associada a animais em fase subclínica. E sem anemia ao hemograma evitando, assim, animais em fase aguda ou crônica da doença.

Logo após, procurava-se o setor no qual o animal estava sendo atendido, para obter informações sobre o caso incluindo motivo da consulta, condições clínicas e histórico de parasitismo por carrapato. Persistindo a possibilidade de erliquiose subclínica e anuência do proprietário, era feito teste sorológico rápido (dot-ELISA) para diagnóstico de erliquiose a partir do sangue já obtido no momento inicial da consulta. Também era feito esfregaço de sangue de capilar periférico de ponta da orelha do cão para pesquisa de inclusões citoplasmáticas sugestivas de *Ehrlichia* sp,

evitando assim, animais em fase aguda da doença onde as inclusões citoplasmáticas são observadas.

A fim de compor o grupo de cães sadios foram utilizados animais sem histórico de parasitismo por carrapatos, sem alterações aos exames físico, ultrassonográfico, hematológico e sorológico, que foram levados ao atendimento para check-up ou procedimentos eletivos.

Foram elegíveis para composição dos grupos avaliados, cães adultos, que apresentaram características clínicas e laboratoriais, detectadas aos exames de rotina (anamnese, exame físico e exames complementares – patologia clínica e imagem), compatíveis com erliquiose em fase subclínica e também os que estavam sadios (encaminhados para vacinação ou cirurgias eletivas).

4.4 Critérios para inclusão ou exclusão de pacientes e formação dos grupos

Os critérios iniciais para exclusão dos pacientes foram (1) resultado negativo ao dot-ELISA ou identificação de mórula ao exame do sangue periférico, (2) existência de anemia ao hemograma, (3) existência de sinais sugestivos de erliquiose em fase aguda ou crônica, (4) suspeita ou existência de comorbidades de natureza infecciosa, parasitária ou inflamatória com comprometimento urinário ou sistêmico, e as imunomediadas, neoplásicas ou circulatórias, (5) gestação, lactação, aborto ou cio, e (6) necessidade de qualquer outra intervenção terapêutica, além da prevista no estudo, durante o período das avaliações (60 dias). Os animais que posteriormente também apresentaram positividade ao exame de soroaglutinação microscópica para *Leptospira* spp, foram excluídos do experimento

Foram incluídos os animais positivos ao dot-ELISA para diagnóstico sorológico de infecção por *E. canis*, respeitados os critérios de exclusão, e também cães sadios. Os pacientes com erliquiose subclínica que, posteriormente tiveram resultado positivo para *B. vogeli*,. Assim, os grupos foram constituídos como se segue.

Grupo normal (GN) – cinco cães sadios.

Grupo erliquiose (GE) – 15 cães com erliquiose subclínica e soronegativos para *B. vogeli* pela RIFI.

Grupo erliquiose e babesiose (GEB) – 10 cães com erliquiose subclínica e soropositivos para *B. vogeli* pela RIFI.

4.5 Protocolo experimental

A condução do experimento seguiu um delineamento em blocos casualizados. Cada animal, estando clinicamente designado a compor um dos três grupos a serem estudados, foi submetido a cinco avaliações, guardado intervalo de 15 dias entre cada uma (0, 15, 30, 45 e 60 dias), conforme discriminado no Quadro 1.

Uma vez constatada a elegibilidade do paciente para o estudo, por ocasião da avaliação preliminar, era feito o agendamento para iniciar as avaliações na manhã do dia seguinte. Visando à padronização das condições e momento das coletas de amostras com o objetivo de evitar as variações nictemerais e a influência da alimentação, foram seguidas as regras propostas por FINCO (1995) e referidas por LEFEBVRE et al. (2008), para obtenção de amostras pontuais. Assim, no dia anterior ao da coleta, o paciente recebia a última refeição às 17:00h. A água, contudo, era mantida disponível para ingestão *ad libitum*, durante as 15 horas subsequentes. Durante o período de pré-avaliação, o paciente era mantido no próprio domicílio evitando assim, estresse pela mudança de ambiente. Na manhã seguinte, no Hospital Veterinário, às 8:00h, a vesícula urinária era esvaziada e, três horas depois, coletava-se uma amostra da urina recém formada e uma amostra de sangue. Durante o tempo de espera (3h) realizava-se o exame clínico. O mesmo protocolo foi adotado para as avaliações seguintes (15, 30, 45 e 60 dias).

Os parâmetros avaliados, em cada um dos cinco momentos, incluíram (1) os que caracterizam a erliquiose e babesiose – dados hematológicos, resultados dos testes para diagnóstico sorológico e molecular e resposta ao tratamento, (2) os diretamente relacionados à função renal – densidade urinária, achados da sedimentoscopia urinária, excreção urinária de proteína, excreção fracionada de sódio e concentrações séricas de ureia e creatinina, e (3) os que são indiretamente

relacionados à função renal – concentrações séricas de proteína total, albumina e sódio, e pressão arterial sistólica.

Os parâmetros séricos, fósforo e alanino aminotransferase, dosados somente no primeiro momento de avaliação, podem ser alterados na infecção pela *E.canis* e, necessitar de intervenção imediata. Entretanto, nenhum dos animais do presente estudo apresentaram valores fora do intervalo de referência para a espécie.

Somente na primeira avaliação (dia zero), coletaram-se amostras de sangue para testes posteriores por meio de PCR para *Ehrlichia canis*, sorologia (RIFI) para *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli*, e soroaglutinação microscópica para *Leptospira* spp.

Com base nos resultados clínico-laboratoriais e do teste sorológico rápido (dot-ELISA), todos os pacientes com erliquiose (GE e GEB) foram medicados com doxiciclina (5mg/kg, via oral, a cada 12 horas) durante 30 dias consecutivos e Dipropionato de Imidocarb (5mg/kg, via subcutânea, a cada 15 dias/2 aplicações), a partir da primeira avaliação (dia zero) em cumprimento ao protocolo de tratamento utilizado na Instituição. Os cães saudáveis não receberam qualquer tipo de tratamento ao longo do período de estudo.

Quadro 1. Protocolo de avaliação dos animais.

AVALIAÇÃO	EXAMES CLÍNICOS E LABORATORIAIS
Dia 0 (basal)	1. Anamnese, exame físico de rotina e mensuração da pressão arterial. 2. Hemograma, urinálise, bioquímica sérica (ureia, creatinina, proteína total, albumina, sódio, fósforo e alanina aminotransferase), bioquímica urinária (creatinina, proteína e sódio). 3. Sorologia para <i>E. canis</i>, <i>B. vogeli</i> e <i>Leptospira</i> spp, e PCR para <i>E. canis</i>.
Dia 15	1. Anamnese, exame físico de rotina e mensuração da pressão arterial. 2. Hemograma, urinálise, bioquímica sérica (ureia, creatinina, proteína total, albumina e sódio), bioquímica urinária (creatinina, proteína e sódio). 3. Sorologia para <i>Leptospira</i> spp caso ficasse indicado sorologia pareada.
Dia 30	1. Anamnese, exame físico de rotina e mensuração da pressão arterial. 2. Hemograma, urinálise, bioquímica sérica (ureia, creatinina, proteína total, albumina e sódio), bioquímica urinária (creatinina, proteína e sódio).
Dia 45	1. Anamnese, exame físico de rotina e mensuração da pressão arterial. 2. Hemograma, urinálise, bioquímica sérica (ureia, creatinina, proteína total, albumina e sódio), bioquímica urinária (creatinina, proteína e sódio).
Dia 60	1. Anamnese, exame físico de rotina e mensuração da pressão arterial. 2. Hemograma, urinálise, bioquímica sérica (ureia, creatinina, proteína total, albumina e sódio), bioquímica urinária (creatinina, proteína e sódio).

4.6 Metodologia das avaliações

Avaliação clínica

Para serem considerados como candidatos a compor os grupos, os cães foram avaliados por meio de anamnese exame físico e os exames complementares que se fizeram necessários para o diagnóstico clínico preliminar. Uma vez designados, os animais eram novamente submetidos ao exame físico que incluiu a mensuração da pressão arterial sistólica, para obtenção dos dados basais. Outras quatro avaliações clínicas foram realizadas aos 15, 30, 45 e 60 dias após. A pressão arterial sistólica era aferida no mesmo período do dia, estando o cão em decúbito lateral esquerdo. Empregou-se método indireto utilizando-se aparelho ultrassônico com doppler (Microem®), e manguito (Latex Pri®) inflável aplicado ao redor do membro torácico direito entre o cotovelo e o carpo.

Considerações gerais sobre a obtenção e o preparo de amostras

Sangue

As coletas de amostras eram feitas por meio de punção da veia jugular ou cefálica, conforme a conveniência. Uma amostra de 4mL era acondicionada em frasco com ácido etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA) a 10% para a execução do hemograma. Foi obtida amostra de soro por meio de centrifugação (5 minutos a 1.800g) de um volume adicional de sangue (4 a 6mL) acondicionado em tubo sem anticoagulante, para exames bioquímicos. Alíquotas de sangue total acrescido de EDTA e de soro foram conservadas a -20°C, para os testes diagnósticos complementares (PCR, RIFI, soroaglutinação).

Urina

A coleta de urina era feita por meio de cistocentese ou de cateterização transuretral, sendo coletados 10 a 15mL para realização imediata de urinálise e dosagens bioquímicas.

Análises laboratoriais

Hemograma

As contagens globais de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, bem como a taxa de hemoglobina e hematócrito, foram obtidas com o auxílio de um contador automático². As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com mistura de Metanol, May-Gruwald e Giemsa.

Urinálise

Para os testes químicos foram utilizadas fitas reagentes³. A densidade urinária foi mensurada em refratômetro digital⁴. Para a sedimentoscopia, as amostras de urina foram centrifugadas⁵ a 1.800g durante cinco minutos, sendo o sobrenadante reservado deixando 0,5mL de urina para ressuspensão do precipitado. A lâmina foi preparada com uma gota do sedimento, entre lâmina e lamínula, e analisada em microscópio óptico⁶ sob objetivas de 10 a 40x.

Análises bioquímicas séricas e urinárias

Nas amostras de soro foram dosadas ureia (Método da Urease), creatinina (Método Jaffé modificado), albumina (Método verde de Bromocresol), proteína total (método do biureto). Nas amostras de urina foram dosadas creatinina (Método Jaffé modificado), proteína (Método do vermelho de pirogalol), ureia (Método da urease) e somente no momento basal foi dosado fósforo (Método fosfomolibdato), alanina aminotransferase (Método Reitman e Frankel). As análises bioquímicas foram feitas com os conjuntos de reagentes do sistema Labtest⁷ para diagnóstico e para as leituras empregou-se espectrofotômetro⁸ semi-automático. As dosagens das concentrações séricas e urinárias de sódio foram feitas em aparelho automático pelo método eletrodo íon-seletivo⁹.

² COULTER modelo ABC T8.

³ Combur 10 Test UX® - Boehringer Mannheim S.A. – Buenos Aires – Argentina.

⁴ Refratômetro Digital – UGI (1,000-1,050) – Atago – Tóquio – Japão.

⁵ Centrífuga Celm LS3 Plus.

⁶ Microscópio Nikon Eclipse – E 200.

