

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia* spp. NO DISTRITO FEDERAL E SUAS
ALTERAÇÕES LABORATORIAIS**

MARIANA ACCIOLY LIMA

Brasília

2013

MARIANA ACCIOLY LIMA

**OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia* spp. NO DISTRITO FEDERAL E SUAS
ALTERAÇÕES LABORATORIAIS**

Monografia apresentada para a conclusão do Curso
de Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientadora:

Prof^aDr^aGiane Regina Paludo

Brasília

2013

Lima, Mariana Accioly

Ocorrência de *Ehrlichia* spp. no Distrito Federal e suas alterações laboratoriais/
Mariana Accioly Lima; orientação de Giane Regina Paludo – Brasília, 2013.

29 p.: il.

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária, 2013.

1. Erliquiose canina. 2.PCR. 3. Distrito Federal

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Mariana Accioly Lima

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Ocorrência de *Ehrlichia* spp. no
Distrito Federal e suas alterações laboratoriais

Ano: 2013

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.

Mariana Accioly Lima

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: LIMA, Mariana Accioly

Título: Ocorrência de *Ehrlichia* spp.no Distrito Federal e suas alterações laboratoriais

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Orientadora:

ProfaDraGiane Regina Paludo

Aprovado em:

Banca examinadora:

Profa. Dra. Giane Regina Paludo Instituição: UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Simone Perecmanis Instituição: UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Laurício Monteiro Cruz Instituição: Diretoria de Vigilância Ambiental

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por todas as oportunidades ao longo do caminho que me trouxeram até aqui.

Aos meus pais, por me incentivarem sempre e investirem na minha educação ao longo de todos esses anos.

Ao meu namorado, por estar sempre ao meu lado, me ajudando e dando forças para seguir em frente, tornando minha jornada mais tranquila.

A minha orientadora, pelo apoio, pelos ensinamentos e pelas ideias e correções, que contribuíram para a elaboração da pesquisa e do trabalho.

A Marcela, que passou muitas horas comigo, ensinando a fazer uma extração de DNA, como mexer num termociclador, o que fazer para não contaminar uma amostra e esteve comigo em todas as minhas corridas de gel, esperando junto para ver se deu tudo certo.

Aos meus amigos que me apoiaram ao longo de todo esse processo.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e a todos os outros que ajudaram na coleta das amostras.

Ao Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, que forneceu a estrutura e os recursos para a realização da pesquisa.

RESUMO

LIMA, M. A. Ocorrência de *Ehrlichia* spp. no Distrito Federal e suas alterações laboratoriais. [Occurrence of *Ehrlichia* spp. in Distrito Federal and their clinical pathologic alterations]. 2012. 29 p. Monografia (Conclusão de Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A erliquiose canina é uma doença causada pela riquétsia *Ehrlichia canis* e transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Tem distribuição mundial e encontra-se bastante difundida no Brasil. O presente estudo teve como objetivo determinar a presença e a distribuição de *Ehrlichia* spp. em cães de diferentes regiões do Distrito Federal por meio da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e comparar os resultados com os exames hematológicos dos animais. Para a análise, foi utilizado o sangue de sessenta cães de cinco regiões do Distrito Federal, colhido durante a Campanha de Vacinação de Raiva realizada nos dias 19 e 26 de maio de 2012. A PCR detectava sequências da região 16S rRNA de *Ehrlichia* spp. A ocorrência de infecção por *Ehrlichia* spp. nos cães amostrados no Distrito Federal foi de 21,67% (13/60), sendo que quatro (4/11) animais positivos eram de Vicente Pires, três (3/12) do Guará, quatro (4/16) da região 1 de Ceilândia e 2 (2/10) da região 2 de Ceilândia. Não foram encontrados animais positivos em Planaltina (0/11). Foi observada diferença ($p < 0,05$) ao se comparar VG e contagem de hemácias de animais positivos e negativos, caracterizando a presença de anemia. As principais alterações hematológicas mais encontradas nos animais positivos foram: hiperproteinemia plasmática (73,84%), monocitopenia (61,54%), anemia microcítica (46,15%), trombocitopenia (30,77%) e linfopenia (30,77%). Como as alterações clínicas e hematológicas foram discretas, pode-se concluir que os animais se encontravam na fase subclínica da doença no momento da colheita do sangue.

Palavras-chave: erliquiose canina, PCR, Distrito Federal

ABSTRACT

LIMA, M. A. Occurrence of *Ehrlichia* spp. in Distrito Federal and their clinical pathologic alterations.[Ocorrência de *Ehrlichia* spp. no Distrito Federal e suas alterações laboratoriais]. 2012. 29 p. Monografia (Conclusão de Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Canine ehrlichiosis is a tickborne disease(*Rhipicephalussanguineus*) caused by the rickettsia *Ehrlichia canis*.It is worldwide distributed and is commonly found in Brazil. This study determines the presence and distribution of *Ehrlichia* spp.in dogs from five different regions in Distrito Federal using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and compares the results of hematological exams ofthese dogs. Blood samples from sixty dogs from five different regions in Distrito Federal were collected during the Rabies Vaccination Campaign realized on May 19th and May 26th, 2012. *Ehrlichia* spp. was identified by PCR amplification of16S rRNA gene sequence. The occurrence of *Ehrlichia* spp. in these dogs from Distrito Federal was 21,67% (13/60), which four of them (4/11) were from Vicente Pires, three (3/12) from Guar, four (4/16) from region 1 from Ceilândia and two (2/10) from region 2 from Ceilândia. There were no positive animals from Planaltina (0/11). There was difference ($p<0.05$) between positive and negative animals when comparing the hematocritandthe number of erythrocytes whichcharacterizes anemia. The most hematological alterations seen in positive dogs were: hyperproteinemia(73.84%), monocytopenia (61.54%), microcytic anemia (46.15%), thrombocytopenia (30.77%) and lymphopenia (30.77%). As the clinical and hematological alterations were discrete, it could be concluded that these animals were at the subclinical phase of the disease by the time the blood was collected.

