



DÉBORAH DE OLIVEIRA FREITAS

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO E MOLECULAR DA
INFECÇÃO POR *Ehrlichia canis* EM CANINOS DE MINAS
GERAIS**

**LAVRAS - MG
2019**

DÉBORAH DE OLIVEIRA FREITAS

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Ehrlichia*
canis EM CANINOS DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária para a obtenção do título de Mestre.

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

Dr. Djeison Lutier Raymundo
Coorientador

Dra Angélica T. Barth Wouters
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Freitas, Déborah de Oliveira.

Diagnóstico patológico e molecular da infecção por *Ehrlichia canis* em caninos de Minas Gerais / Déborah de Oliveira Freitas. - 2019.

47 p. : il.

Orientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Coorientador(a): Djeison Lutier Raymundo, Angélica T. Barth Wouters.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Doenças infecciosas. 2. Erliquiose monocítica canina. 3. Ehrlichia canis. I. Varaschin, Mary Suzan. II. Raymundo, Djeison Lutier. III. Wouters, Angélica T. Barth. IV. Título.

DÉBORAH DE OLIVEIRA FREITAS

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Ehrlichia*
canis EM CANINOS DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de outubro de 2019

Dra. Mary Suzan Varaschin
Dra. Angélica T. Barth Wouters
Dra. Ana Paula Peconick
Dra. Bárbara Azevedo Pereira Torres

UFLA
UFLA
UFLA
FACICA

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

**LAVRAS-MG
2019**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu guia, minha força e por sempre abençoar meu caminho.

À minha mãe, pelo apoio incondicional, muitas vezes até mesmo sem entender o porquê de muitas coisas. Por confiar totalmente em minhas decisões. Por todo amor e desprendimento.

Ao meu pai (*in memoriam*), que mesmo sem estar presente fisicamente nesses últimos anos, está sempre me olhando lá de cima e me dando forças para seguir meu caminho.

Ao meu padrinho, por ser como um segundo pai, também me apoiando incondicionalmente e permitindo muitas vezes a realização de projetos que sozinha não conseguiria.

À minha vó, por todo amor e por me ensinar a ser forte e por sempre rezar por mim.

À Universidade Federal de Lavras, por fazer parte da minha história desde o ano de 2009. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Mary Suzan Varaschin, minha orientadora, por confiar em mim e nunca me deixar entrar em desespero quando as coisas não saem como esperado. Por realmente orientar e apoiar. Por todos os conhecimentos passados nesses últimos anos. Por ser exemplo como profissional e ser humano.

Aos demais professores da Patologia, Angélica T. B. Wouters, Djeison L. Raymundo e Flademir Wouters; é um privilégio aprender com vocês a cada dia. Por todo conhecimento a mim transmitido durante essa passagem pelo laboratório.

A Ana Paula Peconick, por me apresentar esse universo da biologia molecular. Por ter tido paciência de me ensinar sobre assuntos até então desconhecidos e me socorrer nos momentos de desespero, sempre transmitindo confiança e luz.

A todos os pós-graduandos do Setor de Patologia Veterinária desses últimos trinta meses, obrigada pela ajuda na execução deste trabalho e por terem tido paciência em ouvir tantas vezes meus momentos de angústia e choro. Em especial ao Matheus, que não mediu esforços para me ajudar. Por me ouvir, por sugerir novas ideias, pelos conselhos, por sempre estar disposto a me ajudar.

Aos estagiários do Setor, obrigada por toda a ajuda de vocês. Obrigada a cada um que se dispôs a auxiliar nas coletas e em cada processo do experimento.

A minha grande amiga Lorena, que dividiu comigo cada uma das angústias e frustrações desse período, que me ouviu, me aconselhou e também comemorou comigo cada conquista.

A toda equipe do Laboratório de Epidemiologia Molecular, por ter me aberto as portas do laboratório para a realização de parte do experimento. Em especial à professora Elaine, que literalmente foi a minha luz no fim do túnel nessa reta final. E à Dirceia, pela boa vontade e desprendimento em me ajudar, não tenho nem palavras.

Aos meus alunos da FACICA, mesmo sem saber vocês me inspiram a sempre fazer o melhor que posso!

A todos os meus amigos, que sempre estiveram dispostos a me ouvir, me apoiar e que me deram forças para não desanimar e seguir sempre em frente. São muitos (graças a Deus) e fica impossível citar o nome de cada um, mas sou imensamente grata a cada um de vocês!

À CAPES, pela bolsa de mestrado. À FAPEMIG, pelo apoio financeiro (CVZ-PPM 00763/16).

Muito obrigada!

RESUMO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Ehrlichia canis*, com sinais clínicos relacionados a aplasia de medula óssea e trombocitopenia. As lesões de necropsia são inespecíficas, podendo ocorrer hemorragias disseminadas, esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenomegalia. Microscopicamente, os achados dependem da fase clínica da doença, mas, frequentemente, ocorrem hemorragias multifocais, infiltrado linfoplasmocitário perivascular e vasculite em vários tecidos, baço com hiperplasia da polpa branca, pneumonia intersticial, glomerulonefrite membranosa e aplasia de medula óssea. O diagnóstico baseia-se nas manifestações clínicas, nas lesões de necropsia e no achado de inclusões riquetsiais em citoplasma de monócitos e linfócitos, as quais são raras e visualizadas somente na fase aguda da doença. Desta forma, o objetivo deste estudo foi descrever as principais lesões observadas na EMC, validar uma PCR em tecidos para o diagnóstico molecular da erliquiose canina e identificar a cepa de *E. canis* circulante em cães no Sul de Minas Gerais. Tecidos de quarenta caninos encaminhados para necropsia no Setor de Patologia Veterinária da UFLA foram submetidos a histopatologia e Nested-PCR. Destes, 28 apresentaram lesões compatíveis e PCR positivo para EMC e 12 animais diagnosticados com outras doenças foram negativos na PCR para EMC (controle negativo). Na PCR realizada em amostras de baço e rim, 14 cães (50%) foram positivos em ambos os órgãos, 16 (57,1%) positivos no baço e 26 caninos (92,8%) positivos no rim. As lesões macroscópicas mais frequentes na EMC foram edemas e hemorragias generalizadas, anemia e icterícia, lesões de insuficiência renal crônica (uremia), linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. Microscopicamente hemorragias e trombose multifocal, hemossiderose acentuada em baço, linfonodo e medula óssea, aplasia de medula óssea, nefrite intersticial linfoplasmocitária, glomerulonefrite membranosa e congestão acentuada com atrofia de cordões de hepatócitos foram os achados mais importantes. Necrose fibrinoide de paredes vasculares e vasculite foram observadas em cinco animais (17,8%). A sequência obtida de *E. canis*, quando comparada com as sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no GenkBank, obtiveram 95,9% de identidade com a cepa *E. canis* Jake (NC_007354.1) e 95,6% com a cepa Oklahoma (NR_118741.1). A nested-PCR associada às lesões se mostrou efetiva para o diagnóstico da EMC.

Palavras-chave: Nested-PCR. Erliquiose. Trombocitopenia. Hemorragias.

ABSTRACT

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is an infectious disease caused by the bacterium *Ehrlichia canis*, with clinical signs related to bone marrow aplasia and thrombocytopenia. Necropsy lesions are nonspecific and disseminated hemorrhages, splenomegaly, hepatomegaly and lymphadenomegaly may occur. The microscopic findings depends on the clinical phase of the disease, but often occur multifocal hemorrhages, perivascular lymphoplasmocytary infiltration and vasculitis in various tissues, spleen with white pulp hyperplasia, interstitial pneumonia, membranous glomerulonephritis and bone marrow aplasia. The diagnosis is based on clinical manifestations, necropsy lesions and the rickettsian inclusions in the cytoplasm of monocytes and lymphocytes, which are rare and visualized only in the acute phase of the disease. Thus, the aim of this study was to describe the main lesions observed in CME, validate a tissue PCR for the molecular diagnosis of canine ehrlichiosis and identify the circulating *E. canis* strain in dogs in southern of Minas Gerais, Brazil. Tissues from 40 canines referred for necropsy in the Veterinary Pathology Sector of UFLA were submitted to histopathology and Nested-PCR avaluation. Of these, 28 had compatible lesions and positive PCR for CME and 12 animals diagnosed with other diseases were negative in PCR for EMC (negative control). In the PCR performed on spleen and kidney samples, 14 dogs (50%) were positive in both organs, 16 (57,1%) positive in the spleen and 26 canines (92.8%) positive in the kidney. The CME most frequent macroscopic lesions were edema and generalized hemorrhages, anemia and jaundice, lesions of chronic renal failure (uremia), lymphadenomegaly, splenomegaly and hepatomegaly. Microscopically hemorrhages and multifocal thrombosis, severe hemosiderosis in the spleen, lymph node and bone marrow, bone marrow aplasia, interstitial lymphoplasmocyte nephritis, membranous glomerulonephrite and severe congestion with atrophy of hepatocytes were the most important findings. Fibrinoid necrosis and vasculitis were observed in five animals (17.8%). The sequence obtained from *E. canis* when compared with the sequences of fragments of genes available in GenkBank, obtained 95.9% identity with the *E. canis* strain Jake (NC_007354.1) and 95.6% with the Oklahoma strain (NR_118741.1). The nested PCR associated with the lesions was effective for the diagnosis of CME.