⁷ LABTEST – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

⁸ LABQUEST-Labtest Diagnóstica S.A. – Lagoa Santa – MG.

⁹ Iselab - método de eletrodos íon- seletivo – DRAKE. São José do Rio Preto - SP.

Proteinúria e Excreção Fracionada de Sódio

Avaliação da proteinúria foi realizada por meio da determinação da razão proteína/creatinina da urina (UPC), a partir dos valores de concentração de creatinina e de proteína obtidos na mesma amostra de urina.

$$\text{UPC} = \frac{U_{\text{prot}} \text{ (mg/dL)}}{U_{\text{cr}} \text{ (mg/dL)}}$$

Onde:

UPC = relação proteína/creatinina urinárias

U_{prot} = concentração urinária de proteína

U_{cr} = concentração urinária de creatinina

Para os cálculos da excreção fracionada de sódio foram considerados os valores das concentrações séricas e urinárias de creatinina e sódio, por meio da fórmula que se segue.

$$\text{EF}_{\text{Na}} = \frac{U_{\text{Na}} \text{ (mEq/L)} \times S_{\text{cr}} \text{ (mg/dL)}}{U_{\text{cr}} \text{ (mg/dL)} \times S_{\text{Na}} \text{ (mEq/L)}} \times 100$$

Onde:

EFNa = excreção fracionada de sódio

U_{Na} = concentração urinária de sódio

S_{cr} = concentração sérica de creatinina

U_{cr} = concentração urinária de creatinina

S_{Na} = concentração sérica de sódio

Testes diagnósticos

Técnica de dot-ELISA para detecção de anticorpos anti- *E. canis*.

O exame dot-ELISA (Immunocomb®) para detecção de anticorpos anti- *E. canis* foi realizado conforme as especificações do fabricante Biogal, Galed Laboratories, sendo considerados positivos os animais que apresentaram titulação acima de 80.

Técnica das Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *E. canis* e *B. vogeli*.

A RIFI foi realizada conforme descrita por CAMARGO et al. (1973) e padronizada por Nakaghi (2008) e para o sistema *E. canis* e Furuta et al. (2009), para o sistema *B. canis* (*B. vogeli*), respectivamente.

Técnica de Soroaglutinação Microscópica para detecção de anticorpos contra *Leptospira* spp.

O teste de soroaglutinação microscópica (SAM) foi realizado de acordo com o descrito por RYU (1970). Foram testados os sorovares canicola, grippotyphosa, copenhagen, icterohaemorrhagiae, pomona, hardjo, wolffi e tarassovi.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Extração de DNA de sangue total

A extração de DNA do sangue total foi realizada por meio do QIAamp DNA Blood Mini Kit (cat. n° 51104, Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante.

Reação de Amplificação para *Ehrlichia* sp. baseada no gene dissulfito oxidoreductase (*dsb*).

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores dsb-330 (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3') e dsb-728 (5'-

CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3'), que amplificam um fragmento de 409 pb do gene *dsb* de *Ehrlichia* sp. (DOYLE et al., 2005).

Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Life Technologies®) a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5µl/mL) em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0).

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

O experimento seguiu delineamento em blocos casualizados. Foram apresentados resultados da análise estatística descritiva. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com dois fatores – grupo (GN, GE e GEB) e tempo (0, 15, 30, 45 e 60 dias), teste de comparação múltipla de médias (Tukey-Kramer) e estatística descritiva. Adotou-se $\alpha=0,05$. As análises estatísticas foram feitas pelo Software Statistical Analysis System (SAS) e os gráficos para ilustração dos resultados foram feitos por meio do Graphpad Prism 6.0.

5. RESULTADOS

Dentre os 30 cães avaliados (16 machos e 14 fêmeas), havia 14 sem raça definida (SRD), três Shih Tzu, dois Terrie Brasileiro e os 11 restantes somavam outras 11 raças. A variação de peso foi marcante nos três grupos – GN, 10 a 22,8kg; GE, 5,9 a 43kg e GEB, 3 a 44,8kg, relacionadas somente às características raciais, pois nenhum animal estava obeso ou excessivamente magro. Quanto à condição das gônadas, do total de 14 fêmeas, seis eram castradas, e dos 16 machos avaliados, três eram castrados (Tabela 1).

A princípio, os motivos das consultas dos animais incluíram check-up (n=10), apetite caprichoso (n=5), claudicação (n=3), castração eletiva (n=2), apatia transitória (n=2), otite externa (n=2), queda de pelo ou prurido cutâneo (n=2), nódulo cutâneo único, lipoma (n=1), prurido vulvar (n=1), vacinação (n=1) e episódio único de diarreia (n=1). Ao hemograma dos cães doentes, além da trombocitopenia, requisito obrigatório para inclusão no estudo, 4 (13%) do grupo GE e 2 (7%) do grupo GEB, apresentavam também leucopenia. À ultrassonografia abdominal dos 30 pacientes avaliados, 5 (17%) correspondentes ao total de animais do grupo GN, não apresentaram alterações. Dos 15 pacientes do grupo GE e dos 10 do grupo GEB, 12 (40%) e 9 (30%), respectivamente, apresentaram somente esplenomegalia, 3 (10%) e 1 (3%), respectivamente, apresentavam hepatoesplenomegalia (Tabela 2). Nos casos de comorbidade, os pacientes necessitaram somente de tratamento tópico para limpeza ou repouso, o que não os impossibilitava de participar do experimento. Os procedimentos cirúrgicos ou vacinações foram postergados.

Tabela. 1. Características físicas dos 30 cães avaliados distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.

Características	GRUPOS					
	GN (n=5)		GE (n=15)		GEB (n=10)	
	Machos (n=2)	Fêmeas (n=3)	Machos (n=8)	Fêmeas (n=7)	Machos (n=6)	Fêmeas (n=4)
Raças						
1. SRD	2	3	2	4	2	1
2. Lhasa Apso	0	0	0	0	1	0
3. Shih Tzu	0	0	1	1	0	1
4. Bulldog Francês	0	0	0	0	1	0
5. Teckel	0	0	1	0	0	0
6. Yorkshire	0	0	0	1	0	0
7. Labrador	0	0	1	0	0	0
8. Terrier Brasileiro	0	0	1	1	0	0
9. Pug	0	0	1	0	0	0
10. Border Collie	0	0	1	0	0	0
11. Rottweiler	0	0	0	0	1	0
12. Blue Hiller	0	0	0	0	1	0
13. Pinscher	0	0	0	0	0	1
14. Pit Bull	0	0	0	0	0	1
Idade (anos)	7 a 15 (11,5±1,3)*		1 a 10 (4,2±0,8)		1 a 10 (5,8±1,1)	
Peso corporal (kg)	10,0 a 22,8 (13,8±2,1)		5,9 a 43 (13,9±2,7)		3 a 44,8 (17,3±4,2)	
Condição das gônadas						
1. Intactas	2 (100%)	3 (100%)	5 (63%)	4 (57%)	6 (100%)	1 (25%)
2. Removidas	0	0	3 (38%)	3 (43%)	0	3 (75%)
SRD – sem raça definida; * média ± erro padrão da média						

Considerando os parâmetros hematológicos mais relevantes para o estudo (Tabela 3), exceto o número de plaquetas, os valores apresentaram-se dentro dos intervalos de referência (APÊNDICE A). Os resultados da ANOVA indicaram que apesar do coeficiente de variação ter sido pequeno para os parâmetros hemácia, hematócrito e hemoglobina (CV 10,5%, 10,26%, 10,15%, respectivamente), não houve variação significativa entre os grupos ou os tempos. No entanto, para os leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos houve influência significativa ($P \leq 0,05$), do fator grupo (Tabela 7).

As médias de plaquetas dos cães do GE e GEB na avaliação basal (respectivamente, $74,67 \times 10^{-3}/\mu\text{L}$ e $85,40 \times 10^{-3}/\mu\text{L}$) estavam abaixo dos valores de referência (180 a $400 \times 10^{-3}/\mu\text{L}$) e à ANOVA verificou-se influência significativa dos fatores grupo e tempo (Tabela 7). Ao teste de comparação múltipla de médias (Tukey-Kramer) observou-se diferença significativa entre as médias basais dos cães doentes (GE e GEB) e a do GN. Ao longo do tempo (15, 30, 45, 60 dias), as médias do GN não variaram significativamente, mas as dos cães doentes (GE e GEB), então em tratamento, aumentaram ($P \leq 0,01$) em relação ao valor basal e alcançaram o intervalo normal de referência (Tabela 8, Figura.1).

Tabela. 3. Resultado dos hemogramas (média $\pm$ erro padrão da média) de cinco avaliações (basal, 15, 30, 45, e 60 dias) de 30 cães distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.