Key-words: canine ehrlichiosis, PCR, Distrito Federal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. ERLIQUIOSE MONOCITOTRÓPICA CANINA (<i>Ehrlichia canis</i>)	10
2.1 Patogênese	11
2.2 Sinais clínicos	12
2.3 Alterações laboratoriais	13
2.4 Diagnóstico	14
2.5 Tratamento	15
2.6 Controle	16
2.7 Potencial Zoonótico	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Análise hematológica	17
3.2 Extração de DNA	17
3.3 PCR	17
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

A erliquiose canina é uma doença causada por uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória de monócitos, sendo conhecidas também como erliquiose monocitotrófica canina. Pertence a família *Anaplasmataceae*, sendo que o gênero *Ehrlichia* foi incluído nela a partir de 2001, retirado da família *Rickettsiaceae*, quando houve uma reclassificação das bactérias devido a análise molecular dos genes 16S rRNA e groESL. Algumas espécies desse gênero também sofreram uma reclassificação, sendo uma delas a *Ehrlichia platys*, que passou a pertencer ao gênero *Anaplasma* desde então (GREENE, 2012).

É uma doença que possui distribuição mundial e necessita de vetores para ser transmitida, sendo o carrapato marrom, *Rhipicephalus sanguineus*, o transmissor mais comum (TAYLOR, 2007; GREENE, 2012).

A doença pode ser dividida nas fases: aguda, sub-clínica e crônica. Na fase aguda, que dura cerca de 2 a 4 semanas, o animal pode apresentar febre, anorexia, perda de peso, mucosas pálidas devido a anemia, corrimento óculo-nasal e linfadenopatia (ALMOSNY, 2002). Durante a fase sub-clínica, não são observadas alterações clínicas, podendo encontrar apenas alterações laboratoriais (NELSON E COUTO, 2010). A fase crônica possui características de doença imunomediada, sendo os sintomas mais comuns: mucosas pálidas devido a anemia, perda de peso, febre, petéquias e equimoses pela trombocitopenia, glomerulonefrite, artrite, entre outros (ALMOSNY, 2002; HIRSH, 2003).

Existem diversos métodos diagnósticos para a infecção, mas normalmente são utilizados sinais clínicos compatíveis associados a detecção da bactéria por meio de esfregaço sanguíneo ou a resultados sorológicos. Porém, devido a baixa sensibilidade ou a presença de reações cruzadas com agentes semelhantes, tem se observado a necessidade de exames mais precisos (AGUIAR, 2006; NAKAGHI, 2008; RAMOS, 2009; ISOLA, 2012a).

Com isso, os objetivos desse trabalho foram: determinar a presença e a distribuição de *Ehrlichia canis* em cães de diferentes regiões do Distrito Federal por meio da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e comparar os resultados com os exames hematológicos dos animais.

2. ERLIQUIOSE MONOCITOTRÓPICA CANINA (*Ehrlichia canis*)

A erliquiose monocitotrópica canina é uma doença causada por bactérias intracelulares obrigatórias do gênero *Ehrlichia*, sendo a *E. canis* a espécie mais estudada e a única descrita até o momento no Brasil. É caracterizada por infectar os monócitos dos cães, podendo afetar também macrófagos. São cocos Gram negativos e formam aglomerados intracitoplasmáticos, chamados de mórulas (AGUIAR, 2006; TAYLOR, 2007; GREENE, 2012). Também pode ser chamada de rickettsiose canina, tifo canino, febre hemorrágica canina e síndrome hemorrágica idiopática (PRICE; SAYER, 1983).

É uma doença que tem distribuição mundial (Europa, Ásia, África e Américas, exceto Austrália, que aparentemente está livre), especialmente naqueles países de zona tropical e temperada. A maioria dos casos geralmente ocorre em épocas quentes, quando o vetor é mais abundante no ambiente, porém a doença clínica pode ocorrer em qualquer época do ano, devido ao curso demorado da fase sub-clínica. Os hospedeiros vertebrados são animais pertencentes a família Canidae, como coiotes, raposas e cães domésticos. Acredita-se que essa bactéria ou alguma outra com características similares possa infectar também gatos (GREENE, 2012).

No Brasil, é considerada por muitos como uma das principais doenças transmissíveis em cães, devido a inexistência de vacinas, a grande quantidade presente do vetor e a sua casuística crescente ao longo dos anos (AGUIAR, 2006). De acordo com alguns estudos, acomete cerca de 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias no Brasil, sendo que os valores podem variar de 1,7% a 43%, dependendo da região de estudo (LABARTHE, 2003; BULLA, 2004; CARLOS, 2007).

Tem como vetores artrópodes conhecidos o carrapato marrom *Rhipicephalus sanguineus* e o *Dermacentor variabilis* (NELSON E COUTO, 2010). O carrapato marrom encontra-se disseminado na área urbana de todo o Brasil (AGUIAR, 2006).

O carrapato se infecta ao exercer hematofagia em cães com as bactérias circulantes, ou seja, duas a três semanas após o cão ter sido infectado pela riquetsia. É mais difícil para os cães com a doença crônica infectarem carrapatos (HIRSH, 2003; SANTARÉM, 2003).

Os vetores transmitem a infecção por meio da saliva ao fazerem o repasto em outros hospedeiros. Esta transmissão pode ocorrer em qualquer um dos seus estágios de desenvolvimento: larvas, ninfas ou adultos. Pode ocorrer ainda transmissão transestadial, mas não ocorre transmissão transovariana. É importante destacar que carrapatos adultos podem transmitir a doença até 155 dias após ingerir a bactéria, fazendo com que o micro-organismo persista por mais tempo no ambiente (SANTARÉM, 2003; TAYLOR, 2007; GREENE, 2012; ISOLA, 2012a).

2.1. Patogênese

A doença é dividida nas fases aguda, sub-aguda e crônica, segundo os sinais clínicos e laboratoriais de animais infectados experimentalmente. Cada fase possui algumas características próprias, mas muitas vezes é difícil diferenciá-las na rotina veterinária. A intensidade dos sinais varia com a cepa infectante, a resposta imune do animal, a alimentação do animal e se há ou não infecções concomitantes de outros agentes (GREENE, 2012; ISOLA 2012a).

Os hospedeiros vertebrados se infectam quando o carrapato que possui saliva contaminada pela bactéria faz repasto no animal sadio, ou quando há transfusão de sangue de um animal com a infecção para um livre dessa doença (GREENE, 2012).