Keywords: Nested-PCR. Ehrlichiosis. Thrombocytopenia. hemorrhages.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Mórula de *Ehrlichia canis* em leucócitos de canino, obtidos por meio de esfregaço sanguíneo.....14

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figura 1 - Eletroforese dos produtos da nested-PCR utilizando o gene 16S ribossomal de *Ehrlichia canis*.....42

Figura 2 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 - Petéquias e equimoses em pele da região abdominal, inguinal e face medial da coxa.....42

Figura 3 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Petéquias subpleurais multifocais.....43

Figura 4 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Petéquias, equimoses e sufusões subepicárdicas multifocais.....43

Figura 5 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 25 – Equimoses e sufusões multifocais na mucosa de bexiga com coágulo sanguíneo na luz.....43

Figura 6 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 25 – Rins pálidos e com infarto.....44

Figura 7 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Hemorragia submeningeana difusa em hemisfério cerebral esquerdo.....44

Figura 8 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Jejuno com conteúdo sanguinolento...44

Figura 9 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Hemorragia pulmonar focalmente extensa. Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x.....45

Figura 10 – Erliquiose Monocítica Canina. Canino 11 - Glomerulonefrite membranosa plasmocitária. Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x.....45

Figura 11 – Erliquiose Monocítica Canina - Canino 11 – Esclerose Glomerular e infiltrado plasmocitário periglomerular. Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x.....46

Figura 12 - Erliquiose Monocítica Canina - Canino 7 –Rim com necrose fibrinoide da parede de artéria. Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.....46

Figura 13 - Erliquiose Monocítica Canina – Canino 7 – Hemorragia focalmente extensa em leptomeninges. Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x.....47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Frequências absoluta (Fa) e relativa (Fr) das principais lesões macroscópicas observadas em caninos positivos na nested-PCR para <i>Ehrlichia canis</i>	39
Quadro 2 - Frequências absoluta (Fa) e relativa (Fr) das hemorragias observadas em diversos tecidos de caninos positivos na nested-PCR para <i>Ehrlichia canis</i>	39
Quadro 3 – Frequências absoluta (Fa) e relativa (Fr) das principais lesões microscópicas observadas em caninos positivos na nested-PCR para <i>Ehrlichia canis</i>	40
Quadro 4 - Diagnóstico molecular e patológico de caninos necropsiados com suspeita de infecção por <i>Ehrlichia canis</i>	40
Quadro 5 - Diagnóstico patológico de caninos negativos na nested-PCR de baço e rim para <i>Ehrlichia canis</i>	41

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Etiopatogenia	13
2.2 Transmissão	14
2.3 Sinais clínicos	15
2.4 Alterações laboratoriais	16
2.5 Diagnóstico	17
2.5.1 Exame direto do esfregaço sanguíneo.....	18
2.5.2 Lesões de necropsia e histopatologia.....	18
2.5.3 Testes sorológicos.....	18
2.5.4 Diagnóstico Imuno-histoquímico.....	19
2.5.5 Diagnóstico molecular	19
2.6 Tratamento e controle	21
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
REFERÊNCIAS	22

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR <i>Ehrlichia canis</i> EM CANINOS DE MINAS GERAIS	29
RESUMO.....	29
INTRODUÇÃO	31
MATERIAIS E MÉTODOS	31
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Ehrlichia canis*, a qual é inoculada no cão através da picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* ou por transmissão mecânica através de agulhas, material cirúrgico contaminado e transfusões sanguíneas.

Clinicamente a doença é dividida em fase aguda, subaguda e crônica. Na fase aguda, o animal apresenta letargia, apatia, anorexia e febre. Na fase subaguda podem ocorrer apatia, hemorragias, edema de membros, anorexia e palidez das mucosas. A principal característica da fase crônica é a aplasia de medula óssea, resultando em anemia aplásica, com trombocitopenia, leucopenia com linfopenia e neutropenia, fator esse importante para infecções bacterianas secundárias. Além disso, na fase crônica podem ocorrer anorexia acentuada e perda de peso, emaciação, hemorragias multifocais, glomerulonefrite imunomediada e, conseqüentemente, insuficiência renal, poliartrite, sinais neurológicos e alterações oculares, como hifema, hemorragia sub-retinal, uveíte, descolamento de retina e cegueira.

As lesões de necropsia são inespecíficas, podendo ocorrer petéquias nas mucosas oral e conjuntival, hemorragias no subcutâneo, em serosas, mucosas do trato intestinal e da bexiga, na superfície cardíaca e no miocárdio e edema subcutâneo, principalmente nos membros. Há aumento de volume de linfonodos com hemorragias e/ou drenagem de sangue extravasado. O fígado e os rins podem apresentar hemorragias multifocais, o baço geralmente está discretamente aumentado de volume, os pulmões apresentam-se edematosos e com hemorragias focais associadas a septicemia. Ocasionalmente há também icterícia discreta a moderada e as lesões oculares descritas anteriormente.

O diagnóstico baseia-se nas manifestações clínicas, nas lesões de necropsia e no achado de inclusões riquetsiais no citoplasma de monócitos e linfócitos durante a fase aguda da doença. Pela dificuldade de diagnóstico da EMC, uma vez que as manifestações clínicas e os achados de necropsia são inespecíficos, surgiu a necessidade de se estudar esta doença no que diz respeito a associação entre sinais clínicos, lesões e diagnóstico molecular *post mortem*. Somado a isso, alguns autores têm atribuído a *E. canis* um possível envolvimento em infecções humanas na América do Sul, com alguns casos descritos na Venezuela (PEREZ et al., 1996), na Argentina (RIPOLI et al., 1999) e Brasil (CALIC et al., 2004), ressaltando a importância do estudo da patogenia desse agente.

Este estudo tem por objetivo descrever as principais lesões observadas na EMC. validar uma PCR em tecidos para o diagnóstico *post mortem* da infecção por *E. canis*, uma vez que, dificilmente, esse agente é visualizado em cortes histológicos e identificar a cepa de *E. canis* circulante em cães no Sul de Minas Gerais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

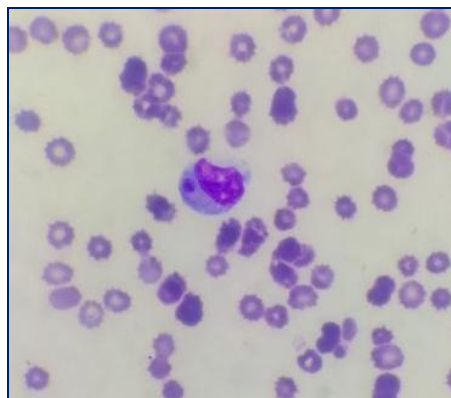
2.1 Etiopatogenia

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é causada por *E. canis*, uma pequena bactéria Gram-negativa cocoide pleomórfica, com localização intracitoplasmática em monócitos e macrófagos (HARRUS et al., 2012).

Seu genoma é constituído por um único cromossoma circular contendo 1.315.030 nucleotídeos (MAVROMATIS et al., 2006). *E. canis* se multiplica por fissão binária (durante o período de incubação, de 8 a 20 dias) no interior de células circulantes do sistema fagocítico mononuclear de canídeos, formando inclusões intracitoplasmáticas denominadas mórulas (Fig. 1). Estas saem dos leucócitos por exocitose ou por ruptura da membrana plasmática, indo parasitar novas células (SILVA, 2001). As mórulas são observadas nos leucócitos na fase aguda da infecção, por um curto período e em pequena quantidade (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Não existe predileção de idade ou sexo para a EMC (SOUZA et al., 2010). Entretanto, cães Pastor Alemão parecem ser mais suscetíveis do que outras raças (BORIN et al., 2009; UENO et al., 2009).

Figura 1 - Mórula de *Ehrlichia canis* em leucócitos de cães, em esfregaço sanguíneo.



Fonte: Arquivo pessoal

2.2 Transmissão

O principal vetor de *E. canis* é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, conhecido como carrapato marrom do cão, uma espécie cosmopolita amplamente encontrada no Brasil, assim como em outras áreas de clima tropical e subtropical (SHAW et al., 2001; BREMER et al., 2005). *R. sanguineus* é encontrado principalmente em áreas urbanas, ao longo do ano e, embora não muito comum, populações de *R. sanguineus* também são encontradas em áreas rurais (LABRUNA et al., 2001).

Estudos mais recentes sugerem o uso do termo “Grupo de *Rhipicephalus sanguineus*” uma vez que existem pelo menos 12 espécies estreitamente relacionadas morfológicamente (NAVA et al., 2015). As espécies denominadas “temperadas”, ocorrem no Brasil (somente no estado do Rio Grande do Sul), no Uruguai, na Argentina e no Chile e a denominada “tropical” tem sua ocorrência descrita no restante da América Latina, do México ao Brasil (MORAES-FILHO et al., 2011, NAVA et al., 2012). Em estudo conduzido por Moraes-Filho et al. (2015), utilizando *R. sanguineus* provenientes dos estados brasileiros Rio Grande do Sul e São Paulo, assim como dos países Argentina e Uruguai, somente os exemplares de *R. sanguineus* coletados em São Paulo (espécie tropical) foram vetores competentes para a transmissão de *E. canis*. Johnson et al. (1998) demonstraram experimentalmente que *Dermacentor variabilis* também é capaz de transmitir *E. canis* aos cães, apesar de não haver relatos sobre o papel de outras espécies de carrapatos na transmissão natural da erliquiose.

A transmissão de *E. canis* ocorre durante o parasitismo de canídeos por ninfas e/ou adultos de *R. sanguineus*. Como a transmissão de *E. canis* em carrapatos é transtadiária e não transovariana, as larvas de *R. sanguineus* não são importantes na transmissão, porém podem se infectar pelo agente e manter a infecção nos estágios de ninfa e adultos (BREMER et al., 2005). No carrapato, as erlíquias se disseminam a partir do intestino para os hemócitos e para as glândulas salivares. Durante a alimentação, os carrapatos inoculam a saliva contaminada com erlíquias no interior do sítio de alimentação no hospedeiro. Os carrapatos adultos sobrevivem 155 a 568 dias sem se alimentar e podem transmitir a infecção por até 155 dias após se tornarem infectados (DAGNONE et al., 2001). Embora a infecção natural nos cães ocorra principalmente durante o repasto sanguíneo de carrapatos infectados com *E. canis*, a transmissão também pode ocorrer por meio de transfusões sanguíneas de um cão infectado para outro suscetível (BORIN et al., 2009).

2.3 Sinais clínicos

Uma grande variedade de fatores pode influenciar o curso e o resultado da infecção por *E. canis* nos cães, incluindo o tamanho do inóculo, a patogenicidade das diferentes cepas e a coinfeção com outros patógenos, como *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon canis*, que são transmitidos pelo mesmo vetor (HARRUS; WANER, 2011).

As manifestações clínicas na EMC são inespecíficas (WANER; STRENGER; KESARY, 2000), sendo a doença caracterizada por manifestações clínicas multissistêmicas, que variam em intensidade de acordo com as fases da doença - aguda, subaguda (subclínica) ou crônica. A fase aguda da EMC dura uma a quatro semanas. Durante esse período, o microrganismo replica-se nas células mononucleares da circulação sanguínea e, posteriormente, infecta leucócitos mononucleares de órgãos como baço, fígado e linfonodos. Nesta fase ocorrem trombocitopenia (10 a 20 dias pós-infecção) e aumento no número de plaquetas imaturas circulantes, que persiste por toda a doença, na maioria dos animais. Clinicamente os cães apresentam febre alta, apatia, anorexia, vômito, corrimento oculonasal, linfadenomegalia, esplenomegalia, mucosas pálidas, tendência a hemorragias (petéquias e equimoses dérmicas, epistaxe, entre outras) (NAKAGHI et al., 2008; BORIN et al., 2009; HARRUS; WANER, 2011). Os cães podem apresentar alterações na cor ou na aparência dos olhos, ou desenvolver cegueira em consequência da hipertensão sistêmica, hifema, sangramento sub-retiniano e descolamento da retina. Uveíte anterior e doença da retina, como coriorretinite, hemorragia da retina, infiltrado perivascular retiniano e descolamento constituem as alterações oculares mais comuns na EMC (HARRUS et al., 2012). A maioria dos cães recupera-se da fase aguda da doença mediante tratamento adequado, porém os cães não tratados ou tratados inapropriadamente podem entrar numa fase subclínica, em que somente a contagem de plaquetas pode estar abaixo do normal (ORÍÁ et al., 2004).