Parâmetros (Hemograma)	Tempos	GRUPOS		
		GN (n=5)	GE (n=15)	GEB (n=10)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Basal	6,45 $\pm$ 0,32 ^{Aa*}	6,67 $\pm$ 0,22 ^{Aa}	6,16 $\pm$ 0,30 ^{Aa}
	15 dias	6,20 $\pm$ 0,19 ^{Aa}	6,28 $\pm$ 0,25 ^{Aa}	6,41 $\pm$ 0,41 ^{Aa}
	30 dias	6,38 $\pm$ 0,25 ^{Aa}	6,34 $\pm$ 0,27 ^{Aa}	6,72 $\pm$ 0,26 ^{Aa}
	45 dias	6,11 $\pm$ 0,17 ^{Aa}	6,30 $\pm$ 0,24 ^{Aa}	6,69 $\pm$ 0,22 ^{Aa}
	60 dias	5,95 $\pm$ 0,22 ^{Aa}	6,54 $\pm$ 0,25 ^{Aa}	6,04 $\pm$ 1,91 ^{Aa}
Hematócrito(%)	Basal	45,56 $\pm$ 2,10 ^{Aa}	46,76 $\pm$ 1,75 ^{Aa}	43,04 $\pm$ 1,93 ^{Aa}
	15 dias	44,14 $\pm$ 1,16 ^{Aa}	42,98 $\pm$ 1,61 ^{Aa}	44,26 $\pm$ 2,39 ^{Aa}
	30 dias	45,26 $\pm$ 1,61 ^{Aa}	44,49 $\pm$ 2,04 ^{Aa}	48,07 $\pm$ 1,54 ^{Aa}
	45 dias	43,20 $\pm$ 1,00 ^{Aa}	44,45 $\pm$ 1,64 ^{Aa}	47,81 $\pm$ 1,57 ^{Aa}
	60 dias	42,06 $\pm$ 1,55 ^{Aa}	45,43 $\pm$ 1,74 ^{Aa}	42,14 $\pm$ 13,33 ^{Aa}
Hemoglobina g/dL	Basal	15,44 $\pm$ 0,72 ^{Aa}	14,95 $\pm$ 0,63 ^{Aa}	14,37 $\pm$ 0,65 ^{Aa}
	15 dias	15,86 $\pm$ 0,51 ^{Aa}	14,91 $\pm$ 0,54 ^{Aa}	14,58 $\pm$ 0,70 ^{Aa}
	30 dias	15,72 $\pm$ 0,55 ^{Aa}	14,78 $\pm$ 0,64 ^{Aa}	16,24 $\pm$ 0,49 ^{Aa}
	45 dias	15,00 $\pm$ 0,45 ^{Aa}	14,87 $\pm$ 0,53 ^{Aa}	15,93 $\pm$ 0,62 ^{Aa}
	60 dias	15,56 $\pm$ 0,66 ^{Aa}	15,00 $\pm$ 0,58 ^{Aa}	14,29 $\pm$ 4,52 ^{Aa}
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Basal	300,6 $\pm$ 47,39 ^{Aa}	74,67 $\pm$ 8,32 ^{Ba}	85,40 $\pm$ 10,57 ^{Ba}
	15 dias	310,4 $\pm$ 54,20 ^{Aa}	227,36 $\pm$ 17,93 ^{Ab}	263,60 $\pm$ 33,30 ^{Ab}
	30 dias	308,6 $\pm$ 47,58 ^{Aa}	231,60 $\pm$ 23,37 ^{Ab}	257,20 $\pm$ 25,30 ^{Ab}
	45 dias	320,6 $\pm$ 32,01 ^{Aa}	252,00 $\pm$ 19,69 ^{Ab}	281,80 $\pm$ 43,50 ^{Ab}
	60 dias	315,8 $\pm$ 46,18 ^{Aa}	249,80 $\pm$ 17,53 ^{Ab}	240,70 $\pm$ 76,17 ^{Ab}
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Basal	8,48 $\pm$ 1,06 ^{Aa}	8,45 $\pm$ 0,76 ^{Aa}	8,20 $\pm$ 0,76 ^{Aa}
	15 dias	8,02 $\pm$ 1,00 ^{Aa}	7,33 $\pm$ 0,38 ^{Aa}	6,91 $\pm$ 0,39 ^{Aa}
	30 dias	7,10 $\pm$ 0,50 ^{Aa}	7,71 $\pm$ 0,66 ^{Aa}	7,56 $\pm$ 0,68 ^{Aa}
	45 dias	8,06 $\pm$ 0,57 ^{Aa}	9,12 $\pm$ 0,65 ^{Aa}	7,13 $\pm$ 0,60 ^{Aa}
	60 dias	7,50 $\pm$ 0,77 ^{Aa}	8,84 $\pm$ 0,66 ^{Aa}	6,84 $\pm$ 2,10 ^{Aa}
Neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Basal	6,46 $\pm$ 0,85 ^{Aa}	5,97 $\pm$ 0,59 ^{Aa}	5,61 $\pm$ 0,51 ^{Aa}
	15 dias	6,02 $\pm$ 0,83 ^{Aa}	4,90 $\pm$ 0,32 ^{Aa}	4,48 $\pm$ 0,26 ^{Aa}
	30 dias	5,29 $\pm$ 0,30 ^{Aa}	5,24 $\pm$ 0,47 ^{Aa}	5,12 $\pm$ 0,39 ^{Aa}
	45 dias	6,12 $\pm$ 0,50 ^{Aa}	6,64 $\pm$ 0,57 ^{Aa}	5,11 $\pm$ 0,46 ^{Aa}
	60 dias	5,82 $\pm$ 0,64 ^{Aa}	6,09 $\pm$ 0,53 ^{Aa}	4,82 $\pm$ 1,52 ^{Aa}
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Basal	0,91 $\pm$ 0,19 ^{Aa}	1,79 $\pm$ 0,18 ^{Aa}	1,96 $\pm$ 0,20 ^{Aa}
	15 dias	2,10 $\pm$ 0,98 ^{Aa}	1,42 $\pm$ 0,11 ^{Aa}	1,62 $\pm$ 0,20 ^{Aa}
	30 dias	0,82 $\pm$ 0,18 ^{Aa}	1,62 $\pm$ 0,21 ^{Aa}	1,77 $\pm$ 0,30 ^{Aa}
	45 dias	1,06 $\pm$ 0,21 ^{Aa}	1,50 $\pm$ 0,16 ^{Aa}	1,46 $\pm$ 0,20 ^{Aa}
	60 dias	1,08 $\pm$ 0,26 ^{Aa}	1,79 $\pm$ 0,20 ^{Aa}	1,34 $\pm$ 0,40 ^{Aa}
Monócitos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Basal	0,29 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	0,32 $\pm$ 0,06 ^{Aa}	0,20 $\pm$ 0,05 ^{Aa}
	15 dias	0,31 $\pm$ 0,06 ^{Aa}	0,23 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	0,26 $\pm$ 0,08 ^{Aa}
	30 dias	0,30 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,34 $\pm$ 0,07 ^{Aa}	0,19 $\pm$ 0,05 ^{Aa}
	45 dias	0,27 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,44 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	0,18 $\pm$ 0,06 ^{Aa}
	60 dias	0,15 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,33 $\pm$ 0,71 ^{Aa}	0,29 $\pm$ 0,09 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam variação significativa ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam variação significativa ($p < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo (Tukey-Kramer).

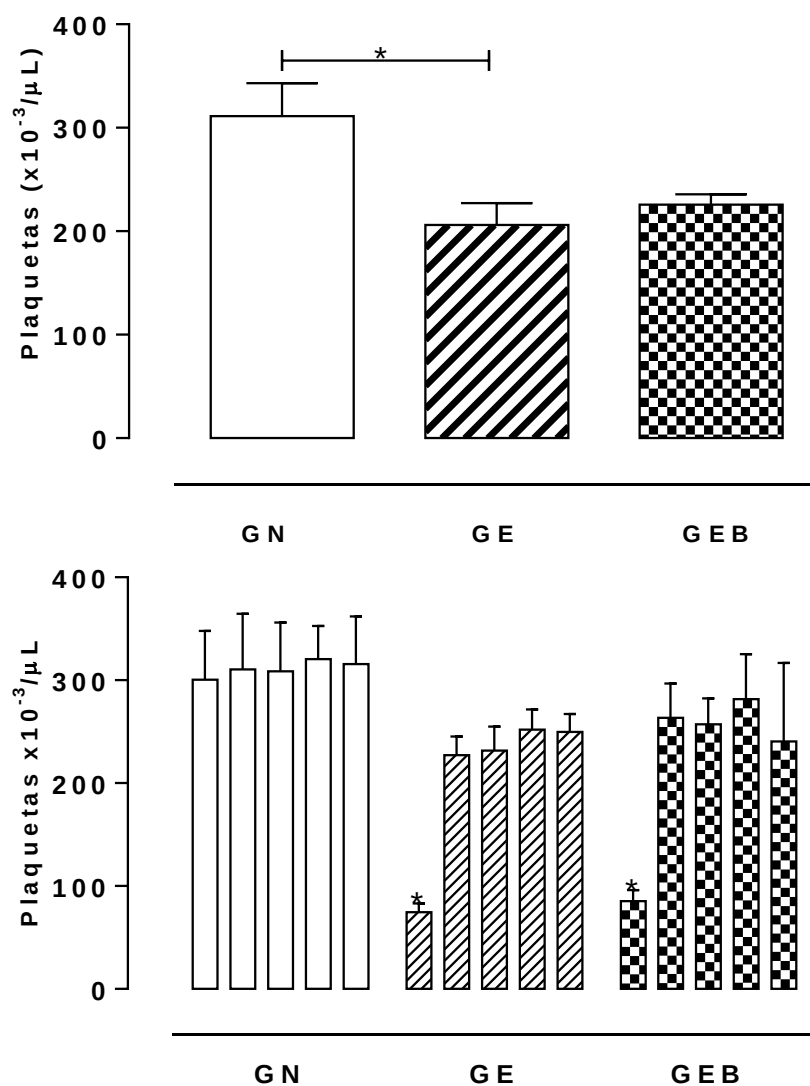


Figura 1. – Representação gráfica das médias dos números de plaquetas por grupo (superior) e por tempo em cada grupo (inferior) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.

Os testes diagnósticos para *Ehrlichia canis* revelaram que, do total de 30 amostras, 25 (83%) mostraram-se positivas ao dot-ELISA, 20 (67%) positivas à RIFI, sendo que os 5 animais positivos ao dot-ELISA que foram negativos a RIFI apresentavam título de 80 ao dot-ELISA e, 3 (10%) positivas à PCR e que a pesquisa de mórulas resultou negativa para todas as amostras (Tabela 4, Quadro 2 e Figura 2). Os resultados do teste para diagnóstico de exposição ou infecção por *Babesia vogeli* foram positivos para cães 10 (33%) e negativos para os 20 (67%) restantes. De acordo com os resultados dos testes de soroaglutinação microscópica nenhum paciente tinha infecção por *Leptospira* spp. As amostras provenientes dos cinco cães saudáveis (GN) apresentaram-se negativas em todos os exames (Tabela 4 e Quadro 2).

Tabela 4. Resultados dos testes para diagnóstico de infecção ou exposição aos agentes *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Leptospira* spp de 30 cães . Unesp – Jaboticabal, 2013.

	Total de animais avaliados		
	Machos (n=16)	Fêmeas (n=14)	Total (n=30)
<i>Ehrlichia canis</i>			
Sorologia (dot-ELISA)	14	11	25 (83,33%)
Sorologia (RIFI)	11	9	20 (66,66%)
PCR	2	1	3 (10%)*
Pesquisa de Mórulas	0	0	0 (0%)
Negativo frente à todas as provas	2	3	5 (16,66%)
<i>Babesia vogeli</i>			
Soropositivos pela (RIFI)	6	4	10 (33,33%)
Soronegativos pela (RIFI)	10	10	20 (66,66%)
<i>Leptospira</i> spp			
Soropositivos pela Soroaglutinação Microscópica	0	0	0 (0%)
Soronegativos frente a todos os testes de diagnóstico	2	3	5 (16,66%)

* Percentual em relação ao total de pacientes avaliados

Quadro. 2. Resultados positivos (P) e negativos (-) obtidos nos testes para diagnóstico de infecção ou exposição aos agentes *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Leptospira* spp de amostras de sangue total e soro de 30 cães. Unesp – Jaboticabal, 2013.