O período de incubação geralmente é de 8 a 20 dias, nos quais o micro-organismo se multiplica por fissão binária no sistema fagocítico mononuclear, formando as mórulas. Como a bactéria se divide em vacúolos protegidos da ação dos lisossomos da célula, consegue desta forma sedisseminar pelo organismo, alojando-se principalmente no fígado, baço e linfonodos, infectando outras células com a ruptura da membrana celular após a formação de um estágio mais tardio da mórula. (DAGNONE, 2001; HIRSH, 2003; SANTARÉM, 2003; GREENE, 2012; TAYLOR, 2007; ISOLA, 2012a). Em seguida, tem início a fase aguda, que dura de 1 a 4 semanas. Com o tratamento adequado, o animal pode se recuperar normalmente. Se não tratado, ou tratado de forma inadequada, começa o estágio sub-clínico da doença, no qual há recuperação clínica do paciente, que passa a aparentar estar saudável, apesar de continuar sendo um carreador de *E. canis*. Nessa fase, a contagem de plaquetas continua abaixo dos valores de referência. Acredita-se que o baço tenha um importante papel na persistência da doença no animal (GREENE, 2012).

Animais imunologicamente competentes conseguem debelar a infecção sem tratamento, mas, caso isto não ocorra, desenvolvem o estágio crônico da doença. Essa fase é caracterizada por apresentar características de uma doença auto-imune, com diminuição da produção de células pela medula óssea provavelmente devido a um mecanismo imunomediado, gerando uma pancitopenia. O prognóstico nessa fase é reservado e o animal pode vir a óbito por infecções secundárias, sangramentos descontrolados ou pela associação dos dois. Os sangramentos ocorrem pela redução da produção de plaquetas pela medula óssea e diminuição de sua função de agregação, como ocorre comumente em animais infectados (THRALL, 2007; GREENE, 2012; ISOLA, 2012a).

Além disso, a infecção por *E. canis* gera um grande aumento da produção de imunoglobulinas, podendo ocorrer também a produção de anticorpos contra as plaquetas ou então a deposição de imunocomplexos em órgãos, como rins e articulações, gerando outras alterações no paciente (GREENE, 2012; ISOLA 2012a).

2.2. Sinais Clínicos

A erliquiose canina é uma doença multissistêmica. Na fase aguda, é comum se observar febre, corrimento oculonasal seroso ou purulento, anorexia, perda de peso, dispneia, tendências hemorrágicas, com a presença de epistaxes ou a formação de petéquias ou equimoses, e linfadenopatia. Podem ser observados carrapatos infestando o animal (SANTARÉM, 2003; NELSON E COUTO, 2010; GREENE, 2012).

Na fase subclínica, não há evidência de sinais clínicos, havendo apenas algumas alterações laboratoriais. Podem ser encontradas sorologia e PCR positivas. Os carrapatos podem não ser mais observados (NELSON E COUTO, 2010).

Na fase crônica, há uma grande variedade de sinais, devido a deposição de anticorpos em diversos tecidos. Além disso, os sinais clínicos podem variar com a presença de infecções concomitantes por outros agentes, como *Babesia canis* ou *Hepatozoon canis*, e se há presença de infecções secundárias por bactérias, fungos ou protozoários. Alguns sinais que podem ser encontrados são: depressão, perda de peso, palidez de mucosas, dor abdominal, evidências de hemorragia, como epistaxe, petéquias, etc., linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, dor articular devido a artrite, alterações oculares como uveíte, retinite, hifema, etc., arritmias cardíacas,

poliúria e polidipsia devido a glomerulonefrite e alterações no sistema nervoso central, como convulsões, paresia, entre outros (HIRSH, 2003; GREENE, 2012; NELSON E COUTO, 2010).

2.3. Alterações Laboratoriais

Durante a fase aguda, podem ser observadas moderada a severa trombocitopenia, moderada anemia normocítica normocrômica não regenerativa devido a resposta inflamatória, caso não haja hemorragia, e leucopenia, seguida de leucocitose por neutrofilia e monocitose. Pode haver neutropenia e hipoalbuminemia devido a vasculite (NAKAGHI, 2008; NELSON E COUTO, 2010). Além disso, é nessa fase em que podem ser observadas mórulas nos monócitos circulantes. A trombocitopenia ocorre devido ao consumo das plaquetas e a diminuição de sua meia-vida, pelo seqüestro esplênico ou destruição imunomediada. Podem ser observadas plaquetas gigantes, indicando resposta medular a trombocitopenia (DAGNONE, 2001; ALMOSNY, 2002; HIRSH, 2003; TAYLOR, 2007; GREENE, 2012). Nos exames bioquímicos podem ser observados aumentos das enzimas alaninaaminotransferase, fosfatase alcalina, bilirrubinas e das proteínas, devido ao aumento das globulinas e diminuição dos níveis da albumina (ALMOSNY, 2002; ISOLA, 2012a; GREENE, 2012).

Na fase sub-clínica, podem ser encontradas: hiperglobulinemia, moderada trombocitopenia, neutropenia, linfocitose e monocitose (NELSON E COUTO, 2010; GREENE, 2012). Estudos indicaram que em aproximadamente 50% dos animais a anemia, a trombocitopenia e a leucopenia desaparecem nessa fase, sendo observadas apenas neutropenia e linfocitose (ALMOSNY, 2002).

Na fase crônica, podem ocorrer: monocitose, linfocitose, com linfócitos podendo conter grânulos azurofílicos, trombocitopenia, anemia não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoplasia da medula óssea, hipoalbuminemia pela perda glomerular, proteinúria, rara azotemia, aumento da atividade da alanina aminotransferase e da fosfatase alcalina. Se houver supressão da medula óssea, é encontrada pancitopenia. Outras alterações que podem ser encontradas são aumento no tempo de sangramento devido a trombocitopenia ou má função plaquetária, hematúria e gamopatia monoclonal (ALMOSNY, 2002; THRALL, 2007; NELSON E COUTO,

2010; GREENE, 2012). Segundo Almosny et al. (2002), a evolução da doença para a mortalidade tem relação direta com o estado imunitário do cão.

2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose é feito associando-se o histórico dos animais, os sinais clínicos e os exames hematológicos aos testes sorológicos ou moleculares. (AGUIAR, 2006; NAKAGHI, 2008; ISOLA, 2012a)

Nos exames hematológicos, a trombocitopenia é um achado comum, podendo ser observados também anemia e leucopenia (NAKAGHI, 2008; NELSON E COUTO, 2010; GREENE, 2012). Não é frequente encontrar mórulas intracitoplasmáticas das bactérias, mas na fase aguda da doença é quando elas podem ser mais visualizadas, sendo que quando o esfregaço é feito com o sangue periférico (da ponta da orelha), as chances deste achado aumentam (ALMOSNY, 2002).