A fase subclínica da infecção ocorre após seis a nove semanas da inoculação. Nesta fase, cães imunocompetentes podem eliminar o parasito e cessar a doença, ou apresentam-se clinicamente saudáveis (ganham peso e a febre cessa) (UENO et al., 2009), mas permanecem potenciais portadores por meses ou anos. Resultados de infecções experimentais indicam que durante a fase subclínica da EMC estruturas de *E. canis* encontram-se em maior quantidade no baço, sendo este o órgão a conter o parasito antes da sua eliminação. Além disso, nas infecções naturais é descrita a detecção de mórulas de aspirado esplênico do que de esfregaço do anel leucocitário do sangue periférico (HARRUS et al., 2012). É provável que o baço desempenhe um importante papel na patogenia e, conseqüentemente, na expressão clínica da doença. Foi constatado que cães com infecção experimental por *E. canis* e submetidos a

esplenectomia apresentam doença clínica leve em comparação com a doença mais grave observada em cães não esplenectomizados (HARRUS et al., 2012).

Por razões ainda não esclarecidas, certos cães progridem para a fase crônica da EMC. Os sinais clínicos desta fase são semelhantes aos observados na fase aguda, porém com maior gravidade (HARRUS; WANER, 2011). Nesta fase ocorre comprometimento grave da medula óssea, a produção de células sanguíneas fica prejudicada, resultando em pancitopenia (DAGNONE et al., 2001). Os cães acometidos podem eventualmente morrer por infecções secundárias ou sangramentos incontroláveis. Portanto, a identificação da EMC antes de entrar na fase crônica é muito importante para o prognóstico (HARRUS et al., 2012). Os cães podem apresentar tosse, sinais de conjuntivite, uveíte bilateral, hemorragia retinal, vômito, apatia (ALMOSNY; MASSARD, 2002), sinais neurológicos como ataxia, disfunção neuromotora, disfunção vestibular central ou periférica, hiperestesia localizada ou generalizada, anisocoria, sinais de disfunção cerebelar e tremores intensos (GREGORY; FORRESTER, 1990). Frequentemente ocorrem dermatopatias em cães infectados, decorrentes da imunodepressão acarretada pelo agente ou resultante de distúrbios sistêmicos e alterações imunomediadas (ALMOSNY; MASSARD, 2002).

2.4 Alterações laboratoriais

As alterações laboratoriais típicas da fase aguda incluem trombocitopenia, leucopenia e anemia leve. De acordo com Nelson e Couto (2006), a anemia nesta fase é do tipo normocítica normocrômica regenerativa, devida à perda de sangue. A trombocitopenia nesta fase pode ocorrer por aumento no consumo de plaquetas, aumento no sequestro esplênico e destruição imunomediada ou por diminuição da meia vida das plaquetas. A própria infecção por *E. canis* causa lise plaquetária, porém, podem ocorrer casos sem trombocitopenia. Ocorre também alteração na função das plaquetas, com muitos animais apresentando sangramento superficial, mesmo com o número de plaquetas e perfil de coagulação normais (ALMOSNY; MASSARD, 2002). Também pode ocorrer discreto aumento nos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

A fase subclínica da EMC é caracterizada por persistência variável de trombocitopenia, leucopenia e anemia, na ausência de sinais clínicos (BREITSCHWERDT, 2004).

Dentre as alterações hematológicas relatadas com maior frequência na fase crônica da EMC destaca-se a anemia arregenerativa. Das alterações no leucograma destacam-se desvio

nuclear de neutrófilos para a esquerda, trombocitopenia e eosinopenia. Outros achados, como leucopenia e monocitopenia, são considerados menos frequentes (BORIN et al., 2009).

Hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia são alterações bioquímicas séricas comuns na EMC, que podem ser observadas em todas as suas fases (HARRUS et al., 1996).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da EMC é difícil e complexo. Geralmente começa com a avaliação clínica do paciente, histórico de infestação por carrapatos e achado de trombocitopenia. A confirmação laboratorial do diagnóstico pode ser realizada por meio do exame parasitológico direto, cultivo, sorologia e técnicas de biologia molecular (DAGNONE et al., 2003). Para maximizar a probabilidade de se chegar ao diagnóstico, ensaios sorológicos e testes de biologia molecular devem ser realizados em conjunto com avaliação cuidadosa de esfregaços de sangue em qualquer paciente com suspeita de EMC. A cultura de células geralmente é reservada para laboratórios de pesquisa especializados (LITTLE, 2010).

O diagnóstico laboratorial de EMC tem sido rotineiramente realizado, pela identificação direta de estruturas morfolologicamente compatíveis com mórulas de *E. canis* em amostras de sangue periférico, aliada a exames hematológicos (NAKAGHI et al., 2008). Porém, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico laboratorial direto, tem sido utilizada a detecção molecular de *E. canis* (DAGNONE et al., 2003; BULLA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2005). Entretanto, na rotina clínica em animais de companhia, o diagnóstico ainda é firmado na associação entre os sinais clínicos e a ocorrência de trombocitopenia.

2.5.1 Exame direto em esfregaços sanguíneos

O exame direto em esfregaços sanguíneos de amostras de sangue periférico é específico, porém em muitos casos ineficaz, pois a detecção de mórulas de *E. canis* é difícil e infrequente (NAKAGHI et al., 2008). A detecção de mórulas nos leucócitos (monócitos e macrófagos) de *E. canis* é possível por um curto período (HARRUS; WANER, 2011) e elas são mais facilmente encontradas em cães experimentalmente infectados, em períodos de pico febril, na fase aguda da doença (ALMOSNY, 1998; SILVA, 2001). A sua visualização durante as fases subclínicas e crônicas é extremamente rara, conduzindo a resultados falsos negativos (OLIVEIRA et al., 2000; HARRUS; WANER, 2011).

A avaliação do esfregaço de sangue também é necessária para avaliar coinfeções com outros agentes patogênicos transmitidos por carrapatos, como *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon* sp. (GAL et al., 2007). No entanto, é importante ressaltar que a ausência do agente em esfregaços de sangue ou anel leucocitário não exclui a possibilidade de infecção (BORIN et al., 2009).

2.5.2 Lesões de necropsia e histopatologia

Os achados macroscópicos de cães com erliquiose incluem petéquias e equimoses nas serosas e mucosas da maioria dos órgãos, como cavidade nasal, pulmões, rins, bexiga urinária, trato gastrointestinal e tecido subcutâneo. Linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia são mais frequentes na fase aguda. Perda da condição corporal é um achado adicional em casos crônicos. A medula óssea é hiper celular e vermelha na fase aguda, mas na doença crônica torna-se pouco celular e pálida (NEER; HARRUS, 2006). Um dos achados histopatológicos mais característicos é o infiltrado perivascular de plasmócitos em vários órgãos. A intensidade do infiltrado inflamatório aumenta com a cronicidade (NEER; HARRUS, 2006). No baço observam-se hiperplasia reticuloendotelial na polpa vermelha, hiperplasia de folículos linfoides e aumento da atividade fagocítica, podendo ocorrer hemorragia moderada a severa (HARRUS et al., 1998). No sistema nervoso central há meningoencefalite multifocal não supurativa, envolvendo tronco encefálico, mesencéfalo e córtex cerebral. Nos pulmões observa-se pneumonia intersticial e, nos rins, glomerulonefrite, vasculite e infiltrado linfoplasmocitário no interstício, principalmente da junção corticomedular. Mórulas são pouco frequentes na histopatologia (NEER; HARRUS, 2006); a avaliação citológica de lâminas obtidas por impressão de pulmão, fígado, linfonodos e baço, coradas com Wright-Giemsa, é o meio mais efetivo de detectar mórulas desse agente em macrófagos (ZACHARY; McGAVIN, 2018).

2.5.3 Testes sorológicos

As bactérias do gênero *Ehrlichia* induzem resposta humoral específica, ocorrendo soroconversão algumas semanas após a infecção (OTRANTO et al., 2009).

Métodos sorológicos abrangendo ensaios de imunofluorescência (IFA), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e Western Blot (WB) são utilizados para a detecção de anticorpos contra *E. canis*, no entanto, não diferenciam infecções existentes de infecções anteriores já tratadas, limitando assim a confiabilidade no diagnóstico da doença (HARRUS et al., 2004). Uma vez infectados, os animais podem apresentar altos níveis de anticorpos

circulantes durante um longo período, podendo fornecer uma superestimação da frequência da doença quando realizado o diagnóstico por meio de testes sorológicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

Além disso, pode ocorrer reação cruzada com outras espécies de *Ehrlichia* (DAGNONE et al., 2001; WANER et al., 2001).

2.5.4 Diagnóstico Imuno-histoquímico (IHQ)

A técnica de IHQ tem sido utilizada como auxílio no diagnóstico da erliquiose em humanos causada por *E. chaffeensis* (DAWSON et al., 2001; PAVELITES; PRAHLOW, 2011). Nestes estudos foi utilizado como anticorpo primário soro hiperimune de cães experimentalmente infectados com *Ehrlichia canis*, uma vez que pode ocorrer reação cruzada com os antígenos de *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (DAWSON et al., 2001; PAVELITES; PRAHLOW, 2011). Os resultados demonstraram maior quantidade de mórulas em macrófagos do baço, do hilo de linfonodos e da medula óssea. A ocorrência de mórulas foi menor nos macrófagos pulmonares e nas células de Kupffer e foram raras nos rins e adrenais (DAWSON et al., 2001). Pavelites e Prahlow (2011) observaram mórulas de *Ehrlichia* em macrófagos em pulmão, baço, adrenal, fígado, timo, rim, tireoide e pele.

2.5.5 Diagnóstico molecular

Técnicas moleculares possuem maior sensibilidade e especificidade quando comparadas aos outros métodos de diagnóstico para a EMC e podem ser empregadas nas diferentes fases clínicas da doença (MYLONAKIS et al., 2003, NAKAGHI et al., 2008; HARRUS; WANER, 2011).