	Paciente	<i>E. canis</i>				<i>B. vogeli</i>
		dot-ELISA	RIFI	PCR	Mórula	RIFI
GN	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
GE	6	P	-	-	-	-
	7	P	P	-	-	-
	8	P	P	P	-	-
	9	P	P	-	-	-
	10	P	P	-	-	-
	11	P	P	P	-	-
	12	P	P	-	-	-
	13	P	P	-	-	-
	14	P	P	-	-	-
	15	P	P	-	-	-
	16	P	P	-	-	-
	17	P	P	P	-	-
	18	P	P	-	-	-
	19	P	P	-	-	-
	20	P	-	-	-	-
GEB	21	P	-	-	-	P
	22	P	P	-	-	P
	23	P	-	-	-	P
	24	P	P	-	-	P
	25	P	P	-	-	P
	26	P	P	-	-	P
	27	P	P	-	-	P
	28	P	P	-	-	P
	29	P	P	-	-	P
	30	P	-	-	-	P

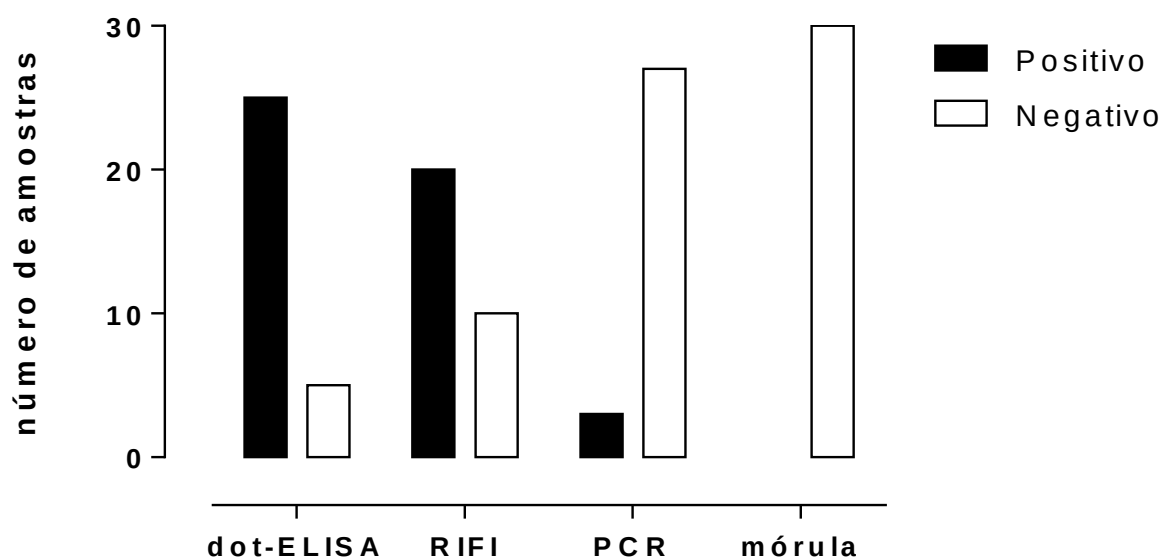


Figura 2 – Representação gráfica dos resultados dos testes para diagnóstico de infecção ou exposição ao agente *Ehrlichia canis* em amostras de sangue de 30 cães avaliados por meio de testes sorológicos (dot-ELISA e RIFI), Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e presença de mórulas em esfregaço sanguíneo de capilar periférico. Unesp – Jaboticabal, 2013.

Os resultados das avaliações séricas de creatinina, ureia, proteína total, albumina, globulina, sódio, fósforo, alanina aminotransferase e dos resultados da razão proteína/creatinina urinária, excreção fracionada de sódio e das aferições da pressão arterial, estão apresentados nas Tabelas 5 (médias basais) e 6 (médias aos 15, 30, 45, 60 dias). A ANOVA dos parâmetros revelou influência significativa dos fatores de variação (grupo ou tempo), exceto no caso do sódio (Tabela 7, Figura 4). Entretanto, o teste de comparação de média (Tukey) não confirmou os achados da análise de variância, exceto para a ureia sérica e excreção fracionada de sódio. Ao teste de comparação múltipla de médias (Tukey-Kramer), foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros ureia sérica, UPC e pressão arterial sistólica.

As médias de concentração séricas de ureia, mesmo variando dentro dos limites de normalidade (15 a 75mg/dL), apresentaram-se sempre maiores no GEB do que no GE e ambos os grupos de doentes tiveram médias maiores que a dos cães normais ao longo do tempo (Figura 3). Ao teste de Tukey, considerando o fator grupo, as médias dos doentes (GE e GEB) foram significativamente maiores do que a do GN e ao teste de comparação múltipla de médias (Tukey-Kramer) houve diferença significativa entre os grupos GN e GEB em todas as avaliações (Tabela 7 e 8).

A excreção fracionada de sódio foi influenciada significativamente ($P \leq 0,01$) pelo fator grupo (ANOVA). As médias dos grupos de cães doentes foram significativamente maiores do que a do GN ao teste Tukey (Tabela 7, Figuras 4).

A ANOVA revelou que a variação da UPC foi influenciada significativamente tanto pelo fator grupo quanto pelo fator tempo (Tabela 7). Ao teste de comparação de médias Tukey-Kramer, pode-se observar que no GE a média basal foi significativamente maior que as dos demais tempos (Tabela 8, Figura 5).

A variação da pressão arterial sistólica foi influenciada significativamente pelo fator grupo. Ao teste de comparação múltipla de médias, constatou-se que a média basal do GE foi significativamente maior que as correspondentes do GN e do GEB e do que a média do tempo 15 no mesmo grupo (Tabela 7 e 8, Figuras 6).

Tabela.5. Resultado (média $\pm$ erro padrão da média) das avaliações séricas de sódio, globulina, ureia, proteína total, creatinina, albumina, fósforo, alanina aminotransferase e dos resultados da razão proteína/creatinina urinária, excreção fracionada de sódio e das aferições da pressão arterial, no tempo zero (basal) de 30 cães distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.

Parâmetros	GRUPOS		
	GN (n=5)	GE (n=15)	GEB (n=10)
Parâmetros séricos (Basal)			
Ureia	18,74 $\pm$ 1,81	31,87 $\pm$ 3,06	44,76 $\pm$ 6,48
Creatinina	0,80 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,10
Proteína total	7,41 $\pm$ 0,36	7,22 $\pm$ 0,32	7,76 $\pm$ 0,46
Albumina	3,00 $\pm$ 0,21	2,85 $\pm$ 0,13	2,53 $\pm$ 0,10
Globulina	4,41 $\pm$ 0,39	3,84 $\pm$ 0,28	4,23 $\pm$ 0,34
Fósforo	4,59 $\pm$ 0,69	4,33 $\pm$ 0,33	4,83 $\pm$ 0,36
Sódio	142,80 $\pm$ 1,16	139,13 $\pm$ 1,02	137,8 $\pm$ 1,21
Alanina aminotransferase	65,70 $\pm$ 15,48	78,75 $\pm$ 23,83	56,45 $\pm$ 10,80
Razão proteína/creatinina urinária	0,25 $\pm$ 0,06	0,52 $\pm$ 0,19	0,38 $\pm$ 0,09
Excreção fracionada de sódio	0,27 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,06
Pressão arterial sistólica	125,40 $\pm$ 1,64	154,07 $\pm$ 5,05	130,20 $\pm$ 6,48

Tabela. 6. Resultado (média $\pm$ erro padrão da média) das avaliações séricas de sódio, globulina, ureia, proteína total, creatinina, albumina, fósforo, alanina aminotransferase e dos resultados da razão proteína/creatinina urinária, excreção fracionada de sódio e das aferições da pressão arterial, nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias, de 30 cães distribuídos em três grupos – cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB). Unesp – Jaboticabal, 2013.

Parâmetros	GRUPOS		
	GN (n=5)	GE (n=15)	GEB (n=10)
Parâmetros séricos (15 dias)			
Ureia	22,70 $\pm$ 3,44	34,12 $\pm$ 4,76	41,98 $\pm$ 3,49
Creatinina	0,76 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,08
Proteína total	7,74 $\pm$ 0,19	6,90 $\pm$ 0,32	7,31 $\pm$ 0,36
Albumina	2,78 $\pm$ 0,13	3,03 $\pm$ 0,23	2,89 $\pm$ 0,19
Globulina	4,96 $\pm$ 0,10	4,36 $\pm$ 0,36	4,49 $\pm$ 0,31
Sódio	140,20 $\pm$ 0,58	139,12 $\pm$ 2,12	139,1 $\pm$ 3,3
Razão proteína/creatinina urinária	0,27 $\pm$ 0,13	0,32 $\pm$ 0,13	0,27 $\pm$ 0,08
Excreção fracionada de sódio	0,25 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,08	0,48 $\pm$ 0,05
Pressão arterial sistólica	131,00 $\pm$ 6,02	135,13 $\pm$ 4,46	136,60 $\pm$ 6,67
Parâmetros séricos (30 dias)			
Ureia	17,76 $\pm$ 2,76	35,92 $\pm$ 3,82	41,35 $\pm$ 3,99
Creatinina	0,79 $\pm$ 0,08	1,07 $\pm$ 0,07	1,07 $\pm$ 0,06
Proteína total	7,42 $\pm$ 0,17	7,21 $\pm$ 0,41	7,37 $\pm$ 0,31
Albumina	2,40 $\pm$ 0,12	2,87 $\pm$ 0,16	2,64 $\pm$ 0,24
Globulina	5,01 $\pm$ 0,11	3,88 $\pm$ 0,44	5,14 $\pm$ 0,44
Sódio	141,00 $\pm$ 0,32	139,33 $\pm$ 1,55	137,6 $\pm$ 1,45
Razão proteína/creatinina urinária	0,23 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,09	0,21 $\pm$ 0,08
Excreção fracionada de sódio	0,23 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,06
Pressão arterial sistólica	132,40 $\pm$ 5,83	139,93 $\pm$ 4,40	138,20 $\pm$ 5,25
Parâmetros séricos (45 dias)			
Ureia	15,16 $\pm$ 2,29	34,44 $\pm$ 2,95	37,75 $\pm$ 3,42
Creatinina	1,03 $\pm$ 0,11	1,05 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,12
Proteína total	7,49 $\pm$ 0,21	7,27 $\pm$ 0,31	7,06 $\pm$ 0,35
Albumina	3,25 $\pm$ 0,22	3,08 $\pm$ 0,12	2,80 $\pm$ 0,08
Globulina	4,25 $\pm$ 0,35	4,33 $\pm$ 0,51	4,77 $\pm$ 0,62
Sódio	139,60 $\pm$ 0,25	137,53 $\pm$ 1,97	139 $\pm$ 2
Razão proteína/creatinina urinária	0,25 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,07
Excreção fracionada de sódio	0,30 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,08	0,57 $\pm$ 0,09
Pressão arterial sistólica	133,20 $\pm$ 3,78	141,40 $\pm$ 4,81	138,40 $\pm$ 5,63
Parâmetros séricos (60 dias)			
Ureia	26,26 $\pm$ 5,92	36,78 $\pm$ 2,29	36,50 $\pm$ 3,66
Creatinina	1,14 $\pm$ 0,10	1,10 $\pm$ 0,07	1,07 $\pm$ 0,06
Proteína total	7,38 $\pm$ 0,31	7,03 $\pm$ 0,36	7,42 $\pm$ 0,30
Albumina	2,63 $\pm$ 0,22	3,21 $\pm$ 0,15	2,91 $\pm$ 0,13
Globulina	4,75 $\pm$ 0,16	4,19 $\pm$ 0,35	4,73 $\pm$ 0,35
Sódio	141,4 $\pm$ 0,51	138,6 $\pm$ 1,37	136,3 $\pm$ 1,7
Razão proteína/creatinina urinária	0,29 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,09	0,19 $\pm$ 0,07
Excreção fracionada de sódio	0,24 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,07
Pressão arterial sistólica	141,00 $\pm$ 4,72	137,20 $\pm$ 4,36	139,90 $\pm$ 4,29

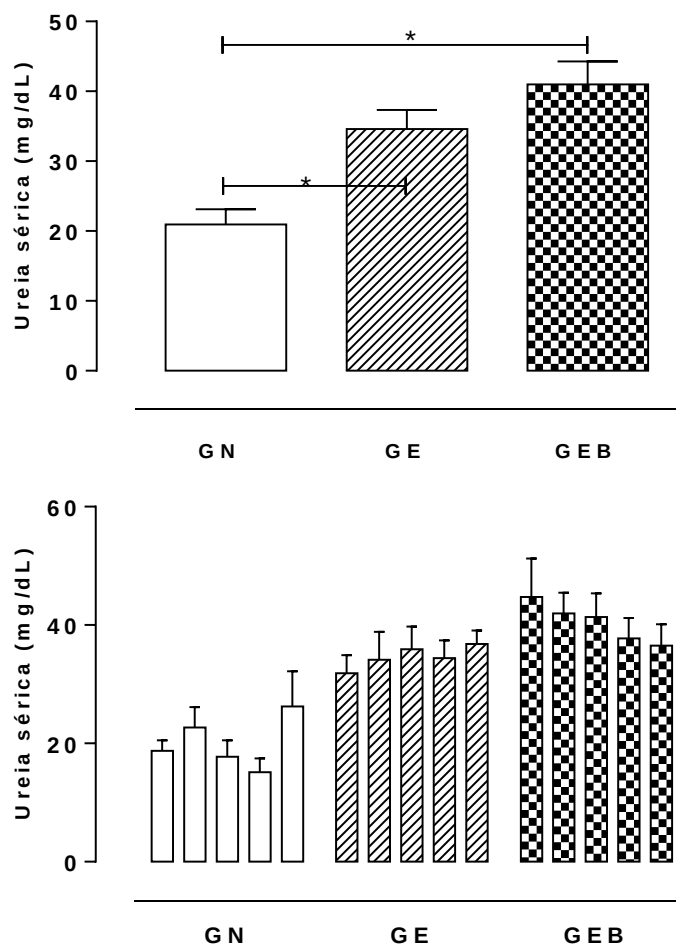


Figura 3. Representação gráfica das médias dos valores séricos de ureia por grupo (superior) e por tempo em cada grupo (inferior) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.