Em áreas endêmicas, a erliquiose deve ser considerada como um dos diferenciais quando for encontrada trombocitopenia no exame. Apesar de existirem outras causas para a trombocitopenia, como trombocitopenia imunomediada, neoplasias, doenças inflamatórias e outros agentes infecciosos, um estudo realizado por Bulla et al. (2004) mostrou que em um grupo de 84 animais trombocitopênicos em uma área endêmica, 63,1% eram positivos na PCR para *E. canis*. Além disso, a doença também não deve ser completamente descartada de animais que possuam a contagem de plaquetas normal nessas áreas, já que esse mesmo estudo mostrou que 1,4% dos 71 animais com contagem de plaquetas normal foi positivo na PCR.

A avaliação sorológica é útil para auxiliar no diagnóstico rápido da doença na clínica veterinária, sendo que de acordo com Machado (2004), Nakaghi (2008) e Isola et al (2012b) o Dot-Elisa é considerado mais sensível se comparado a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os testes ELISA ajudam no diagnóstico da erliquiose nas fases sub-clínica e crônica, porém, na fase aguda podem ser encontrados resultados falso-negativos (ALMOSNY, 2002).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o teste sorológico mais utilizado, sendo considerado como teste de ouro. No entanto, há uma grande variabilidade nos resultados do teste devido a variações no procedimento e na quantidade e qualidade dos antígenos para *E. canis* utilizados em diferentes laboratórios

(GREENE, 2012). Quando se encontram títulos superiores a 1:40, há indícios de que houve exposição ao agente infeccioso. É recomendado a realização de dois testes consecutivos com 1 a 2 semanas de intervalo para a confirmação de infecção ativa, quando observa-se um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos (TAYLOR, 2007). Geralmente, após o tratamento adequado, os níveis de anticorpos diminuem até finalmente desaparecerem da circulação. Porém, alguns estudos mostraram a persistência de níveis de anticorpos elevados um ano após o tratamento e até mesmo quando não há detecção da bactéria na circulação por meio da PCR. Podem acontecer reações cruzadas com *N. helminthoeca* e *N. risticii* (GREENE, 2012).

O gene 16S rRNA é o mais usado para a detecção da bactéria em animais por meio da PCR, tendo sido seqüenciada segundo um fragmento de 398 pares de bases em Jaboticabal (MACHADO, 2004). A PCR é um método bastante promissor, pois pode ser positivo antes da soroconversão do animal. Além disso, mostra a presença da infecção, enquanto a sorologia mostra apenas a exposição ao agente, ajudando na diferenciação de animais cronicamente infectados daqueles para os quais o tratamento foi efetivo, mas os níveis de anticorpos continuaram elevados. Também é útil para saber qual espécie de riquetsia está infectando o animal. Porém, deve ser feita uma associação da PCR com a sorologia, e não sua substituição, já que ainda não há uma padronização dos laboratórios. Pode haver resultados falso-negativos pela dificuldade de extração do DNA da bactéria, problemas de técnica, amostra inadequada ou pelo uso de antibióticos, pois eles induzem ao aparecimento de resultados negativos na PCR do sangue. Resultados falso-positivos podem ocorrer devido a contaminação da amostra ou ampliações não específicas (MCBRIDE, 1996; NAKAGHI, 2008; NELSON E COUTO, 2010; GREENE, 2012).

2.5. Tratamento

Como tratamento podem ser usados diversos antibióticos, como tetraciclina, oxitetraciclina, dipropionato de imidocarb, minociclina e doxiciclina, sendo que este último é o medicamento de eleição (WANER, 2000; HIRSH, 2003; GREENE, 2006; NELSON E COUTO, 2010; ISOLA, 2012a). Deve ser realizado por cerca de 3 a 4 semanas na fase aguda da doença, prolongando um pouco mais paracções que se encontram na fase sub-clínica, enquanto cães na fase crônica dificilmente respondem a terapia escolhida (VARELA, 2003; TAYLOR, 2007).

A resposta é observada com a melhora nas condições clínicas e laboratoriais do paciente, como volta a normalidade dos valores hematológicos, retorno do apetite, entre outros (ISOLA, 2012a). Após duas semanas do fim do tratamento, deve ser realizada PCR para ver se o animal ainda está positivo. Caso esteja, o tratamento deve ser feito novamente por mais quatro semanas e, depois, repetir o teste novamente. Se ainda assim for positivo, outro medicamento deve ser usado para o tratamento. Se o resultado for negativo, após oito semanas deve ser realizado o teste novamente e, se der negativo de novo, há a confirmação de que a terapêutica foi eficiente (NELSON E COUTO, 2010).

2.6. Controle

É essencial o controle de carrapatos no ambiente para a prevenção da doença, pois é o vetor deste e de vários outros agentes etiológicos. Para isso, é indispensável que haja a limpeza constante e a higiene adequada do ambiente, podendo ser necessário o uso de acaricidas, como o fipronil (HIRSH, 2003; VARELA, 2003; ISOLA, 2012a;). O tratamento dos animais também é importante, pois assim, novos carrapatos não ficarão infectados, já que não há transmissão transovariana. Cães doadores de sangue devem ser monitorados frequentemente por meio da sorologia e aqueles positivos não poderão doar sangue (NELSON E COUTO, 2010).

2.7. Potencial Zoonótico

A erliquiose é uma doença com potencial zoonótico, sendo que as espécies já descritas causando doença em humanos até o momento foram: *E. chaffeensis*, que pode causar erliquiose monocitotrófica canina; *E. ewingii* e *Anaplasma phagocytophilum*, que causam a erliquiose granulocítica canina; e *Neorickettsia sennetsu* (*Ehrlichia sennetsu*), que causa a “febre sennetsu” em humanos. Um micro-organismo semelhante a *E. canis* foi isolado de uma pessoa cronicamente infectada e assintomática na Venezuela, sendo que a mesma bactéria foi isolada de cães da região. Porém, ainda são necessários mais estudos para se determinar o potencial zoonótico desta espécie (SPICKLER, 2005).