A técnica de amplificação do DNA a partir de amostras clínicas é importante para a detecção e a diferenciação das espécies de *Ehrlichia*, porque esses organismos crescem lentamente e em limitadas linhagens celulares e, ainda, há vários níveis de reação cruzada, limitando a diferenciação sorológica entre várias espécies. A PCR possui a vantagem de detectar o DNA erliquial nos primeiros dias após infecção e é bastante específica, desde que usados oligonucleotídeos que amplifiquem o DNA da espécie investigada (SUMNER et al., 1997). Utilizando PCR é possível isolar DNA e identificar *E. canis* a partir de amostras de sangue, baço, linfonodos, rins, fígado, medula óssea (GAL et al., 2008) e soro (MYLONAKIS et al., 2009). A PCR realizada em amostras de baço é considerada mais sensível quando comparada a amostras de sangue e medula óssea (HARRUS et al., 1998). A PCR utilizando

amostras de soro pode ser útil quando amostras de sangue total não estão disponíveis (MYLONAKIS et al., 2009).

A PCR combinada com a hibridização de DNA (PCR-CH) (MCBRIDE et al., 1996) e nested-PCR (WEN et al., 1997), cuja técnica envolve dois ensaios sucessivos de PCR, tem sido utilizada para melhorar a sensibilidade da PCR convencional para o diagnóstico molecular da infecção por *E. canis*. A nested-PCR é capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia* pela detecção de sequências genômicas do agente (ALVES et al., 2005). Esta pode ser utilizada para distinguir animais tratados com infecção persistente de animais tratados e curados, mas que apresentam altos níveis de anticorpos (NEER; HARRUS, 2006). Tem sido utilizada, com bons resultados, uma nested-PCR que tem como alvo sequências do gene da subunidade 16S do rRNA. Utiliza como primers os oligonucleotídeos 5'-AGACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' e 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' para a reação primária (pb 478) e 5'-CAA TTATTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3' e 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3' para a reação secundária (pb 398) (MURPHY et al., 1998). Também se descreve a utilização de uma PCR em tempo real (RT-PCR), seguida de um taqman probe correspondente à porção do gene *dsb* de *E. canis* (MORAES-FILHO et al., 2015). Cepas de *E. canis* de diferentes origens geográficas apresentam diferenças genotípicas, mas também similaridade com a sequência do RNA ribossomal 16S. Estas cepas foram isoladas e caracterizadas geneticamente como: “Flórida” (M73226), “Oklahoma” (M73221) e “Israelí” (U26740) (DAGNONE et al., 2001) e a Jake (AF403710) (AGUIAR et al., 2008).

A PCR e o sequenciamento são métodos sensíveis para detectar e caracterizar o DNA de *E. canis*. Resultados falsos positivos podem ocorrer com frequência relativamente baixa, quando contaminantes estão presentes ou quando ocorre amplificação não específica. Um resultado negativo da PCR indica que não foi detectado DNA alvo, mas não necessariamente prova que não havia DNA na amostra (resultado falso negativo) (STICH et al., 2002).

2.6 Tratamento e Controle

Vários fármacos efetivos estão disponíveis: tetraciclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, dipropionato de imidocarb e cloranfenicol (TILLEY; SMITH; FRANCIS, 2015). O dipropionato de imidocarb pode ser considerado eficaz no tratamento da erliquiose, principalmente em casos de coinfeção de duas ou mais erlíquias em cães ou com infecção concomitante por *Babesia* sp. (HARRUS et al., 1997a).

A doxiciclina é o antibiótico de eleição para o tratamento de erliquiose canina, independente da fase da doença que o hospedeiro esteja cursando. A dose de 10 mg/kg de peso corporal por dia, durante 28 dias, é recomendada pelo Consensus Statement from the Infectious Disease Study Group of the American College of Veterinary Internal Medicine (HARRUS et al., 2004)

Terapia de suporte, como fluidoterapia para animais desidratados, corticoides em quadros de trombocitopenia grave, transfusão sanguínea quando há alterações hematológicas graves e redutores da acidez estomacal (inibidores de H₂ ou inibidores da bomba de prótons), deve ser realizada de acordo com os sinais clínicos e necessidades de cada paciente (SILVA, 2015).

Para o controle de *Rhipicephalus sanguineus* pode se atuar diretamente no hospedeiro, onde estarão 5% dos carrapatos em um determinado instante, e/ou no ambiente, onde se encontram os 95% da população de carrapatos nesse mesmo instante. Se o objetivo é controlar a infestação nos cães, podendo até eliminá-la, o alvo principal do controle deve se voltar para os 95% da população que se encontram no ambiente, havendo duas formas de atingi-los. Uma é através de aplicações carrapaticidas diretamente no ambiente, viável para cães confinados em canis, casinhas, pequenos quintais ou interior de residências, onde toda a área pode ser devidamente tratada com produtos à base de piretroides. Os piretroides são os produtos de escolha para tratamento ambiental, por apresentarem maior poder residual. Sempre que possível, deve se optar por formulações com o ingrediente ativo na forma microencapsulada, que também garante maior poder residual (PAZ et al., 2001).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A erliquiose monocítica canina é uma doença de grande importância na clínica médica de animais de companhia devido à sua alta ocorrência em canídeos residentes em regiões endêmicas para o seu principal vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Apesar do tratamento ser simples e de apresentar um prognóstico favorável quando diagnosticada precocemente, os métodos de diagnóstico da EMC, disponíveis para o clínico veterinário, não são precisos, sendo realizado principalmente associando os sinais clínicos, histórico de infestação por carrapatos e a ocorrência de trombocitopenia. Além disso, as lesões de necropsia e histopatologia são somente indicativas da infecção, ressaltando desta forma, a necessidade da utilização de técnicas moleculares para o estabelecimento do diagnóstico

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. In vitro isolation and molecular characterization of na *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 489-493, 2008
- ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935). **Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) -UFRRJ, Seropédica, RJ. 1998.
- ALMOSNY, N.R.P; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais e como zoonose. *In*: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2002. p. 14-56.
- ALVES, L. M. et al. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira. Goiânia**, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.
- ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Canine ehrlichiosis – a review. **Revista Clínica Veterinária**, n. 19, p. 31-38, 1999.
- BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
- BOUZA-MORA, L. et al. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 36–40, 2017.
- BREITSCHERDT, E.B. Riquetsioses. *In*: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária. Doenças do Cão e do Gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.422-429.
- BREMER, W.G. et al. Transtadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 95-105, 2005.
- BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.
- CALIC, S.B. et al. Human ehrlichiosis in Brazil: First suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 259-262, 2004.
- COSTA, J.O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte - Brazil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**, v. 25, n. 2, p. 185-197, 1973.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 191-201, 2001.

DAGNONE, A.S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, Estados Unidos, v. 117, p. 285-290, 2003.

DAWSON, J. E. et al. Tissue diagnosis of *Ehrlichia chaffeensis* in patients with fatal ehrlichiosis by use of immunohistochemistry, *in situ* hybridization, and polymerase chain reaction. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 603–609, 2001.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 28, p. 408-409, 1935.

GAL, A. et al. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, p. 619–622, 2007.

GAL, A.; LOEB, E.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 212–217, 2008.

GREGORY, C.; FORRESTER, S. O. Ehrlichia canis, E. equi, E. risticii infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 404-414.

HARRUS, S. et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 66, p. 241–249, 1996.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis update. **Compendium for Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, p. 431–444, 1997a.

HARRUS, S. et al. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v. 141, p. 360-363, 1997b.

HARRUS, S. et al. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 15-27, 1998.

HARRUS, S. et al. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v.86, p. 361–368, 2002.

HARRUS, S. et al. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4488- 4490, 2004.

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

HARRUS, S.; WANNER, T.; NEER, M. Ehrlichia canis infection. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 4 ed., St. Louis, Elsevier, 1376 p., 2012.

- JOHNSON, E.M. et al. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 74, n.2-4, p. 277-88, 1998.
- LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001.
- LABRUNA, M.B. et al. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 553-556, 2001.
- LABRUNA, M.B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p.123-124, 2004.
- LABRUNA, M.B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.
- LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Veterinary Clinical of Small Animal**, v. 40, p.1121-1140, 2010.
- MACHADO, R.Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004. Supplement.
- MACHADO, R.Z. et al. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v.139, p.262-266, 2006.
- MACIEIRA, D.B. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.
- MAVROMATIS, K. et al. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4015-4023, 2006.
- McBRIDE, J.W. et al. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 441-447, 1996.
- MORAES-FILHO, J.M. et al., Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLOS One**. V. 28, p. 1-16, 2015.
- MORAES-FILHO, J.M. et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, p. 51-55. 2011.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American April**, p. 56-65, 1990.
- MURPHY, G.L. et al. A molecular and serological survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M.E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, London, v, 19, p. 197-204, 2003.

MYLONAKIS, M.E. et al. Evaluation of a serumbased PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**, v.138, p. 390–393, 2009.

NAKAGHI, A.C.H. et al. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.766-770, 2008.

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Lareille, 2806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 2-8. 2015.

NAVA, S. et al. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v.190, p. 547-555, 2012.

NELSON, R.W; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5. ed. São Paulo: Elsevier, 2015. 1512 p.

NEER, T.M.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection - Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* Infections). In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases in the Dog and Cat**. St. Louis: W.B. Saunders Company, 2006. v.3, p. 203-216.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p.10-13, n.33, 2004.

OLIVEIRA, D. et al. Detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados, através do “DOT-ELISA”. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.1, p.1-6, 2000.

OLIVEIRA, L.S. et al. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, Supl. 2, p. 55-56, 2009.

ORIÁ, A. P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J. L. Uveíte em cães infectados com *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v.34, p.1289-1295, 2004.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 157-163, 2009.

PAZ, G.F. et al. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) de cães. **Revista Brasileira de Patologia**. v. 37, suppl, p. 234, 2001.

PAVELITES, J. J.; PRAHLOW, J. A. Fatal human monocytic ehrlichiosis: a case study. **Forensic Science, Medicine and Pathology**. v. 7, p. 287-293. 2011.

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

RIPOLI, C.M. et al. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 350-354, 1999.

SANTOS, F., et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The veterinary Journal**, v. 179, p. 145-148, 2009.

SHAW, S.E. et al. Tickborne infectious diseases of dogs. **Trends Parasitology**, v. 17, p.74-80, 2001.

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

SILVA, A.B. et al. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana.[Asymptomatic human infection from contact with dogs. A case of human ehrlichiosis]. **Gaceta Médica de México**, v. 150, p. 171–174, 2014.