Tabela 7. Resultados da análise de variância para todos os parâmetros avaliados nos cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB), levando em consideração o fator grupo, fator tempo e a interação grupo vs tempo. Unesp – Jaboticabal, 2013

PARAMETROS	C.V	F para grupos	F para tempo	F para interação
Proteína total sérica	9,68%	4,04*	0,3 ^{NS}	0,92 ^{NS}
Albumina sérica	16,42%	4,92*	2,47*	1,21 ^{NS}
Globulina sérica	25,15%	4,62*	0,81 ^{NS}	0,68 ^{NS}
Ureia sérica	35,94%	21,87**	0,38 ^{NS}	0,72 ^{NS}
Creatinina sérica	18,70%	8,29*	2,70*	1,59 ^{NS}
Sódio sérico	3,02%	1,43 ^{NS}	0,78 ^{NS}	0,56 ^{NS}
UPC	49,73%	4,52*	4,9*	2,33*
EFNa	49,62%	16,52**	0,80 ^{NS}	0,65 ^{NS}
Plaquetas	24,58%	32,69**	21,70**	3,53*
Hemácias	10,50%	0,94 ^{NS}	0,77 ^{NS}	1,48 ^{NS}
Hematócritos	10,26%	0,42 ^{NS}	1,47 ^{NS}	1,97 ^{NS}
Hemoglobinas	10,15%	1,63 ^{NS}	0,78 ^{NS}	1,54 ^{NS}
Leucócitos	19,24%	6,7*	1,66 ^{NS}	1,34 ^{NS}
Neutrófilos segmentados	22,79%	7,07*	2,23 ^{NS}	0,91 ^{NS}
Linfócitos	42,05%	4,59*	1,3 ^{NS}	2,37*
Monócitos	66,73%	4,81*	0,15 ^{NS}	1,4 ^{NS}
Pressão arterial sistólica	10,08%	4,39*	0,4 ^{NS}	2,5*
Densidade urinária	0,87%	11,38**	1,05 ^{NS}	0,77 ^{NS}

UPC – razão proteína/creatinina urinária. EFNa – excreção fracionada de sódio. C.V. – coeficiente de variação. *P≤0,05. ** P≤0,01. ^{NS} não significativo

Tabela 8. Número de plaquetas (média $\pm$ erro padrão da média e dados da análise estatística) de cães normais (GN), cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB), avaliados em cinco tempos. Unesp – Jaboticabal, 2013

Parâmetros	Tempos	GRUPOS		
		GN (n=5)	GE (n=15)	GEB (n=10)
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Basal	300,6 $\pm$ 47,39 ^{Aa}	74,67 $\pm$ 8,32 ^{Ba}	85,40 $\pm$ 10,57 ^{Ba}
	15 dias	310,4 $\pm$ 54,20 ^{Aa}	227,36 $\pm$ 17,93 ^{Ab}	263,60 $\pm$ 33,30 ^{Ab}
	30 dias	308,6 $\pm$ 47,58 ^{Aa}	231,60 $\pm$ 23,37 ^{Ab}	257,20 $\pm$ 25,30 ^{Ab}
	45 dias	320,6 $\pm$ 32,01 ^{Aa}	252,00 $\pm$ 19,69 ^{Ab}	281,80 $\pm$ 43,50 ^{Ab}
	60 dias	315,8 $\pm$ 46,18 ^{Aa}	249,80 $\pm$ 17,53 ^{Ab}	240,70 $\pm$ 76,17 ^{Ab}
Ureia sérica (mg/dL)	Basal	18,74 $\pm$ 1,81 ^{Aa}	31,87 $\pm$ 3,06 ^{ABa}	44,76 $\pm$ 6,48 ^{Ba}
	15 dias	22,70 $\pm$ 3,44 ^{Aa}	34,12 $\pm$ 4,76 ^{ABa}	41,98 $\pm$ 3,49 ^{Ba}
	30 dias	17,76 $\pm$ 2,76 ^{Aa}	35,92 $\pm$ 3,82 ^{ABa}	41,35 $\pm$ 3,99 ^{Ba}
	45 dias	15,16 $\pm$ 2,29 ^{Aa}	34,44 $\pm$ 2,95 ^{ABa}	37,75 $\pm$ 3,42 ^{Ba}
	60 dias	26,26 $\pm$ 5,92 ^{Aa}	36,78 $\pm$ 2,29 ^{ABa}	36,50 $\pm$ 3,66 ^{Ba}
PAS (mm/Hg)	Basal	125,40 $\pm$ 1,64 ^{Aa}	154,07 $\pm$ 5,05 ^{Ba}	130,20 $\pm$ 6,48 ^{Aa}
	15 dias	131,00 $\pm$ 6,02 ^{Aa}	135,13 $\pm$ 4,46 ^{Ab}	136,60 $\pm$ 6,67 ^{Aa}
	30 dias	132,40 $\pm$ 5,83 ^{Aa}	139,93 $\pm$ 4,40 ^{Aa}	138,20 $\pm$ 5,25 ^{Aa}
	45 dias	133,20 $\pm$ 3,78 ^{Aa}	141,40 $\pm$ 4,81 ^{Aa}	138,40 $\pm$ 5,63 ^{Aa}
	60 dias	141,00 $\pm$ 4,72 ^{Aa}	137,20 $\pm$ 4,36 ^{Aa}	139,90 $\pm$ 4,29 ^{Aa}
UPC	Basal	0,25 $\pm$ 0,06 ^{Aa}	0,52 $\pm$ 0,19 ^{Ba}	0,38 $\pm$ 0,09 ^{Aa}
	15 dias	0,52 $\pm$ 0,13 ^{Aa}	0,32 $\pm$ 0,13 ^{Ab}	0,27 $\pm$ 0,08 ^{Aa}
	30 dias	0,23 $\pm$ 0,06 ^{Aa}	0,29 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	0,21 $\pm$ 0,08 ^{Aa}
	45 dias	0,25 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	0,28 $\pm$ 0,10 ^{Ab}	0,19 $\pm$ 0,07 ^{Aa}
	60 dias	0,29 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	0,31 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	0,19 $\pm$ 0,07 ^{Aa}
EFNa (%)	Basal	0,27 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	0,47 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,40 $\pm$ 0,06 ^{Aa}
	15 dias	0,25 $\pm$ 0,06 ^{Aa}	0,60 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	0,48 $\pm$ 0,05 ^{Aa}
	30 dias	0,23 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	0,67 $\pm$ 0,10 ^{Aa}	0,43 $\pm$ 0,06 ^{Aa}
	45 dias	0,30 $\pm$ 0,07 ^{Aa}	0,58 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	0,57 $\pm$ 0,09 ^{Aa}
	60 dias	0,24 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,63 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	0,62 $\pm$ 0,07 ^{Aa}

PAS – pressão arterial sistólica; UPC – razão proteína/creatinina urinária; EFNa – excreção fracionada de sódio. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam variação significativa ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam variação significativa ($p < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo (Tukey-Kramer).

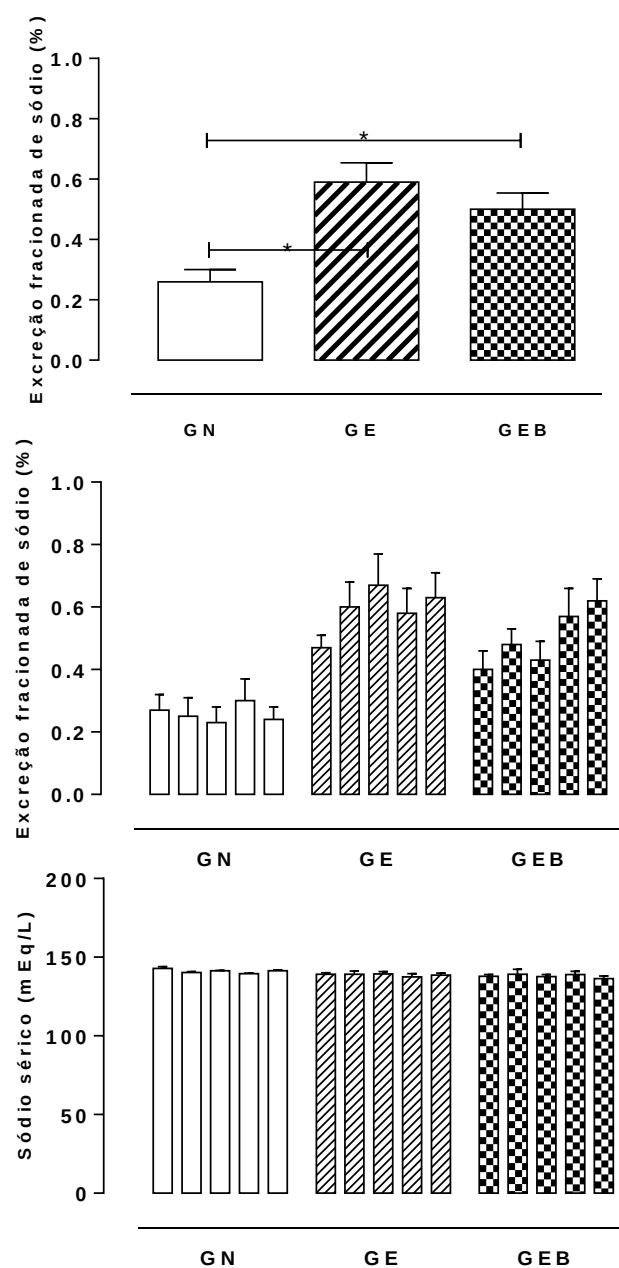


Figura 4 – Representação gráfica das médias da excreção fracionada de sódio por grupo (superior) e por tempo em cada grupo (intermediário) e sódio (inferior) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. O asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.