Em humanos, a *E. chaffeensis* pode ser fatal em até 5% dos pacientes e a erliquiose granulocítica, em até 10% dos doentes (DAGNONE, 2001). Os sinais clínicos podem variar de assintomáticos a severos, podendo ser observadas dores de cabeça, febre, dores musculares, vômitos, dor abdominal, conjuntivite, tosse, entre outros (SPICKLER, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Durante a campanha de vacinação contra a raiva realizada nos dias 19 e 26 de maio de 2012, foi colhido o sangue de cães de cinco regiões diferentes do Distrito Federal: Guará, Planaltina, Vicente Pires e duas regiões de Ceilândia, totalizando 60 animais. O sangue foi acondicionado em tubos com anticoagulante (EDTA). As amostras foram processadas no mesmo dia da colheita.

3.1. Análise Hematológica

Parte do sangue presente no tubo foi utilizada para a realização de hemograma, executado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal.

Foi utilizado o contador semiautomático de células para uso veterinário modelo Micros ABC Vet (Horiba ABX) para determinar o número total de hemácias, leucócitos e plaquetas e a concentração de hemoglobina. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados usando o cálculo padrão. O volume globular (VG) foi determinado pela técnica do microhematócrito. As proteínas plasmáticas (PPT) foram determinadas com o auxílio do refratômetro. Foram confeccionados esfregaços de sangue total corados com panótico para a realização do diferencial leucocitário e observação morfológica das células.

3.2. Extração do DNA

A outra parte do sangue foi armazenada congelada até a extração de seu DNA para a realização da PCR de *Ehrlichia* spp. A extração foi realizada no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (MPM) do Hospital Veterinário da UnB. Foi utilizado o kit comercial Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare) e o processamento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. O produto desse processamento foi armazenado congelado a -20° Celsius até a realização da PCR, voltando depois para a temperatura anteriormente citada.

3.3. PCR

Para a PCR de *Ehrlichia* spp., foram usados os oligonucleotídeos EHR16sd (5'-GGT-ACC-YAC-AGA-AGA-AGT-CC-3') e EHR16sr (5'-TAG-CAC-TCA-TCG-TTT-ACA-GC-3') que detectavam o gene 16S rRNA da bactéria. Esses oligonucleotídeos amplificam: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. equi*, *E. phagocytophila*, *E. platys* (*Anaplasma platys*), *A. marginale*, *A. centrale*, *Wolbachia pipientis*, *E. sennetsu*, *E. risticii* e *Neorickettsia helminthoeca* (INOKUMA, 2000). A água foi usada como controle negativo para verificar se houve contaminação de algum reagente. Para o controle positivo foi usado o sangue de um animal infectado com a observação de mórulas de erliquia em esfregaço sanguíneo.

As reações eram compostas por: cerca de 10 ng de DNA, 1X tampão de PCR (Invitrogen®), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen®), 1,6 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 1μM de cada oligonucleotídeo, 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 25μl. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 34 ciclos repetidos de desnaturação (95°C por 30 segundos), anelamento (53°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 90 segundos); e extensão final de 72°C por 5 minutos. Todas as reações foram realizadas utilizando o mesmo termociclador C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad).

O resultado das PCR's foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e observado em transiluminador de fluorescência. As amostras foram consideradas positivas quando resultavam em um produto de 345 pares de base (pb), como descrito por Inokuma et. al. (2000). Estes processamentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (MPM) do Hospital Veterinário da UnB, Distrito Federal.

4. RESULTADOS

Foram utilizadas 60 amostras de sangue de cães, independente do sexo e idade. Destes animais, 11 pertenciam a região de Vicente Pires, 12 a região do Guará, 11 a região de Planaltina e 26 a região Ceilândia, sendo destes últimos 16 pertencentes a uma área da cidade e 10 pertencentes a outra.

De todos os animais estudados, 78,33% (47/60) foram considerados negativos e 21,67% (13/60) positivos na PCR para detecção de *Ehrlichia* spp. A figura 1 mostra o resultado de uma PCR para *Ehrlichia* spp. em gel de agarose, corada com brometo de

etídio e visualizada em transiluminador de fluorescência, no qual podem ser observados os produtos de 345 pares de bases.

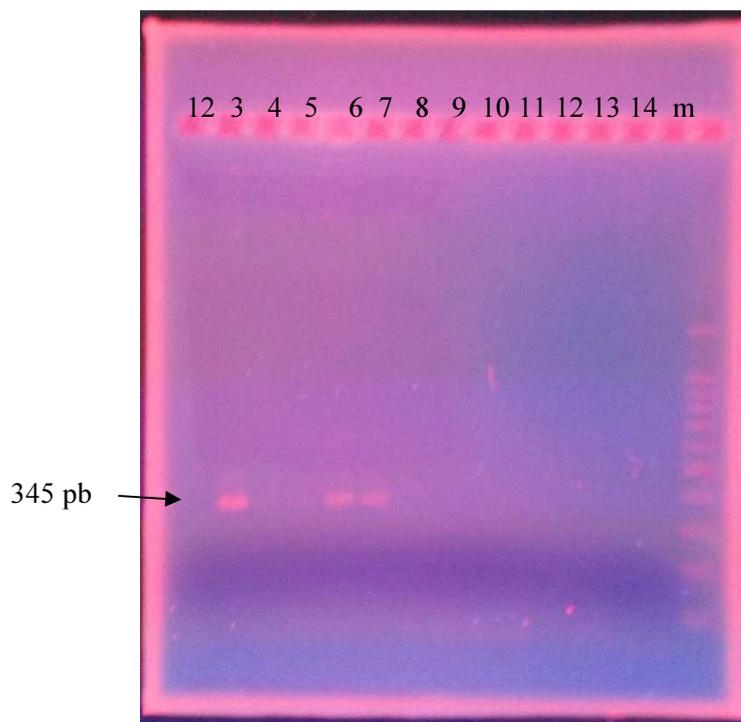


Figura 1: Resultado da PCR para *Ehrlichia* spp. utilizando-se os oligonucleotídeos EHR16sde EHR16sr. Legenda: 1: controle negativo (água); 2: controle positivo; 3 e 4: animais negativos; 5 e 6: animais positivos; 7 a 14: animais negativos; m: marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen®).