SILVA, I.P.M. Erliquiose canina – Revisão de Literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 13, n. 24, 2015.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, 336, 2016.

SOUZA, B.M.P.S. et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.

STICH, R.W. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 540–546. 2002.

SUMNER, J.W.; NICHOLSON, W.L.; MASSUNG, R.F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from groESL shock operon of *Ehrlichia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2087-2092, 1997.

TILLEY, L.P.; SMITH, J.; FRANCIS, W.K. **Consulta veterinária em 5 minutos**. 5. ed. Barueri: Manole, 2015. 1560 p.

UENO, T.E.H. et al. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em Hospital Veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

VIEIRA, R.F.C. et al. Erliquiose no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

WANER, T.; STRENGER, C.; KESARY, A. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 3, p. 240-244, 2000.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Veterinary**, v. 35, p. 1852-1855, 1997.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2013. 1408 p.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

(VERSÃO PRELIMINAR)

Escrito nas normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Qualis: A4

DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Ehrlichia canis* EM CANINOS DE MINAS GERAIS

**Déborah de Oliveira Freitas, Luisa Carolina Silva Silveira, Elaine Seles Dorneles,
Ana Paula Peconick, Flademir Wouters, Angélica T. B. Wouters, Djeison L.
Raymundo, Mary Suzan Varaschin**

ABSTRACT

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is an infectious disease caused by the bacterium *Ehrlichia canis*. Necropsy lesions are nonspecific and multifocal hemorrhages, splenomegaly and lymphadenomegaly may occur. The microscopic findings depends on the clinical phase of the disease, but often occur multifocal hemorrhages, perivascular lymphoplasmocytary infiltration and vasculitis in various tissues, spleen with white pulp hyperplasia, membranous glomerulonephritis and bone marrow aplasia. The diagnosis is based on clinical manifestations, tissues lesions and the Rickettsian inclusions in the cytoplasm of monocytes and lymphocytes, which are rare and visualized only in the acute phase of the disease. Thus, the aim of this study was to describe the main lesions observed in the CME, validate a tissue PCR for the molecular diagnosis of canine ehrlichiosis and identify the circulating *E. canis* strain in dogs in southern of Minas Gerais. Tissues from 40 canines referred for necropsy were submitted to histopathology and Nested-PCR evaluation. Of these, 28 had compatible lesions and positive PCR for CME and 12 animals diagnosed with other diseases were negative in PCR for EMC (negative control). The CME most frequent macroscopic lesions were edema and generalized hemorrhages, anemia and jaundice, uremia lesions, lymphadenomegaly, splenomegaly and hepatomegaly. Microscopically, there were hemorrhages and multifocal thrombosis, severe hemosiderosis in the spleen, bone marrow aplasia, lymphoplasmocytic interstitial nephritis and membranous glomerulonephrite. Fibrinoid necrosis of vascular walls and vasculitis were observed in five (17.8%) canines. In the PCR performed on spleen and kidney samples, 14 dogs (50%) were positive in both organs, 16 (57,1%) positive in the spleen and 26 canines (92.8%) positive in the kidney. The six sequenced samples obtained from *E. canis* showed 95.9% identity with the American strain Jake and 95.6% with the Oklahoma strain. The results demonstrate that the kidney is an organ of choice for the molecular diagnosis of CME in necropsied animals and that the microscopic lesions associated with the PCR results were efficient for the diagnosis.

Keywords: Nested-PCR. Ehrlichiosis. Thrombocytopenia. hemorrhages.

RESUMO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Ehrlichia canis*. As lesões macroscópicas são inespecíficas, podendo ocorrer hemorragias multifocais, esplenomegalia e linfadenomegalia. Microscopicamente os achados dependem da fase clínica da doença, mas frequentemente ocorrem hemorragias multifocais, infiltrado linfoplasmocitário perivascular e vasculite em vários tecidos, glomerulonefrite membranosa e aplasia de medula óssea. O diagnóstico baseia-se nas manifestações clínicas, nas lesões de necropsia e no achado de inclusões riquetsiais em citoplasma de monócitos e linfócitos, as quais são raras e visualizadas somente na fase aguda da doença. Desta forma, o objetivo deste estudo foi descrever as principais lesões observadas na EMC, validar uma PCR em tecidos para o diagnóstico molecular da erliquiose canina e identificar a cepa de *E. canis* circulante em cães no Sul de Minas Gerais. Tecidos de quarenta caninos encaminhados para necropsia foram submetidos a histopatologia e Nested-PCR. Destes, 28 apresentaram lesões compatíveis e PCR positivo para EMC e 12 animais diagnosticados com outras doenças foram negativos na PCR para EMC (controle

negativo). As lesões macroscópicas mais frequentes da EMC foram edemas e hemorragias generalizadas, anemia e icterícia, lesões de uremia, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. Microscopicamente hemorragias e trombose multifocais, hemossiderose acentuada em baço, aplasia de medula óssea, nefrite intersticial linfoplasmocitária e glomerulonefrite membranosa. Necrose fibrinoide de paredes vasculares e vasculite foram observadas em cinco (17,8%) caninos. Na PCR realizada em amostras de baço e rim, 14 cães (50%) foram positivos em ambos os órgãos, 16 (57,1%) positivos no baço e 26 caninos (92,8%) positivos no rim. As seis sequências obtidas de *E. canis*, obtiveram 95,9% de identidade com a cepa *E. canis* Jake (NC_007354.1) e 95,6% com a cepa Oklahoma (NR_118741.1). Os resultados demonstram que o rim é um órgão de eleição para o diagnóstico molecular da EMC em animais necropsiados e que as lesões histológicas associadas aos resultados da nested-PCR foram eficientes para o diagnóstico da EMC.

Palavras-chave: Nested-PCR. Erliquiose. Trombocitopenia. Hemorragias.

INTRODUÇÃO

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é causada por *Ehrlichia canis*, uma pequena bactéria Gram-negativa cocoide pleomórfica com localização intracitoplasmática em monócitos e macrófagos (Harrus et al., 2012). O principal vetor da EMC é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, conhecido como carrapato marrom do cão, uma espécie cosmopolita amplamente encontrada no Brasil, assim como em outras áreas de clima tropical e subtropical (Shaw et al., 2001; Bremer et al., 2005). *E. canis* se multiplica por fissão binária (durante o período de incubação de 8 a 20 dias) no interior de células circulantes do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado, formando inclusões intracitoplasmáticas denominadas mórulas. Estas saem dos leucócitos por exocitose ou por ruptura da membrana plasmática, indo parasitar novas células (Silva, 2001). As mórulas são observadas nos leucócitos na fase aguda da doença por um curto período e em pequena quantidade (Andereg & Passos, 1999, Oliveira et al., 2000; Tilley, Smith & Francis, 2003; Harrus & Waner, 2011), dificultando o diagnóstico.

Os sinais clínicos são inespecíficos, porém uma característica importante da erliquiose são as hemorragias decorrentes de trombocitopenia e disfunção na agregação plaquetária (Nakaghi et al., 2008; Borin et al., 2009; Harrus & Waner, 2011). As lesões de necropsia também são inespecíficas, sendo indicativas de erliquiose hemorragias disseminadas, esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenomegalia. Microscopicamente hemorragias multifocais, infiltrado linfoplasmocitário perivascular em vários tecidos, hiperplasia reticuloendotelial da polpa vermelha do baço, aumento de celularidade dos folículos de órgãos linfoides, pneumonia intersticial, glomerulonefrite membranosa e aplasia de medula óssea são os achados mais relevantes (Zachary & McGavin, 2018).

Em virtude da gravidade da EMC e do seu caráter endêmico em regiões tropicais e subtropicais, a detecção precoce da infecção é extremamente importante para o prognóstico (Harrus & Waner, 2011). Técnicas moleculares baseadas na detecção de porções do genoma de *E. canis* (Murphy et al., 1998, Marcilio, 2006, Moraes-Filho et al., 2015) têm sido empregadas para um diagnóstico mais preciso, como a nested-PCR, que tem como alvo sequências do gene da subunidade 16S do RNA ribossomosal de *E. canis* (Murphy et al., 1998). Alguns trabalhos apontam o baço como órgão superior ao sangue e medula óssea para detecção de *E. canis* por PCR em aspirados com agulha fina (Harrus et al., 1998, Mylonakis et al., 2004). O rim é pouco avaliado na técnica de PCR, porém, é sabido que EMC pode levar a insuficiência renal crônica devido a deposição de imunocomplexos contendo DNA do agente, (Unver et al., 2009, Crivellenti et al., 2015, Silva et al., 2016).

Este estudo tem por objetivo descrever as principais lesões observadas na EMC, validar uma PCR em tecidos para o diagnóstico molecular da *E. canis*, utilizando amostras de baço e rim, e identificar a similaridade da cepa de *E. canis* circulante no Sul de Minas Gerais com sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no GenBank.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA protocolo CEUA-UFLA 056-17).

Origem das amostras:

As amostras foram obtidas em coletas de tecidos de cães com suspeita de EMC encaminhados para necropsia no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras, provenientes de municípios do Sul de Minas Gerais longitude 46°61'33 oeste e latitude 21°74'15 sul). Para a coleta de tecidos foram considerados os cães cujo histórico clínico possuía informação sobre a suspeita de EMC por parte do médico veterinário clínico responsável (em tratamento ou não), exames laboratoriais compatíveis com a doença (anemia e trombocitopenia), além dos achados de necropsia sugestivos da doença (principalmente hemorragias).

Coleta de material para histopatologia e PCR

Para o exame histopatológico foram coletadas na necropsia amostras de medula óssea, linfonodos, baço, pulmão, rim, fígado, coração, encéfalo, pâncreas, estômago e intestinos. Essas amostras foram fixadas em formol a 10% tamponado com fosfatos, no pH 7,2, 0,01M. Após a fixação o material foi clivado, incluído em parafina, cortado a quatro micrômetros e corado pela técnica de hematoxilina e eosina (H.E.) para análise em microscopia ótica.

Amostras de baço e rim foram coletadas para PCR e armazenadas em microtubos a -20°.

Análise molecular

Para a obtenção do DNA foram separados 40 mg de tecido de cada amostra. A extração do DNA celular foi realizada pela técnica de lise por proteinase K (Wizard® Genomic DNA Purification Kit), conforme protocolo do fabricante. As concentrações (ng/μL) e a qualidade do DNA extraído foram determinados em espectrofotômetro *NanoVue™* plus e eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para detecção de *E. canis* foram sintetizados iniciadores para amplificação de sequências de fragmentos do gene da subunidade 16S do rRNA e utilizada a técnica de nested-PCR com os primers ECC 5'-AGACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' e ECB 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' para a reação primária (pb 478) e ECAN 5'-CAA TTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3' e HE 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT-3' para a reação secundária (pb 398) (Murphy et al., 1998).