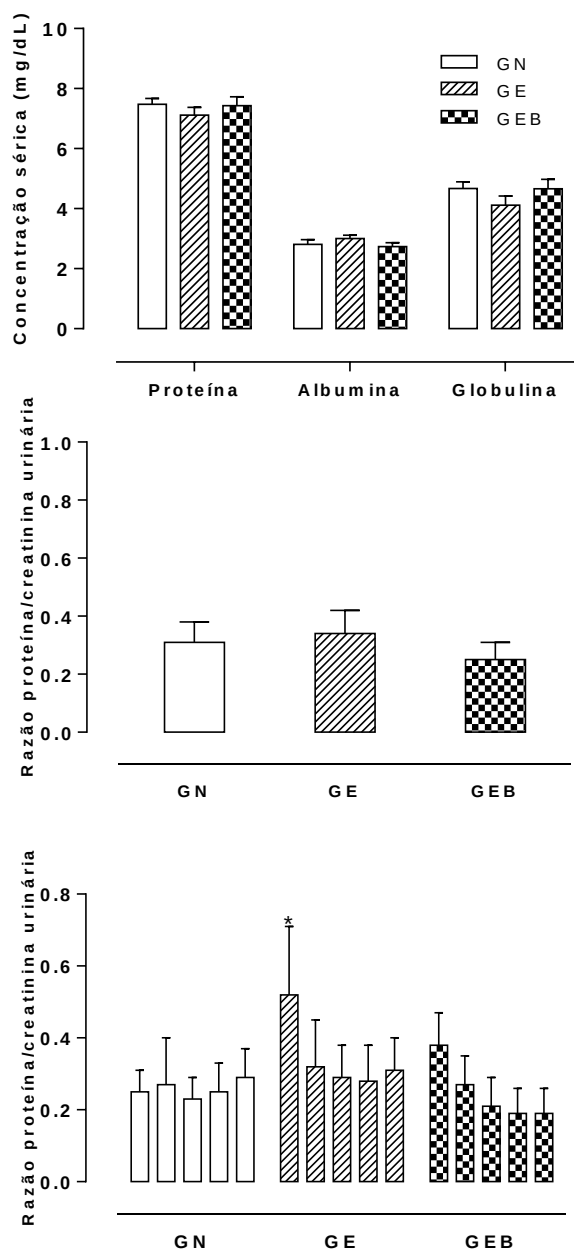


Figura 5 – Representação gráfica das médias dos valores séricos de proteína, albumina e globulina por grupo (superior) e da razão proteína/creatinina urinária por grupo e tempo em cada grupo (intermediário e inferior, respectivamente) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.

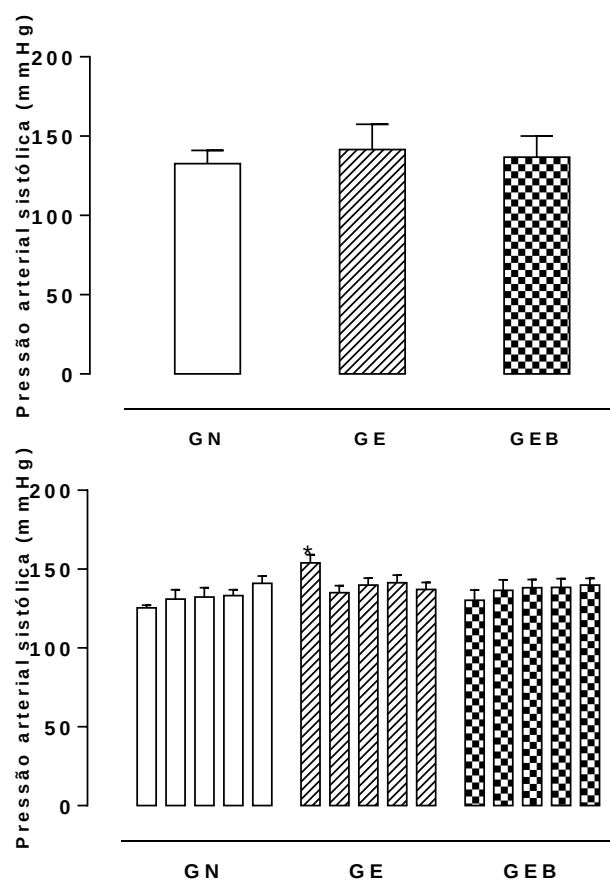


Figura 6. – Representação gráfica das médias dos valores de pressão por grupo (superior) e por tempo em cada grupo (inferior) de cães normais (GN; n=5), cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10), avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.

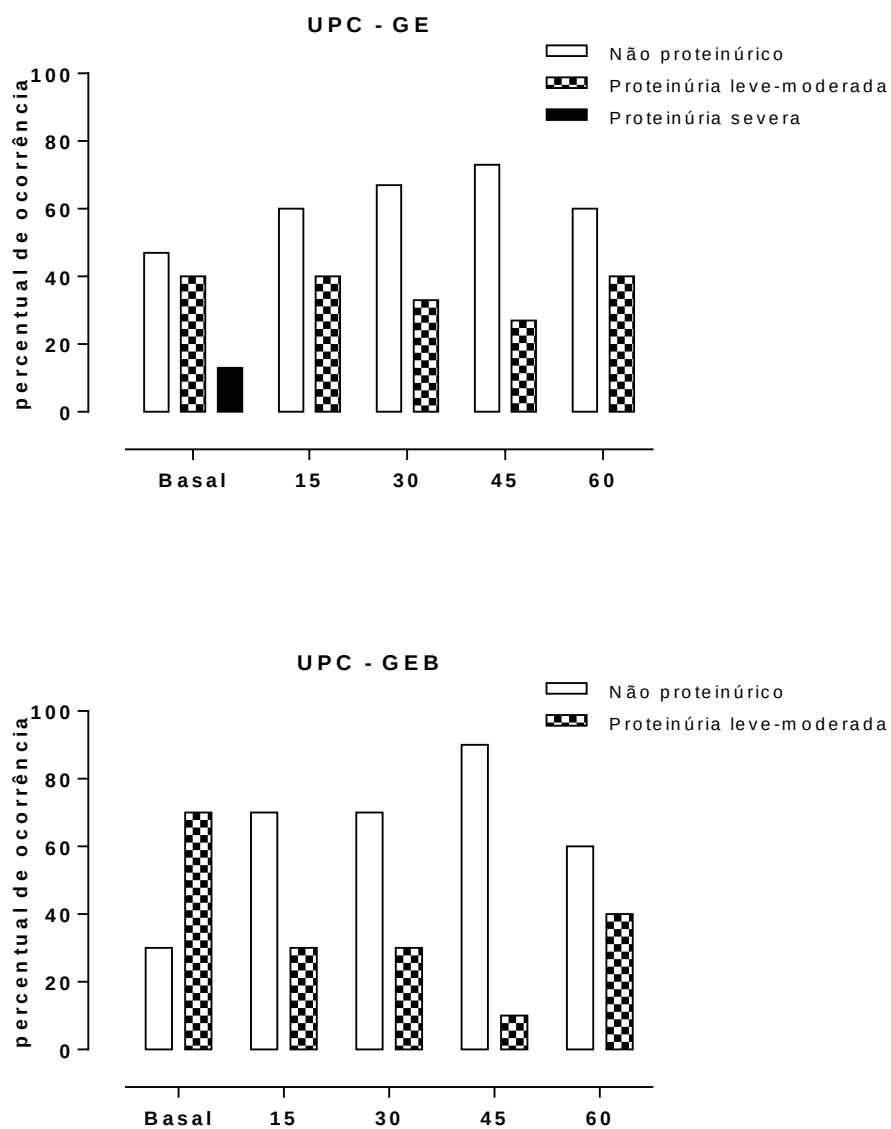


Figura 7 – Representação gráfica das médias da razão proteína/creatinina urinária, do grupo de animais doentes, cães com erliquiose subclínica (GE; n=15) acima e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB; n=10) abaixo, avaliados nos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. SNUV – Unesp – Jaboticabal, 2013.

Os resultados das urinálises dos três grupos nos cinco tempos foram semelhantes entre si. Os valores de densidade variaram entre 1,012>1,035 (concentração moderada) e $\geq 1,035$ (concentração acentuada) representadas na Tabela 9. À avaliação microscópica encontrou-se sedimento inativo na maioria das amostras. Foi encontrada cilindrúria intermitente em dois cães do GN, três do GE e cinco do GEB. Tratavam-se de cilindros granulosos em quantidade < 1 por campo (raros) em urina concentrada. Entretanto, a excreção urinária de proteína, estimada pela UPC, revelou tanto amostras não proteinúricas quanto proteinúricas de intensidade leve, moderada ou severa nos grupos de cães doentes (Tabela 9, Figura 7).

Tabela 9. Classificação dos resultados da excreção urinária de proteína, estimada pela razão proteína/creatinina urinária e densidade da urina de 25 cães, apresentada como número de animais e percentual em relação ao total do grupo. Cães com erliquiose subclínica (GE) e cães com erliquiose e babesiose subclínicas (GEB), nos tempos: basal e 15, 30, 45 e 60 dias de avaliação. Os pacientes foram tratados⁽¹⁾ durante os 30 dias iniciais. Unesp – Jaboticabal, 2013.

	GE (n=15)					GEB (n=10)				
	Basal	15	30	45	60	Basal	15	30	45	60
Razão proteína/creatinina urinária ²										
não proteinúrico ($\leq 0,2$)	7(47%)	9(60%)	10(67%)	11(73%)	9(60%)	3(30%)	7(70%)	7(70%)	9(90%)	6(60%)
proteinúria leve ($0,2 > 0,5$)	5(33%)	4(27%)	2(13%)	3(20%)	5(33%)	6(60%)	1(10%)	2(20%)	-	3(30%)
proteinúria moderada ($0,5 \geq 2,0$)	1(7%)	2(13%)	3(20%)	1(7%)	1(7%)	1(10%)	2(20%)	1(10%)	1(10%)	1(10%)
proteinúria severa ($> 2,0$)	2(13%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total de pacientes com proteinúria	8 (53%)	6(40%)	5(33%)	4(27%)	6(40%)	7(70%)	3(30%)	3(30%)	1(10%)	4(40%)
Densidade urinária										
hipostenúria ($< 1,008$)	0	0	0	0	1(7%)	0	0	0	0	0
isostenúria ($1,008 \geq 1,012$)	0	0	0	1(7%)	0	0	0	0	0	0
*c. moderada ($1,012 > 1,035$)	6(40%)	1(6,66%)	7(46,66%)	7(47%)	5(33%)	3(30%)	0	1(10%)	3(30%)	3(30%)
c. acentuada ($\geq 1,035$)	9(60%)	5(33,33%)	8(53,33%)	7(47%)	9(60%)	7(70%)	10(100%)	9(90%)	7(70%)	7(70%)

¹ Dipropionato de Imidocarb e doxiciclina em dosagem terapêutica

² Classificação proposta pela international renal interest society (IRIS, 2006).

6. DISCUSSÃO

Existe unanimidade nos relatos de que machos e fêmeas são acometidos igualmente pela *Ehrlichia canis* (ISOLA et al., 2012; BANETH et al., 1996; HARRUS et al., 1997). No presente estudo, dos 25 cães com erliquiose, constataram-se valores próximos de machos (14) e de fêmeas (11).