Na tabela 1 podem ser observadas as porcentagens de animais positivos e negativos na PCR para cada região de estudo. A tabela 2 mostra as porcentagens de animais positivos e negativos de cada uma das regiões de Ceilândia.

Tabela 1. Porcentagem de animais positivos e negativos na PCR por local estudado.

Animais	Vicente Pires		Guará		Planaltina		Ceilândia	
	Número/Total	%	Número/Total	%	Número/total	%	Número/total	%
Positivos	4/11	36,36	3/12	25	0/11	0	6/26	23,08
Negativos	7/11	63,64	9/12	75	11/11	100	20/26	76,92

Tabela 2. Porcentagem de animais positivos e negativos na PCR em cada região de Ceilândia.

Animais	Região 1		Região 2	
	Número/Total	%	Número/Total	%
Positivos	4/16	25	2/10	20
Negativos	12/16	75	8/10	80

Na tabela 3 podem ser observados os valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos de todos os cães positivos e negativos estudados. A tabela 4 mostra quais foram as alterações hematológicas encontradas nos animais positivos e sua frequência.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos nos cães positivos e negativos de todas as localidades.

Parâmetro	Positivos	Negativos	Valores de referência
VG (%)	35,92±5,61 ^a	40,23±5,87 ^b	37-55
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,39±0,71 ^a	6,95±0,99 ^b	5,5-8,5
Hemoglobina (g/dL)	15,21±2,53 ^a	16,48±2,67 ^a	12-18
VCM (fl)	56,02±4,54 ^a	58,19±6,71 ^a	60-77
CHCM (%)	42,37±2,94 ^a	41,14±4,71 ^a	30-36
Plaquetas (x10 ³ /μL)	258,41±158,64 ^a	319,67±145,10 ^a	200-500
PPT (g/dL)	8,01±1,13 ^a	7,41±0,99 ^a	6,0-8,0
Leucócitos (X10 ³ / μL)	9,87±3,95 ^a	11,46±3,93 ^a	6,00-17,00
Neutrófilos (X10 ³ / μL)	4,18±0,77 ^a	4,06±1,02 ^a	3,00-11,50
Linfócitos(X10 ³ / μL)	1,46±0,72 ^a	1,94±0,94 ^a	1,00- 4,80
Eosinófilos (X10 ³ / μL)	0,55±0,40 ^a	0,68±0,48 ^a	0,10-1,25
Monócitos(X10 ³ / μL)	0,17±0,12 ^a	0,23±0,13 ^a	0,15- 1,35

Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) 0 ± 0^a 0 ± 0^a Raros

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) entre si pelo teste t. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Proteína Plasmática Total (PPT). Valores de referência: fonte: Jain, 1993.

Tabela 4. Frequência das alterações hematológicas dos animais positivos.

Alterações Laboratoriais	Número de animais/total de animais positivos	%
Anemia	6/13	46,15
Anemia Microcítica	6/13	46,15
Leucopenia	3/13	23,07
Linfopenia	4/13	30,77
Monocitopenia	8/13	61,54
Eosinopenia	1/13	7,69
Eosinofilia	1/13	7,69
Trombocitopenia	4/13	30,77
Trombocitose	1/13	7,69
Pancitopenia	1/13	7,69
Hiperproteinemia plasmática	7/13	53,84

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, 21,67% (13/60) das amostras analisadas na PCR para *Ehrlichia* spp. foram consideradas positivas. Bullaet al. (2004) encontraram 30,09% (67/217) animais positivos em uma análise na qual as amostras de sangue foram escolhidas aleatoriamente dentre as recebidas durante a rotina do Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da universidade Estadual Paulista em Botucatu, que é considerada uma área endêmica para a doença. Estudos realizados por

Sousa (2006) e Menezes et al. (2008), no qual foram selecionadas amostras de sangue de animais suspeitos para a realização da PCR de *Ehrlichia* spp., foram encontrados, respectivamente, 21,7% (13/60) e 33,3% (25/75) dos animais positivos. Considerando que no presente estudo os animais estavam sem alteração clínica aparente, o número de animais positivos pode ser considerado elevado, pois o resultado foi semelhante aquele encontrado por autores que realizaram suas pesquisas com animais suspeitos.

Quanto a distribuição de animais positivos no Distrito Federal, Vicente Pires foi a Região Administrativa que mais apresentou cães com a presença da riquetsia, com 36,36% (4/11) dos animais positivos, seguido do Guará com 25% (3/12) e Ceilândia com 23,08% (6/26), sendo que nesta última, a região 1 apresentou 25% (4/16) dos animais positivos e a região 2, 20% (2/10). Neste estudo, Planaltina foi a única Região Administrativa que não apresentou cães positivos (0/11). Apesar do número de amostras colhidas em cada local ter sido pequeno, a ausência de positivos em Planaltina pode indicar que nessa região os cães sejam melhor tratados que nos outros locais, apresentando uma menor infestação de carrapatos, ou então que a presença de carrapatos infectados seja menor, se comparado as outras Regiões Administrativas do Distrito Federal.

O hemograma apresentou diferença ($p < 0.05$) entre os animais positivos e negativos no VG e na contagem de hemácias, caracterizando a presença de anemia. Dos animais positivos, 46,15% apresentaram anemia, sendo ela do tipo microcítica. Esse resultado difere do que é esperado para a doença, que é caracterizada por frequentemente causar uma anemia normocítica normocrômica nos animais, como mostra os trabalhos de Mendonça et al. (2005), Sousa (2006), Albernaz et al. (2007), Menezes et al. (2008) e Borin et al. (2009). A anemia normocítica normocrômica causada pela erliquiose durante a fase aguda é caracterizada por ser uma anemia induzida por doença inflamatória. Durante a fase crônica é devido a aplasia da medula óssea. A anemia também pode ser causada por mecanismos imunomediados, assim como a destruição medular (THRALL, 2007; MENESES, 2008, GREENE, 2012). Por outro lado, a microcitose acontece principalmente quando há presença de deficiência crônica de ferro, geralmente encontrada em casos de pouca ingestão desse mineral ou, mais comumente, casos de hemorragia crônica ocasionada por: endoparasitas gastrintestinais, ectoparasitas sugadores de sangue, úlceras e neoplasias gastrintestinais, trombocitopenia, entre outros. É possível aparecer também em anemia induzida por

doença inflamatória, apesar de ser um achado incomum. Nesses animais o teor sérico de ferro encontra-se diminuído, apesar da reserva desse mineral estar normal ou aumentada. Isso acontece para que a disponibilidade de ferro necessária para o crescimento bacteriano esteja reduzida (THRALL, 2007). Por se tratar de animais pertencentes a regiões de populações de menor poder socioeconômico e que buscam menos frequentemente o auxílio do profissional médico veterinário, é possível que esses animais apresentassem grande quantidade de endoparasitas gastrintestinais associados ou não com ectoparasitas sugadores de sangue. Além disso, é provável que a alimentação desses animais fosse deficiente de ferro, pois muitas vezes esses proprietários alimentam os cães com restos de alimentos.