Foram utilizadas as seguintes condições de reação: preparação de 20μl de solução contendo tampão para PCR 1x contendo 0,6mM de MgCl, 0,25UI de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 1,5mM de desoxirribonucleotídeo (dNTPs), 1,0 μl de cada oligonucleotídeo (primer) a 10μM e 2μl de DNA alvo extraído. Todas as PCR foram realizadas em termociclador (Heal Force T960 Thermal Cycler), tendo como ponto de partida o seguinte protocolo: as amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 1 minuto a 94° C, 1 minuto de anelamento a 60° C, 1 minuto de extensão a 72° C, com extensão final a 72° C por 5 minutos. A única modificação da reação primária para a secundária foi a temperatura de anelamento, que ocorreu durante um minuto a 55° C. Os produtos da PCR e um marcador de peso molecular (escala de 100 pb) foram submetidos à eletroforese por meio de um gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (Murphy et al., 1998).

Como controle branco, o DNA *template* foi substituído por água ultrapura *Milli-Q* e, como controle positivo, utilizou-se amostra de DNA extraído de *E. canis* mantida em cultivo celular e gentilmente cedida pela professora Dr^a Julia Angélica Gonçalves da Silveira, do laboratório de Protozoologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Para confirmar se o fragmento amplificado era de *E. canis*, seis amostras de fragmento de DNA amplificado, selecionadas ao acaso, foram submetidas ao sequenciamento por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. (Myleus Biotechnology®) e posterior análise *in silico*, utilizando-se o programa BlastN. As sequências foram comparadas com as sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no banco de dados do National Institute of Health (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS

Quarenta caninos com suspeita clínica de EMC, histórico de trombocitopenia foram necropsiados e submetidos à avaliação histopatológica. Destes, 28 apresentaram lesões compatíveis e nested-PCR positivo para EMC (Fig. 1) e 12 animais diagnosticados com outras doenças foram negativos na nested-PCR para EMC (controles negativos).

Lesões Macroscópicas

A principal lesão macroscópica observada em necropsia dos caninos (C) com erliquiose foram as hemorragias visualizadas em formas variadas; sangue nas narinas (C 13,16,17,21), petéquias na mucosa oral (C 17,23); petéquias, equimoses ou sufusões em pele da região abdominal (Figura 2) (C 5,11,19,24,25), inguinal (C 17) tecido subcutâneo (C 1,4,13,19,24,25,28) musculatura esquelética de membros (C 1,4,16,19,24,25,27) musculatura abdominal (C 16,24) e musculatura intercostal (C 7,8,14,19). Também foram visualizados hemoperitônio (C 7), petéquias e/ou equimoses em esôfago (C 23), pâncreas (C 4), região subpleural (Figura 3) (C 1,6,8,10,17,21,23,24,27,28), subepicárdica (Figura 4) (C 1,2,4,5,17,18,19,21,22,23,26) e no endocárdio (C 1,5,19); na serosa (C 1,4,5,13,24,26) e mucosa intestinal (C 1,3,4,5,6,11,15,23,24,26,28), serosa (C 5,11,14,23,26,28) e mucosa estomacal (C 1,5,14,17,21), serosa (C 5,23,28) e mucosa da bexiga (Figura 5)(C 3,5,6,8,11,13,14,23,24,25,26,28), nesta última, associadas a urina avermelhada (C 8,25) ou coágulo sanguíneo (Figura 5) (25). No córtex renal havia petéquias (C 1,6,8,17,21,24,27,28), sufusões (C 13,25), equimoses (C 14) e infartos focais ou multifocais (C 7, 17, 25) (Figura 6). Material de aspecto sanguinolento foi observado na vulva e havia petéquias no endométrio (C 21). No encéfalo havia congestão em vasos das leptomeninges (C 3,20), petéquias e/ou equimoses subpiais em telencéfalo (Figura 7) (C 5,7,23), tálamo (C 7), cerebelo (C 5), tronco cerebral (C 13) e medula

espinhal (C 23). Além disso havia sangue na luz intestinal misturado a conteúdo intestinal ou muco (Figura 8) (C 1,4,5,13,17,20,23). Os linfonodos estavam aumentados de volume (C 1,2,6,7,17,22,23,28) e avermelhados (C 4,5,6,17,19,22,23,28), no baço foram observados esplenomegalia (C 1,5,6,7,12,13,15,17,18,22,23,26,27,28), infartos em bordos (C 7,15,19,23) ou evidênciação de polpa branca (C 18,22). Em alguns caninos o baço encontrava-se reduzido de volume e com pouco sangue ao corte (C 3,4,6,8,17,19,25).

Infestação por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (C 6,12,13,21,22), edema subcutâneo moderado a acentuado, com extensão para a musculatura dos membros torácicos (C 1,6,8), membros pélvicos (C 6,21), abdômen (C 17,21), pescoço (C 6) e bolsa testicular (C 28); hidrotórax (C 1,3,8,14,17,18,21,22,23), hidroperitônio (C 4,5,16,17), hidropericárdio (C 4,5,13,19,23,28), edema pulmonar (C 1,3,6,7,8,10,13,14,17,18,19,20,22,23,24,25,26), atrofia muscular em membros pélvicos e torácicos (C 3), mucosas oral e conjuntival hipocoradas (C 3,4,7,11,14,16,17,18,19,20,21,23,24,25,28); icterícia discreta (C 5,6,12,14,17,23,26), moderada (C 1,24) ou acentuada (C 15,23,24). Foram também observadas lesões ulcerativas na região lateroventral da língua (C 1,6,21,28), erosões e ulcerações na mucosa gástrica (C 1,4,8,11,14,16,17,20, 21,23,26,27), sendo que em alguns animais havia odor amoniacal na mucosa estomacal (C 4,11); as tonsilas estavam aumentadas de volume e avermelhadas (C 1,6,22,39) com membrana branca-amarelada (necrose) na superfície (C 1,6);

O fígado estava vermelho-escuro (C 2,3,5,13,20), com aumento de volume (C 2,7,12,15,22,23,26,27,28) e evidênciação do padrão lobular (C 6,7,8,12,14,15,17,19,21,22,23,25,26). No canino 17 havia ruptura hepática com sangue coagulado na superfície capsular. Os rins estavam pálidos (C 4,6,11,12,19,25,26) ou vermelho-escuros (C 3,5,20) com superfície irregular (C 4,8), pontos esbraquiçados no córtex (C 12,13), estriações evidentes na medular (C 1,19) e pontos avermelhados (glomérulos) na cortical (C 11) e infartos (C 23). Também foram observadas alterações como endocardite valvular em mitral (C 2,5), exsudato purulento na narina direita (C 18) e flegmão (C 14).

Essas lesões podem ser observadas em ordem de maior frequência nos Quadros 1 e 2.

Lesões Microscópicas

As lesões microscópicas nos animais positivos na PCR foram:

Pele e subcutâneo. Trombose (C 19) e hemorragia multifocal acentuada em derme superficial e profunda (C 19,21,26,28); necrose multifocal (C 21,26) associada a colônias bacterianas (C 21,26,28), fibrina e fibroblastos reativos (C 28) foram observados nos membros. No cão 21 foi observada hemorragia extensa na região facial.

Língua: trombose (C 6) e área extensa de necrose envolvendo epitélio superficial e musculatura, com grande quantidade de colônias bacterianas (C 6,28);

Tonsilas: necrose focal ou multifocal com abundantes colônias bacterianas (C 6,17,22,26,27), associadas a hiperemia, edema e infiltrado inflamatório misto (C 26);

Timo: hemorragia multifocal com edema interlobular (C 6);

Pulmão: Congestão e edema acentuados (C 1,2,3,5,6,7,8,12,13,14,15,17,18,20,21,22,23,26,27,28); espessamento de septos alveolares (C 6,27) e infiltrado de macrófagos discreto a moderado na luz alveolar (C 1,6,10,22,26,27), carregados de hemossiderina (C 6,10); infiltrado de neutrófilos (C 1,18,26) associado a filetes de fibrina (C 1,6,14,24) e colônias bacterianas intralesionais (C 1); hemorragia pulmonar (Figura 9) (C 3,5,6,7,10,14,17,21,28) e trombose multifocal (C 5,6,17,18,19,21,22,27,28) e raras artérias com vasculite (C 7).

Coração: Hemorragias multifocais no miocárdio (C 5,11,21,26) e gordura epicárdica (C 17), trombose (C 19) e necrose fibrinoide da camada média de artérias do miocárdio (C 11), necrose de cardiomiócitos com focos de calcificação e fibrose (C 23), infiltrado linfocitário multifocal (C 22) ou composto por macrófagos e neutrófilos (C 23), além de endocardite valvular em mitral (C 1,2,23) com colônias bacterianas intralesionais (C 23).

Baço: congestão acentuada (C 1,2,3,22,26,28), hemorragias multifocais (C 3,6,23) com hemossiderose moderada a acentuada (C 1,2,3,6,8,11,12,14,17,22,23,26,27), trombose multifocal (C 3), infarto (C 7,15,23,28). vasculite (C 7) e hematopoiese extramedular (C 8,10,12,14,23,25,26); depleção de folículos linfóides com áreas de desaparecimento (C 13) ou hiperplasia de polpa branca com infiltrado multifocal de histiócitos (C 27).

Linfonodos: seios subcapsulares com abundante quantidade de hemácias (C 24), fibrina e trombos (C 21,24,28) sépticos associados a extensas áreas de hemorragia (C 21,24); grande quantidade de macrófagos nos seios medulares (C 1) hemossiderose moderada a acentuada (C 1,2,3,4,6,17,23,24,28), hemorragia focal ou multifocal (C 1,6,20), congestão (C 2) moderada (C 10,20,23), áreas de necrose com colônias bacterianas (C 27) e hiperplasia linfóide (C 3).

Medula Óssea: hemossiderose difusa moderada (C 2,12,17,28), depleção acentuada de todas as linhagens celulares (C 2,6,7,14,17,19,27,28), grande quantidade de precursores de leucócitos e hemácias (C 12,22), com colônias bacterianas cocobacilares (C 17).