Não há relação da infecção pela *Ehrlichia canis* com raça ou faixa etária (BANETH et al., 1996; ISOLA et al. 2012). Entretanto, há relato de que cães da raça pastor alemão têm maior predisposição à infecção (NYINDO, et al., 1980) e sensibilidade quando já infectados (HARRUS et al., 1997). No experimento houve grande variação de raças entre os animais doentes (n=25). Houve predominância de cães sem raça definida (n=9), correspondendo a 36%. Tipicamente, os cães SRD atendidos no local onde o estudo foi desenvolvido, predominam em todas as áreas de especialidade clínica ou cirúrgica. Quanto à idade, os pacientes tinham entre 1 a 10 anos com média de 4,2 e 5,8 anos para o GE e GEB, respectivamente.

Dos fatores que motivaram a consulta constatou-se, que a maioria dos animais (n=10), foi levada para check-up (33%). Em um estudo retrospectivo com 410 cães positivos à RIFI, 68 eram positivos para infecção por *E. canis*, mas não apresentavam sinais clínicos e foram levados ao veterinário para check-up ou vacinação (BANETH et al., 1996).

O segundo motivo de consulta mais observado foi apetite caprichoso associado ou não com emaciação (n=5), correspondendo a 17% dos pacientes. Frank e Breitschwerdt (1999) relatam que em 62 cães, positivos à RIFI para infecção por *E. canis*, 21 (34%) e 15 (24%), apresentavam, dentre os sinais clínicos mais comuns, alteração de apetite e perda de peso, respectivamente.

Quanto aos achados da ultrassonografia abdominal dos pacientes infectados, constatou-se que dos 15 pacientes do grupo GE e dos 10 do grupo GEB, 12 e 9, respectivamente, apresentaram somente esplenomegalia. Hepatoesplenomegalia ocorreu em apenas em três cães do GE e em um cão do GEB, embora haja evidências de predominância de acometimento hepático na infecção babesial (WELZL et al., 2001).

Dentre os inúmeros achados que caracterizam a fase aguda da erliquiose, descreve-se a hepatoesplenomegalia (WANER et al., 1999; HARRUS, NEER, 2006). As alterações de baço e fígado podem ser caracterizadas, em cães naturalmente infectados, pela infiltração extensa de plasmócitos no parênquima destes e diversos outros órgãos (HILDEBRANDT et al., 1973). Em experimento com infecção experimental, Castro et al. (2004) sugerem que o quadro de vasculite imunomediada pode desempenhar papel central na patogênese da erliquiose monocítica canina e no desenvolvimento das lesões encontradas nos diversos tecidos e órgãos. Animais que passam da fase aguda para a subclínica permanecem infectados (HARRUS et al., 1998), o que poderia justificar a persistência dos aumentos de baço e fígado encontrados nos pacientes do presente estudo.

No presente estudo, consideramos como padrão ouro para o diagnóstico de erliquiose o teste dot-ELISA positivo combinado com trombocitopenia e histórico de infestação por carrapato. Segundo Nakaghi et al, (2008); Harrus e Waner (2011), dentre os testes sorológicos, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tem sido considerada a mais aceita e amplamente usada para o diagnóstico da infecção/exposição por *Ehrlichia* spp. Entretanto, Harrus e Waner (2011) relatam que em estudo comparando de técnicas sorológicas, houve maior positividade dos resultados ao dot-ELISA (*kit* Immunocomb²) em relação à RIFI. Concluíram que a maior positividade está relacionada à maior especificidade e sensibilidade do dot-ELISA. A contagem de plaquetas é uma ferramenta importante (BULLA et al., 2004) e quando considerada juntamente com teste sorológico, durante a triagem, constitui protocolo diagnóstico apropriado (HARRUS et al, 2011).

Dos 25 cães dados como infectados por *E. canis*, obtiveram-se 20 (80%) amostras positivas pela RIFI e somente três (12%) positivas pela PCR a partir de sangue total. O número reduzido de resultados positivos pela PCR se deve, provavelmente, à ocorrência de falso-negativos. Nas fases subclínica e crônica o agente pode não estar mais presente no sangue periférico e os resultados negativos devem ser interpretados sempre com muita cautela (HARRUS et al., 2004). Existe mais chance de detecção do DNA erliquial em amostras de sangue esplênico. Assim, a PCR de sangue do órgão fica indicada quando a amostra de sangue periférico apresentar resultados negativos (HARRUS et al., 2004, FARIA et al 2010).

No entanto, na rotina e em estudos clínicos, como no caso presente, a busca por diagnóstico etiológico pode não ser prioridade em virtude das desvantagens de custo e risco para o paciente.

Quanto ao diagnóstico por exame de esfregaços de sangue, Woody e Hoskins, (2008) encontraram somente 4% de casos positivos para a detecção de mórulas de *E. canis*. Contudo, segundo Harrus e Waner (2011), a avaliação de 1000 campos de imersão (x1000) em esfregaços de sangue, pode aumentar a sensibilidade do teste para 66%. Por outro lado, as mórulas são encontradas por um curto período de tempo na circulação, não sendo mais observada durante as fases subclínica e crônica (NAKAGHI et al., 2008). No presente estudo, a pesquisa de mórula foi adotada como teste diagnóstico preliminar com o intuito de excluir os casos positivos sugestivos de fase aguda, antes que outros procedimentos onerosos fossem conduzidos, mas todos os resultados foram negativos.

Como já é conhecido, animais adultos infectados por *Babesia vogeli* são frequentemente assintomáticos e com parasitemia baixa, o que dificulta o diagnóstico ao exame de rotina, incluindo avaliação de esfregaço sanguíneo (IRWIN; HUTCHINSON, 1991). Entretanto, a espécie de carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, que é o vetor natural da *Ehrlichia canis*, também transmite a *Babesia vogeli*, agentes etiológicos da erliquiose e babesiose, respectivamente, no Brasil (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Assim, no protocolo experimental foi incluída prova sorológica para diagnóstico de babesiose (RIFI para o sistema *B. vogeli*). Dos 25 cães infectados por *Ehrlichia canis*, no presente estudo, 10 (40%) apresentaram-se coinfectados por *Babesia vogeli*, de acordo com os resultados da prova sorológica. O achado reflete a realidade da rotina clínica da região de onde provieram os cães avaliados e, assim, os pacientes com infecção mista foram incluídos no estudo para compor o grupo de cães com infecção mista (GEB).

Sabe-se que a presença de leucopenia revelada ao hemograma é um achado marcante nos animais infectados pela *E. canis* nas fases aguda e crônica e a anemia faz parte da erliquiose crônica (HARRUS; WANNER, 2011) e também dos quadros agudas de babesiose (IRWIN; HUTCHINSON, 1991). No presente estudo, foram encontrados valores normais de hemácias, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos, o que reforça o diagnóstico de subclínica.

A única alteração encontrada ao hemograma foi a trombocitopenia no momento basal (dia zero), nas amostras dos cães doentes GE e GEB. Trombocitopenia moderada a severa é um achado hematológico importante, na fase aguda da erliquiose monocítica canina e vem acompanhado de redução moderada da contagem de leucócitos. Entretanto, na fase subclínica trombocitopenia moderada é o único achado hematológico observado (HARRUS; WANNER, 2011).

A trombocitopenia também pode fazer parte do quadro hematológico de cães infectados por *Babesia vogeli* (PETER, 2010). Em estudo conduzido por Defauw et al. (2012), todos os animais positivos para *Babesia rossi* apresentaram trombocitopenia moderada ou severa. No entanto, os animais avaliados foram testados para coinfeção por *E. canis*, somente pelo uso da PCR, o que não descarta a possibilidade da presença de animais com erliquiose em fase subclínica, já que na maioria dos casos, estes são negativos a PCR e muitas das vezes diagnosticados somente por meio de testes sorológicos.

A trombocitopenia apresentada por cães com *E. canis*, tem sido atribuída à mecanismos severos que se apresentam individualmente ou em conjunto, os quais incluem o aumento do consumo de plaquetas ou sequestro (WOODY; HOSKINS, 1991). Já se sabe que um componente imunomediado está envolvido no processo (WANER et al., 1995). No presente estudo, os cães doentes foram tratados a partir da avaliação basal. Esta intervenção foi associada com aumento dos números de plaquetas já aos 15 dias quando os valores atingiram a normalidade para a espécie ($180-400 \times 10^3/\mu\text{L}$), indicando resposta positiva ao tratamento.

Apesar da hipergamaglobulinemia observada em estudo experimental com cães da raça beagle em fase subclínica (WANNER et al, 1997), esta não foi evidenciada no presente estudo e, raros foram os momentos em que o valor de globulina estava pouco acima do intervalo de referência para espécie (2,7 – 4,4 g/L), tanto no grupo de animais normais e doentes.

Os dados disponíveis sobre comprometimento renal em cães com erliquiose ou babesiose ainda são insuficientes para aprofundar o conhecimento a cerca da etiopatogenia do processo. Em dois estudos retrospectivos com cães naturalmente infectados por *E. canis*, foi observada elevação sérica de ureia em (35%) e (21%) dos animais amostrados, respectivamente (HARRUS et al., 1997; FRANK et

al.,1999). O fato pode ter associação a um quadro de glomerulopatia. Codner et al. (1992), em estudo experimental utilizando microscopia de óptica, imunohistoquímica e microscopia eletrônica, relata que alguns animais infectados pela *E. canis* podem desenvolver glomerulopatia relacionada à deposição de imunocomplexos. A evolução do quadro pode predispor os animais acometidos a insuficiência renal crônica e proteinúria (FRANK et al., 1999). Em cães com infecção experimental por *E. canis* Dentre outras alterações que foram atribuídas à patogenia da EMC, Castro et al. (2004) constataram infiltrado de células inflamatórias evidente nos rins. Defauw et al. (2012), que avaliaram cães infectados naturalmente por *Babesia rossi*, espécie mais patogênica que a *B. vogeli*, diagnosticaram alteração glomerular e tubular por meio de avaliação de marcadores urinários.

Os dados do presente estudo evidenciam que a EMC, com ou sem coinfeção por *B. vogeli*, está associada com alteração funcional glomerular. Além de proteinúria (UPC>0,2) em 53% dos pacientes do GE e 70% dos pacientes do GEB. Acredita-se que tenha havido diminuição da carga de sódio filtrado e aumento da pressão arterial nos cães do GE. A EFNa manteve-se dentro dos limites normais de variação (até 1%), como esperado em animais em jejum com função tubular normal (FINCO, 1995; LEFEBVRE et al., 2008), mas houve variação entre os grupos pois as médias dos cães doentes (GE e GEB) foram significativamente maiores do que a dos cães saudáveis.