A hipercromia encontrada tanto nos animais positivos quanto negativos pode ser explicada por um teor falsamente aumentado de hemoglobina devido a hemólise ocasionada durante ou após a coleta do sangue. Fisiologicamente não é possível que as hemácias possuam uma concentração de hemoglobina maior do que a normal (THRALL, 2007).

A monocitopenia foi encontrada em 61,54% (8/13) dos animais positivos. Esse resultado foi bastante superior ao encontrado por Sousa (2006), Albernaz et al. (2007) e Borin et al. (2009), que encontraram contagem baixa de monócitos em apenas 15,38% (2/13), 28% (62/219) e 12,81% (26/203) dos positivos, respectivamente. Apesar do elevado número de animais apresentando essa alteração, a monocitopenia é considerada um achado insignificante no leucograma (THRALL, 2007).

Dos animais com monocitopenia, um apresentava eosinopenia associada (7,69%). Sousa (2006), Albernaz et al. (2007) e Borin et al. (2009) encontraram eosinopenia em 23,07% (3/13), 24,20% (53/219) e 58,1% (118/213), respectivamente. A eosinopenia é um achado importante na erliquiose canina, especialmente na fase aguda, porém seu mecanismo ainda não está bem elucidado. Acredita-se que haja lise intravascular de eosinófilos, sequestro reversível por órgãos do sistema monocítico fagocitário e migração para os tecidos (MENDONÇA, 2005; ALBERNAZ, 2007). Quando associado a linfopenia, é decorrente da liberação de corticosteroides e catecolaminas devido ao estresse provocado pela doença (MENDONÇA, 2005; SOUSA, 2006).

Quatro dos animais monocitopênicos também apresentavam linfopenia (30,77%). Mendonça et al. (2005), Sousa (2006) e Albernaz et al. (2007) encontraram resultados um pouco inferiores, com 22,02% (24/109), 23,07% (3/13) e 17,35% (38/219) animais positivos com a mesma alteração. A linfopenia aparece com a lise ou sequestro dos linfócitos pelos tecidos, principalmente o tecido linfoide (MENDONÇA, 2005).

Um dos animais positivos (7,69%) apresentava eosinofilia. Santarém (2003) e Albernaz et al. (2007) encontraram resultados inferiores, com 2,22% (1/45) e 3,65% (8/219) dos animais positivos com a mesma alteração. Já Sousa (2006) encontrou resultados superiores, com 15,38% (2/13) dos animais positivos com eosinofilia. O aumento da contagem de eosinófilos geralmente é observada em reações de hipersensibilidade, como em dermatite alérgica a picada de pulgas, e em animais com endoparasitas (THRALL, 2007).

Três animais eram leucopênicos (23,07%). Esse achado foi semelhante a Santarém (2003), Mendonça et al. (2005) e Borin et al. (2009), que encontraram, respectivamente, 24,44% (11/45), 24,77% (27/109) e 24,63% (50/203) animais positivos também apresentando leucopenia. Na erliquiose, a leucopenia durante a fase aguda pode acontecer com o sequestro e destruição dos leucócitos como resposta inflamatória a infecção de *E. canis*, que tende a desaparecer com o tempo (SANTARÉM, 2003).

Dois dos animais leucopênicos possuíam intensa trombocitopenia associada (15,38%), com contagens de plaquetas inferiores a 65.000, e um destes apresentava pancitopenia (7,69%). Sousa (2006) e Albernaz et al. (2007) encontraram resultados semelhantes, com pancitopenia em 7,69% (1/13) e 10,1% (22/219) animais positivos, respectivamente. A pancitopenia geralmente é encontrada na fase crônica da doença e pode ser causada pela destruição imunomediada das células circulantes ou devido a aplasia da medula óssea (ALBERNAZ, 2007; THRALL, 2007; GREENE, 2012). Na fase aguda pode acontecer pela destruição do sangue periférico, pois a medula óssea é hiper celular (SOUSA, 2006). Ao todo, quatro animais positivos apresentavam trombocitopenia (30,77%). Esse resultado foi inferior ao encontrado por Santarém (2003), Sousa (2006) e Meneses et al. (2008), nos quais 97,77% (44/45), 53,84% (7/13) e 60,0% (15/25) dos animais positivos eram trombocitopênicos. Porém, é importante salientar que nestes estudos os animais amostrados eram suspeitos de apresentarem

infecção por *Ehrlichia canis*. A trombocitopenia é um achado comum em todas as fases da erliquiose, diferindo apenas o mecanismo causador: na fase aguda a diminuição da contagem de plaquetas acontece pelo aumento do consumo ou sequestro esplênico delas; na fase crônica, há aplasia medular. Além disso, mecanismos inflamatórios e imunológicos também podem causar o consumo e a destruição das plaquetas (SOUSA, 2006; THRALL, 2007; XAVIER, 2009).

Apesar de a trombocitopenia ser um achado comum na erliquiose canina, foram encontrados 61,53% dos animais positivos (8/13) com a contagem de plaquetas dentro dos valores de referência, sendo que em três animais os valores estavam próximos ao limite inferior de 200.000/ μ l. Esse achado foi bastante superior ao encontrado por Bullaet al (2004), no qual 1,4% (1/71) dos animais positivos eram não-trombocitopênicos. Isso mostra que mesmo animais não trombocitopênicos podem ser positivos na PCR para erliquia (BULLA, 2004).