Rim: Glomerulonefrite membranosa moderada a acentuada (Figura 10) (C 1,2,4,8,11,12,13,19,21,23,24,25,26) com infiltrado plasmocitário (C 11,19,24,26) ou linfoplasmocitário (C 25) periglomerular e esclerose glomerular moderada a acentuada (Figura 11) (C 2,4,11,12,19,21,23,25,26), nefrite intersticial linfoplasmocitária discreta (C 2,6,14,17,24,25), moderada (C 1,4,12,20,21,26,27,28) ou acentuada (C 13). Necrose tubular esparsa multifocal (C 5,6,7,8,12,15,17,22,23,25), associada a infarto (C 7,23,25), fibrose de interstício (C 2,3,11,13), calcificação multifocal de glomérulos (C 19,23), do epitélio tubular cortical (C 2,5) ou medular (C 7, 23,27), material eosinofílico homogêneo na luz tubular (C 11,12,13) e espaço glomerular (C 3,15,23), assim como, congestão acentuada (C 3,10,26), pigmento amarelo-esverdeado na luz (C 15,22) e no epitélio tubular (C 15). Também foi observada necrose fibrinoide de paredes arteriais (Figura 12) (C 7,19), associada a infiltrado de neutrófilos e linfócitos na parede (vasculite) (C 7). Alguns cães tinham trombose multifocal (C 7,19, 23) e hemorragias multifocais acentuadas (C 5,7,19,25) ou bactérias intravasculares (C 1,14,17).

Adrenal: trombose (C 19) e hemorragias multifocais (C 12,13,19,20,26), com de calcificação multifocal na medular (C 19).

Bexiga: Hemorragias multifocais em mucosa (C 5,8,28), submucosa (C 3,6,8,25,28) e serosa (C 5,28) e trombose em vasos da serosa (C 14), infiltrado linfoplasmocitário (C 2,26,27) com macrófagos (C 26), multifocal discreto em submucosa e infiltrado discreto de plasmócitos na muscular (C 24). **Próstata:** hemorragia e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário multifocal discreto (C 28).

Fígado: Congestão moderada a acentuada (C 1,2,3,5,6,7,11,12,13,14,18,20,23,26,27,28), com dilatação de sinusoides e atrofia de cordões de hepatócitos (C 1,3,5,11,12,13,14,28). Havia colestase discreta a acentuada (C 1,2,8,13,17,22,25) e esteatose discreta (C 1,2,8,11,12); infiltrado linfoplasmocitário periportal (C 6,8,21,25,26,27) e centrolobular (C 8) discretos, com necrose multifocal discreta de hepatócitos (C 6,19), predominantemente centrolobular (C 12,17,22,23) por vezes em ponte (C 17) associadas a colônias bacterianas intravasculares (C 17); Necrose fibrinoide de artérias (C 7, 19) associada a infiltrado linfoplasmocitário (C 7), hemorragias multifocais acentuadas (C 3) ou centrolobulares (C 22); hematopoiese extramedular (C 8,15) e macrófagos carregados de hemossiderina (C 3,23,26,27).

Pâncreas: trombose venosa (C 15), congestão e hemorragia multifocal (C 28).

Estômago: edema moderado (C 11) a acentuado (C 5) de submucosa; congestão acentuada (C 5), hemorragia transmural acentuada (C 1) ou multifocal na submucosa (C 26), assim como erosões ou (C 17,23) ulcerações (C 1,11), grande quantidade de bactérias intravasculares (C 1); necrose fibrinoide (C 11) e calcificação de paredes de artérias (C 1,11), além de leucocitoestase (C 13).

Intestinos: hemorragias multifocais (C 5) na mucosa (C 23), submucosa (C 11) e transmural no ID (C 26) e em mucosa e submucosa do IG (C 11), associadas a infiltrado linfoplasmocitário discreto na submucosa e muscular (C 26) e necrose fibrinoide acentuada na parede de arteríolas do ID e IG (C 11).

Encéfalo: hiperemia em leptomeninges (C 14,21), hemorragia difusa (C 5, 7) e moderado infiltrado predominantemente plasmocítico perivascular (C 14,21), com raros neutrófilos (C 21). No córtex havia necrose fibrinoide da parede de vasos, associada a infiltrado de linfócitos e neutrófilos (C 7,13), assim como hemorragias multifocais no neurópilo (C 7,13,16,23), ou restritas ao cerebelo (C 8) e tronco cerebral

(C 3,16). No córtex havia necrose multifocal (C 14,23) e colônias bacterianas cercadas por discreto a moderado infiltrado de neutrófilos (C 14,16, 23), além de trombose (C 5,13).

Medula espinhal: congestão (C 3,14,20) necrose (C 23) e hemorragia multifocal (C 14, 23), associadas a infiltrado neutrofilico (C 23).

As principais lesões microscópicas estão demonstradas no quadro 3 (me manda por wahts up para eu ver ou pode me mostrar no domingo). A infecção por *E. canis* ocorreu associada a outras alterações, demonstradas no Quadro 4.

As doenças diagnosticadas nos caninos negativos na PCR para *E. canis* estão demonstrados no Quadro 5.

Análise Molecular

A nested-PCR foi realizada em amostras de baço e rim dos 40 caninos necropsiados. Todos os 28 animais com lesões compatíveis foram positivos na nested-PCR para EMC (Figura 1). Desses, 14 (50%) foram positivos em ambos os órgãos; 16 (57,1%) positivos no baço e 26 caninos (92,8%) positivos no rim. O resultado dos tecidos positivos na PCR para *Ehrlichia canis*, assim como a sua relação com o diagnóstico final estão demonstrados no Quadro 1.

A sequência de *E. canis* obtida, quando comparada com as sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no GenkBank, obtiveram 95,9% de identidade com a cepa *E. canis* Jake (NC_007354.1) e 95,6% com a cepa Oklahoma (NR_118741.1).

DISCUSSÃO

As lesões observadas nos caninos com EMC foram associadas principalmente à fase subclínica a crônica da doença. Macroscopicamente eram caracterizadas por edemas e hemorragias em tecidos diversos, esplenomegalia, linfadenomegalia e hepatomegalia e, microscopicamente, por trombose multifocal, hemossiderose acentuada, glomerulonefrite membranosa, com esclerose glomerular, infiltrado linfoplasmocitário ou plasmocitário multifocal, além de necrose fibrinoide em parede de artérias, associadas ou não a vasculite, esta última observada em 17,8% dos caninos.

A inflamação crônica predominantemente plasmocitária e a diminuição da eritropoiese são apontadas como a causa da falência de vários órgãos na erliquiose, incluindo a insuficiência renal (Rikihisa 1991, Iqbal & Rikihisa 1994b, Almosny 2002). Somadas a isso, as hemorragias em tecidos diversos, são justificadas pela trombocitopenia e aplasia de medula causada por *E. canis* (Harrus & Waner, 2011).

O microrganismo multiplica-se dentro das células mononucleares circulantes de tecidos fagocitários mononucleares de órgãos como baço, fígado e linfonodos, levando a linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular em fígado e baço. As células infectadas são transportadas pelo sangue para outros órgãos do corpo, especialmente pulmões, rins e meninges e aderem-se ao endotélio vascular, induzindo vasculite e infecção tecidual subendotelial (Almosny, 2002; Ettinger e Feldman, 2004), que provavelmente são responsáveis pela trombose e juntamente com a lesão renal crônica pelos edemas multifocais, como observado neste estudo.

Dos 28 cães, em 26 (92,8%) o rim foi positivo para *E. canis* na nested-PCR, justificável pela provável cronicidade da doença nos animais encaminhados para necropsia, sendo que, 13 cães (50%) tiveram glomerulonefrite membranosa plasmocitária. A EMC pode levar a insuficiência renal crônica devido a deposição de imunocomplexos contendo DNA do agente, apesar de poucos trabalhos terem avaliado as lesões renais durante essa fase da doença (Unver et al., 2009, Crivellenti et al., 2015, Silva et al., 2016). São descritos espessamento da membrana basal, proliferação mesangial, glomeruloesclerose segmentar focal e sinéquia (Crivellenti et al., 2015).

Neste estudo foram demonstradas lesões de insuficiência renal (uremia) em 14 cães, com ulcerações em língua, erosões e úlceras estomacais, além de odor amoniacal na mucosa. Esses achados reforçam a importância da escolha do rim para o diagnóstico molecular da EMC. Silva et al. (2016), descreve que nos animais avaliados com EMC não ocorreu manifestação clínica de insuficiência renal, apesar de apresentarem lesão glomerular mais membranoproliferativa do que proliferativa, associadas a nefrite intersticial linfoplasmocitária.

Seis caninos apresentaram lesões de septicemia, caracterizadas por colônias bacterianas em

vários tecidos, incluindo endocardite valvular. A principal característica da fase crônica é o aparecimento de aplasia medular, levando a anemia aplásica, monocitopenia, linfopenia e neutropenia (GREGORY et al., 1990), com sinais clínicos de apatia, caquexia e com suscetibilidade aumentada a infecções secundárias, em consequência do comprometimento imunológico (Nelson, 2015). Em sete caninos a infecção por *E. canis* ocorreu associada a outras doenças imunodebilitantes, as quais podem ter favorecido a EMC, sendo que, um canino apresentou concomitantemente formas amastigota de *Leishmania sp.*, não sendo possível determinar entre elas qual foi a causa mortis.

Por outro lado, na fase aguda da doença é possível a identificação do agente em células monocíticas do sangue, apesar de pouco frequente (Harrus & Waner, 2011; Silva, 2001), o que não foi possível comprovar neste estudo. Nos animais estudados 57,1% tiveram o baço positivo na PCR para *E. canis*. Isso pode ser justificado pela fase da doença em que os animais estavam quando encaminhados para necropsia. Durante a fase subclínica e crônica da EMC a sensibilidade da PCR em amostras de sangue pode diminuir devida à pequena quantidade do agente (Aguirre et al., 2004). Resultados de aspirados de baço não foram melhores que amostras sanguíneas para a detecção precoce de DNA erliquial (Harrus et al. 2004). Porém outros estudos destacam que o baço foi superior ao sangue e medula óssea para detecção de *E. canis* por PCR em aspirados com agulha fina de cães infectados experimentalmente e no estágio subclínico da erliquiose (Harrus et al., 1998, Mylonakis et al., 2004).