O aumento da EFNa ocorre como mecanismo de compensação para a diminuição da carga filtrada de sódio e consequente manutenção da homeostase. Segundo Martínez e Carvalho (2010), os mecanismos compensatórios renais observados na doença renal crônica são suficientes para manter a homeostase de sódio e outros íons pelo menos durante os estágios iniciais. A avaliação da excreção renal de sódio pode evidenciar déficit da função renal mesmo nos estágios iniciais da doença renal crônica. No presente estudo, as concentrações séricas de sódio permaneceram dentro dos valores de referência ao longo dos 60 dias de avaliação, para os três grupos de animais e não houve diferença estatística entre saudáveis e doentes, evidenciando que a homeostase de sódio estava sendo mantida pela excreção apropriada do íon. Este conjunto de achados sugere que em virtude de lesão glomerular decorrente da erliquiose e babesiose houve diminuição da taxa de

filtração glomerular com consequente aumento da filtração de proteína, aumento da pressão arterial (GE- valor basal) e diminuição da carga filtrada de sódio. O aumento da pressão arterial pode estar relacionado com retenção de sódio. As diminuições da excreção urinária de proteína e da pressão arterial relacionadas ao tratamento das doenças confirmam as hipóteses firmadas.

Outro achado a ser considerado refere-se à concentração sérica de ureia que foi significativamente maior nos cães doentes (GE e GEB). Embora dentro do intervalo de referência para a espécie, os valores mais altos de ureia em amostras coletadas após jejum, neste caso, podem refletir tanto aumento das taxa de metabolismo proteico como diminuição leve da taxa de filtração glomerular dos cães com doentes. A última hipótese pode ser considerada em conjunto com os achados de proteinúria, excreção fracionada de sódio e pressão arterial, a favor da existência de lesão glomerular.

No presente estudo não foram realizados exames histopatológicos, contudo, os achados das avaliações funcionais sugerem fortemente que cães com EMC subclínica, com ou sem coinfeção por *Babesia vogeli*, apresentam glomerulopatia de curso insidioso. Assim, pode ser sugerido que em áreas endêmicas para estas doenças, as avaliações de rotina incluam contagem de plaquetas e teste sorológico rápido para diagnóstico de erliquiose para cães com histórico de parasitismo por carrapatos. Intervenções precoces poderão prevenir os casos, tão comuns em nosso meio, de erliquiose crônica diagnosticada somente quando a insuficiência renal crônica se manifesta.

7. CONCLUSÕES

- A PCR a partir de sangue periférico não é o melhor teste diagnóstico para animais com EMC em fase subclínica.
- A normalização do número de plaquetas de animais com EMC em fase subclínica, após intervenção terapêutica, confirma a eficácia dos testes sorológicos e da presença de trombocitopenia como uma boa triagem diagnóstica no primeiro momento de avaliação.
- Os parâmetros, densidade urinária, sedimentoscopia urinária, concentrações séricas de creatinina, proteína total, albumina e sódio não são apropriados para investigação de envolvimento renal em cães com EMC.
- A EMC subclínica, com ou sem coinfeção por *B. vogeli*, está associada com alteração funcional glomerular.

8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p. 796-802, 2007.

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A.; WIENSTEIN, S.; KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel, **Veterinary Record**, England, v. 138,n.11, p. 257-259, 1996.

BONFANTI, U.; ZINI, E.; MINETTI, E.; ZANELLI, A. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.18, n.5,p. 618-624, 2004.

BREITSCHWERDT, E. B.; WOODY, B. J.; ZERBE, C. A.; ET AL. Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.1, n.1,p. 2-9, 1987.

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

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v.10, n.4, p.143-171, 1973.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; TINUCCI-COSTA, M. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.115, n.1, p.73-86, 2004.

CODNER, E. C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G. K, SMITH, C. A.; ROBERTSON, J. L.; MARTIN, R. A.; TROY, C. G. Investigation of glomerular lesions in dogs whith acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinar Research**, Chicago, v.53, n.12. p, 2286-2291. 1992a.

CODNER, E. C.; MASLIN, W. R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.53, n.3, p. 294-299, 1992.

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

COSTA, L. M. J.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M. F. B.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, F. Sero-prevalence and risk indicators for canine Ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, London, n.174, p.673-676, 2007.

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

DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmatidae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Jaboticabal, v.18, n.4, p. 20-25, 2009

DAVOUST, B.; PARZY, D.; VIDOR, E.; HASSELOT, N.; MARTET, G. Ehrlichiose canine expérimentale: étude clinique et thérapeutique. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v.167, n.1, p. 33-40, 1991.

DEFAUW, P.; SCHOEMAN, J. P.; SMETS, P.; GODDARD, A.; MEYER, E. Assessment of renal dysfunction using urinary markers in canine babesiosis caused by *Babesia rossi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.190, n.3-4 , p. 326-332, 2012.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCK, K.C.; LI, P.; WALKER, D.C.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor Taq-Man Real Time PCR of the dsb gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v.7, p.504-510, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S.T.; 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 “EGH agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Israel, v.51, p. 2145-2165, 2001.

FARIA, J. L. M.; RIBEIRO, S. C. A.; TINUCCI-COSTA, M. Estudo da sintomatologia e alterações do hemograma e urinálise em cães com erliquiose na fase aguda In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 24., 2003, Belo Horizonte. **Anais eletrônicos...** Belo Horizonte, 2003. 1 CD-ROM.

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

FINCO, D. R. Evaluation of renal function. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1995, p.216-229.

FRANCK, R. J.;BREITSCHWERDT. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from north California and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrance, v.13, n.3,p. 194–201, 1999.

FURUTA, P. I.; OLIVEIRA, M. F. S.; TEIXEIRA, M. C. A.; ROCHA, A. G.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.3, p. 41-45, 2009.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian**, Yardley, v.19, n.4, p. 431-444, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARCK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.1, p. 73-6, 1998.

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

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.48, n.11, p. 4488-4490, 2004.

HARRUS, S.; NEER, T. M. E. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminatum*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier B. V. Saunders Company, 2006. p. 212-213.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overreview. **The Veterinary Journal**, London, v.187,n.1, p. 292-296, 2011

HILDEBRANDT, P. K.; HUXSOLL, D. L.; WALKER, J. S.; NIMS, R. M.; TAYLOR, R.; ANDREWS, M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). **American Journal of Veterinary Research**. V.34, n.10, p.1309-1320, 1973.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.42, n.4, p. 281-287, 1994.

IRWIN, P. J.; HUTCHINSON, G. W.. Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs. Australian Veterinary Association, Oxford,v.68.n.6,p. 204-209, 1991

ISOLA, J. G. M. P.; CADIOLI, F. A.; NAKAGE, A. P. Erliquiose canina-revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, n.18, p.1-11, 2012.

KATAOKA, A.; SANTANA, A. E.; SEKI M. C.; Alterações do proteinograma sérico em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 098-102, 2006.

KAVINSKI, L. C.; FLORIANO, B.; CARON, P. E.; BRONZE, S. J. M. Ocorrência de um caso de erliquiose canina em Curitiba-PR. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 217-219, 1988.

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

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clinica Veterinária**, São Paulo, v.4,n.30, p.24 -32, 2001.

LABRUNA, M. B.; McBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.143, n. 2, p.189-195, 2007.

LEFEBVRE, H.P.; DOSSIN, O.; TRUMEL, C.; BRAUN, JP. Fractional excretion tests: a critical review of methods and applications in domestic animals. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v.37, n.1, p.4-20, 2008.

LEFEBVRE, H. P. Renal function testing. In: BARTGES, J.; POLZIN, D.J. Nephrology and Urology of Small Animals. USA: Wiley-Blackwell, 2011. Cap.14, p. 401-402.

LEWIS, G. E. J.; RISTIC, M.; SMITH, R. D.; LINCILN, T.; STEPHENSON, E. H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**., Chicago, v.32, n.12, p. 1953-1955, 1977.

MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. M. F.; FREIRE, I. M. A; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. O.; ALMOSNY, N. R. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v.34, n.1, p. 44-80, 2005.

MARTÍNEZ, P. P.; CARVALHO, M. B. Participação da excreção renal de cálcio, fósforo, sódio e potássio na homeostase em cães saudáveis e cães com doença renal crônica. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n.10, p. 868-876, 2010.

MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M.; HERNANDEZ-VARGAS, G.; FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; MACHADO, R. Z.; COSTA-TINU, M. Experimental *Ehrlichia canis* Infection changes acute-phase protein, **Revista Brasileira de Parasitologia**, Jaboticabal, v.21, n. 3, p. 206-212, 2012.

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

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*. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.41, n.2, p. 250-254, 1980

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

PETER, J. E. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animals Practice**, Philadelphia, v. 40, n. 6, p. 1141-1146, 2010

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and Ehrlichial disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Wanshington, v.4, n.3, p. 286-304, 1991.

RYU, E. Rapid microscopic agglutination test for *Leptospira* without non-specific reaction. **Bulletin Office of International Epizooties**, Berlin, v.73, p.49-58, 1970.

SCAGLIA, F.; VOGLER, L. B.; HYMES, L. C.; MAKI-JR, A. Minimal change nephrotic syndrome: a possible complication of ehrlichiosis. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v.13, n.7, p. 600-6001, 1999.

TROY, G.C.; VULGAMOTT, J.C.; TURNWALD, G.H. Canine ehrlichiosis: A retrospective study of 30 naturally occurring cases. **Journal of the American Animal Hospital association**, Lakewood, v.16, n.2, p. 181–187, 1980.

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

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

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

WANER, T.; KEYSARY, A.; BARK, H.; SHARABANI, E.; HARRUS, S. Canine Monocytic Ehrlichiosis – an overview. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Tel-Aviv, v. 54, n.4, p.103-107, 1999.

WELSL, C.; LEISEWITZ, A. L.; JACOBSON, L. S.; VAUGHAN-SCOTT, T.; MYBURGH, E.; Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiose. Tygervally. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, Tigervally, v. 72, n. 3, p.158-162, 2001.

WOODY, X. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p 75-98, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A

ESPÉCIE	PARÂMETROS ERITROLEUCOMÉTRICOS E PLAQUETÁRIOS										PLAQUETAS.
	HE X10 ⁶ /uL	LE x10 ³ /uL	HB g/dL	HT %	CONTAGEM DIFERENCIAL %						MON.
			BAS. 00 -01	EOS. 2 - 10	BAST. 0 - 3	SEG. 60 - 77	LINF. 13 - 30				
CANINA	5,5 - 8,5	6 - 18	12 - 18	37 - 55	00 -01	2 - 10	0 - 3	60 - 77	13 - 30	3 - 10	180 - 400
FORMULA LEUCOCITÁRIA ABSOLUTA (X10 ³ /uL)											
					BAS.	EOS.	BAST.	SEG.	LINF.	MON.	
					0 - 0	0,12 - 1,8	3,6 - 13,8	0 - 0,5	0,72 - 5,4	0,18 - 1,8	

APÊNDICE B

	PARAMETROS BIOQUÍMICOS							
	URÉIA mg/dL	CREA mg/dL	PT g/dL	ALB. g/dL	GLOBULINA *g/L	FÓSF. mg/dL	SÓDIO mmol/L	ALT U/L
CANINA	15 - 75	0,5 - 1,5	5,8 - 7,9	2,6 - 4,0	2,7 - 4,4	2,2 - 5,5	146 - 156	10 - 88
* http://www.labvet.com.br								

APÊNDICE C

Valores de referência para UPC, Excreção fracionada de sódio e Pressão arterial sistólica		
UPC	Excreção fracionada de sódio	Pressão arterial sistólica
Até 0,5	Até 1%	valor normal - 80 a 150mmHg