Dos treze animais positivos, um(7,69%) apresentava trombocitose. Esse resultado é semelhante ao encontrado em um estudo realizado por Sousa (2006), no qual um dos treze animais positivos na PCR para *Ehrlichia canis* apresentava trombocitose. Já Albernazet al. (2007) encontrou trombocitose em 1,82% (4/219) dos animais positivos para *Ehrlichia* spp. no esfregaço sanguíneo. Segundo um estudo experimental realizado por Xavier (2009), a trombocitose pode aparecer em cães infectados com *Ehrlichia* spp. até 15 semanas depois de serem infectados, variando com períodos de contagem plaquetária dentro dos valores de referência e períodos de trombocitopenia. Esse achado evidencia a capacidade de reposição medular.

Em 53,84% (7/13) dos animais positivos foi observada hiperproteinemia plasmática. Esse resultado foi superior aos encontrados por Santarém (2003) e Sousa (2006), pois observaram 11,11% (5/45) e 23,07% (3/13) animais positivos com hiperproteinemia em seus estudos. Meneses et al. (2008), diferentemente do que a literatura preconiza, não encontraram alterações na proteína plasmática nos animais positivos. Esse aumento da concentração da proteína plasmática é em decorrência do aumento da produção de gamaglobulinas, causado pelo estímulo antigênico da bactéria (VARELA, 2003; SANTARÉM, 2003). Muitas vezes, é acompanhada de hipoalbuminemia, desencadeada pela diminuição da ingestão proteica, pelo edema causado pela vasculite ou como mecanismo compensatório devido ao aumento da

viscosidade sanguínea provocado pela grande produção de globulinas (SANTARÉM, 2008).

6. CONCLUSÃO

Pode-se observar que a *Ehrlichia* spp. está presente em diversas regiões do Distrito Federal. Não foram encontrados animais positivos em Planaltina, mas é provável que esse resultado se deva a pequena quantidade de amostras colhidas em cada região.

As alterações hematológicas relevantes mais encontradas foram anemia microcítica e hiperproteinemia plasmática, sendo que o VG e a contagem de hemácias apresentaram diferença ($p < 0,05$) entre os animais positivos e negativos.

Como mais da metade dos animais positivos não apresentou alterações clínicas nem hematológicas características da erliquiose, como anemia ou trombocitopenia, pode-se concluir que estes se encontravam na fase subclínica da doença no momento da colheita do sangue.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. de. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. 2006. 95 f. Tese de doutorado (epidemiologia experimental e aplicada às zoonoses). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ALBERNAZ, A. P. et al. Erliquiose canina em Campo dos Goyatacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 199 – 806, out/dez. 2007.
- ALMOSNY, N. R. P. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Primeira edição. Ed. L.F. Livros de Veterinária Ltda. Rio de Janeiro. 2002. Cap. 01. P. 13 – 49.
- BORIN, S. CRIVELANTI, L. Z., FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol. 61, n. 3, Belo Horizonte. Junho, 2009.
- BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146, 2004.
- CARLOS, R. S. A. et al. Frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** Vol. 16. N. 3. Jaboticabal, julho/set. 2007.
- DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A. de; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. Semina: **Ci. Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p. 191-201, jul/dez. 2001.
- GREENE, C. E. *Ehrlichia* and *Anaplasma* Infections. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Fourth Edition. Ed. Saunders Elsevier. 2012. Cap. 26. P. 227 – 260.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. Ehrlichiae: *Ehrlichia*, *Cowdria* e *Neorickettsia*. **Microbiologia Veterinária**. Editora Guanabara Koogan S.A. 2003. Cap. 54. P. 276 – 280.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J. Clin. Microbiol.** vol. 38, n. 11, novembro, 2000.

ISOLA, J. G. M. P.; CADIOLI, F. A.; NAKAGE, A. P. Erliquiose Canina – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.** Ano IX, n. 18, periódico semestral, Janeiro de 2012a.

ISOLA, J. G. M. P.; CADIOLI, F. A.; NAKAGE, A. P. Importância da avaliação hematológica e sorológica no diagnóstico de erliquiose em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.** Ano IX, n. 18, periódico semestral, Janeiro de 2012b.

JAIN, N. C. Essentials of Veterinary Hematology. Lea &Febiger: Philadelphia, 1993.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics.** Vol. 4. N. 1. Spring, 2003.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, supl. 1, p. 53 – 57, 2004.

McBRIDE, J. W. et al. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.** 8: 441 – 447, 1996.

MENDONÇA, C. S; et. al. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Biosci. J.** Uberlândia, v. 21, n.1, p. 167 – 174, jan/abril 2005.

MENESES, I. D. S. et al. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Ver. Bras. Saúde Prod. An.** v. 9, n. 4, p. 770 – 776, out/dez, 2008.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Cienc. Rural.** vol.38 no.3. Santa Maria, maio/junho, 2008.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina Interna de Pequenos Animais. Cap. 96: Doenças Riquetsiais Polissêmicas, p. 1322 – 1335. Tradução da quarta edição. Elsevier Editora Ltda, 2010.

PRICE, J. E.; SAYER, P. D. Canine Ehrlichiosis. In (Ed) KIRK, R. W. **Current Veterinary Therapy VIII**. W. B. Saunders Co. Philadelphia. pp.1197-1202, 1983.

RAMOS, C. A. N. et al. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v.18, supl. 1, p. 58-62, dez. 2009.

SANTARÉM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos, hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis***. 2003. 130f. Tese de doutorado (clínica veterinária). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

SANTARÉM, V. A. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrlichiose. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 845 – 852, out/dez, 2008.

SOUSA, V. R. F. **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys***. 2006. 58f. Tese de doutorado (Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SPICKLER, A. R. **Ehrlichiosis**. May, 2005. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>>. Acesso em 19 de fevereiro de 2013.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Terceira Edição. Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro – RJ, 2007.

THRALL, M. A. Interpretação da resposta leucocitária nas doenças. **Hematologia e Bioquímica Veterinária**. Cap. 12. P. 127 – 140. Editora Roca, São Paulo, 2007.

VARELLA, A. S. Tick-born Ehrlichiae and Rickettsiae of dogs. In: BOWMAN, D. D. **Companion and Exotic Animal Parasitology**, 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em 17 de janeiro de 2013.

WANNER, T.; HARRUS, S. Ehrlichiosis monocíticas canina. In: **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**, CARMICHAEL, L. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca, New York. April, 2000.

XAVIER, M. S. et al. Avaliação da coagulação plasmática e plaquetometria em cães não infectados e infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol. 61, n. 5. Belo Horizonte, out. 2009.