Os resultados deste trabalho apontam o rim como tecido de escolha para o diagnóstico de EMC em cães submetidos à necropsia, em comparação a baço, tanto pelos resultados obtidos na PCR como pela frequência de lesões. Iqbal & Rikihisa (1994) demonstraram, em amostras de tecido colhidas imediatamente após a eutanásia de três cães experimentalmente infectados com *E. canis* e que permaneceram portadores após o tratamento com doxiciclina, que o DNA de *E. canis* estava presente em sangue, fígado, baço, linfonodos e rins, porém foram utilizados conjuntos de pares de primers diferentes do presente estudo. Segundo Gal et al. (2008), coágulos sanguíneos e linfonodos foram os espécimes em cadáveres de cães com maior número de resultados positivos na PCR. O baço e o fígado foram positivos apenas em uma pequena proporção dos cães e a medula óssea foi negativa em todos os animais testados. A comparação entre esses estudos é difícil, devido às diferenças entre infecção natural e experimental, diferentes estágios da doença, metodologias de amostragem, natureza dos tecidos avaliados e obtenção de espécimes *ante mortem* vs. *post mortem*. Por outro lado, não há trabalhos que comparem a positividade para *E. canis* entre o baço e o rim, conforme descrito neste trabalho.

CONCLUSÃO

A nested-PCR realizada em tecidos para a identificação do gene da subunidade 16S ribossomal utilizando os primers preconizados por Murphy et al. (1998) foi eficaz para o diagnóstico *post mortem* da EMC.

Os resultados demonstraram que amostras de rim são eficientes para o diagnóstico molecular em animais necropsiados e com suspeita de EMC. Alterações de insuficiência renal crônica de etiologia variada foram as lesões com maiores semelhanças aos casos de infecção por *E. canis*, reforçando a necessidade do diagnóstico molecular da infecção por *E. canis* neste tecido.

REFERÊNCIAS

- Aguirre, E.; Sainz, A.; Dunnerb, S.; Amusataguia, I.; López, L.; Rodríguez-Franco, F.; Luacesc, I.; Cortés, O. & Tesourod, M. A. First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Spain. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.125, p. 365-372, 2004.
- Almosny, N.R.P. & Massard, C.L. Erliquiose em pequenos animais e como zoonose. In: Almosny, N. R. P. Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses. Rio de Janeiro: L.F. Livros Ltda., 2002. p. 14-56.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- Andereg, P.I. & Passos, L.M.F. Canine ehrlichiosis – a review. Revista Clínica Veterinária, n. 19, p. 31-38, 1999.

Borin, S.; Crivellenti, L.Z.&Ferreira, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.

Breitscherdt, E.B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. Doenças do Cão e do Gato. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2004, p.422-429.

Bremer, W.G., Schaefer, J.J., Wagner, E. R., Ewing, S.A., Rikihisa, Y., Needham, G. R., Jittapalapong, S., Moore, D.L. & Roger W. Stich. Transtadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. Veterinary Parasitology, v. 131, n. 1-2, p. 95-105, 2005.

Crivellenti L.Z., Silva G.E.B., Borin-Crivellenti S., Dantas M., Adin C.A., Cianciolo R. & Santana A.E. 2015. Glomerulopathies in dogs with erlichiosis –preliminary results. 40th World Small Animal Veterinary Association – WSAVA, Bangkok, Tailândia, p.76. (Resumo)

Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. The Veterinary Journal, 175: 212–217, 2008.

Gregory, C.&Forrester, S.O. Ehrlichia canis, E. equi, E. risticii infections. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 404-414.

Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M.& Bark, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months afterinfection with Ehrlichia canis. Journal of Clinical Microbiology 36: 73–76, 1998.

Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T. & Shaw, S. 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48: 4488–4490.

Harrus, S.& Waner, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. The Veterinary Journal, v. 187, p. 292–296, 2011.

Harrus, S.; Waner, T.& Neer, M. *Ehrlichia canis* infection. In: Greene, C. E. Infectious Diseases of the dog and cat. 4 ed., St. Louis, Elsevier, 1376 p., 2012.

Iqbal, Z.& Rikihisa, Y., 1994. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. Veterinary Microbiology 42: 281–287.

Iqbal, Z.& Rikihisa, Y. 1994b.Reisolation of *Ehrlichia canis* from Blood and Tissues of Dogs after Doxycycline Treatment. Journal of Clinical Microbiology, Washington, 32(7): 1644-1649.

Macedo, E.A. Ultraestrutura de células parasitadas por *Ehrlichia* spp., métodos diagnósticos e histopatologia em órgãos de cães com erliquiose da micro-região de Uberlândia-MG. Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia –UFU. 2007.

Marsilif, O, DI Martino, B., Meridiani, I. & Bianciardi P. Direct identification of *Ehrlichia canis* by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (gltA) gene from various Italian strains. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, n. 18, p. 215-217, 2006.

Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D., Leontides, L.S.& Kontos, V.S., Chronic canineehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 naturalcases. Journal of the American Animal Hospital Association 40, p. 174–184, 2004.

Murphy, G.L, Ewing, S.A., Whitworth, L.C., Fox, J. C. & Kocan, .A.A. 1998. A molecular and serological survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. Veterinary Parasitology. 79: 325-339.

Nakaghi, A.C.H., Machado R.Z.; Costa, M.T.; André, M.R. & Baldani, C.D. 2008. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. Ciência Rural. 38(3): 766-770.

- Nelson, R.W. & Couto, C.G. Medicina Interna de Pequenos Animais. 5. ed. São Paulo: Elsevier, 2015. 1512 p.
- Oliveira, D.; Nishimori, C.T.; Tinucci-Costa, M.; Machado, R.Z. & Castro, M.B. 2000. Detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados, através do "DOT-ELISA". Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 9(1): 1-6.
- Rikihisa, Y. 1991. The tribe Ehrlichiae and Ehrlichial Diseases. Clinical Microbiology Reviews, Washington, 4(3): 286-308.
- Silva, V.L.D. Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose Canina: estudo experimental. 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- Silva L.S., Pinho F.A., Prianti M.G., Braga J.F.V., Pires L.V., França S.A. & Silva S.M.M.S. 2016. Renal histopathological changes in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. Braz J Vet Pathol. 9(1): 2 – 15.
- Souza, B.M.P.S.; Leal, D.C.; Barboza, D.C.P.M.; Uzêda, R.S.; Alcântara, A.C.; Ferreira, F.; Labruna, M.B.; Gondim, L F.P. & Franke, C.R.. 2010. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 19(2): 89-93.
- Tilley, L.P.; Smith, J. & Francis, W.K. Consulta veterinária em 5 minutos. 5. ed. Barueri: Manole, 2015. 1560p.
- Ueno, T.E.H.; Aguiar, D.M.; Pacheco, R.C.; Richtzenhain, L.J.; Ribeiro, M.G.; Paes, A.C.; Megid, J. & Labruna, M.B.. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em Hospital Veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.
- Zachary, J. F. & McGavin, M. D. Bases da Patologia em Veterinária. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2018. 1408p.

QUADROS E FIGURAS

Quadro 1. Frequências absoluta (Fa) e relativa (Fr) das principais lesões macroscópicas observadas em caninos positivos na nested-PCR para *Ehrlichia canis*

Lesão	Fa	Fr
Hemorragias	25	89%
Edemas	24	85%
Esplenomegalia	14	50%
Erosões/ulcerações em mucosa gástrica	12	43%
Mucosas hipocoradas	15	33%
Linfadenomegalia	8	28%
Rins pálidos	7	25%
Baço exangue	7	25%
Infestação por carrapatos	5	17%
Infarto renal	3	10%

Quadro 2. Frequências absoluta (Fa) e relativa (Fr) das hemorragias observadas em diversos tecidos de caninos positivos na nested-PCR para *Ehrlichia canis*

Hemorragias	Fa	Fr
Mucosa bexiga	12	42%
Musculatura	11	39%
Córtex renal	11	39%
Subepicárdica	11	39%
Mucosa intestinal	11	39%
Subpleural	10	35%
Subcutâneo	7	25%
Conteúdo intestinal	7	25%
Pele	6	21%
Serosa estomacal	6	21%
Serosa intestinal	6	21%
Mucosa estomacal	5	17%
Narinas	4	16%
Encéfalo	4	16%

Serosa bexiga	3	10%
Mucosa oral	2	8%

Quadro 3. Frequências absoluta (Fa) e relativa (Fr) das principais lesões microscópicas observadas em caninos positivos na nested-PCR para *Ehrlichia canis*

Lesão	Fa	Fr
Hemorragias multifocais	24	85%
Edema pulmonar	20	70%
Nefrite intersticial	15	53%
Trombose	14	50%
Glomerulonefrite membranosa	13	46%
Esclerose glomerular	9	32%
Depleção de medula óssea	8	28%

Quadro 4. Diagnóstico molecular e patológico de caninos necropsiados com suspeita de infecção por *Ehrlichia canis*

Canino	PCR Baço	PCR Rim	Diagnóstico Patológico
1	Positivo	Positivo	IRC/ <i>E. canis</i>
2	Positivo	Positivo	Insuficiência renal crônica/endocardite/ <i>E. canis</i>
3	Negativo	Positivo	Neuropatia degenerativa/ <i>E. canis</i>
4	Negativo	Positivo	Insuficiência Renal Crônica/ <i>E. canis</i>
5	Positivo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
6	Positivo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
7	Positivo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
8	Positivo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
9	Negativo	Positivo	Linfoma multicêntrico/ <i>E. canis</i>
10	Negativo	Positivo	Carcinoma anaplásico de mama/ <i>E. canis</i>
11	Negativo	Positivo	IRC/Compatível com <i>E. canis</i>
12	Positivo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
13	Positivo	Positivo	IRC/Compatível com <i>E. canis</i>
14	Positivo	Positivo	Aplasia medula/sepsse/ <i>E. canis</i>

15	Positivo	Positivo	Aflatoxicose/ <i>E. canis</i>
16	Negativo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
17	Positivo	Negativo	Septicemia/ <i>E. canis</i>
18	Positivo	Positivo	Pneumonia bacteriana/ <i>E. canis</i>
19	Negativo	Positivo	IRC/Compatível com <i>E. canis</i>
20	Negativo	Positivo	Hemangiossarcoma esplênico/ <i>E. canis</i>
21	Positivo	Positivo	IRC/Compatível com <i>E. canis</i>
22	Positivo	Negativo	Doença hemolítica/ <i>E. canis</i>
23	Positivo	Positivo	Leishmaniose/ <i>E. canis</i>
24	Negativo	Positivo	IRC/Compatível com <i>E. canis</i>
25	Negativo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
26	Positivo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
27	Negativo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>
28	Negativo	Positivo	Compatível com <i>E. canis</i>

Quadro 5. Diagnóstico patológico de caninos negativos na nested-PCR de baço e rim para *Ehrlichia canis*

Canino	Diagnóstico Patológico
29	Sepse/ <i>Babesia canis vogeli</i>
30	Broncopneumonia bacteriana
31	Parvovirose
32	Pneumonia por falsa via
33	Insuficiência renal crônica
34	Insuficiência renal crônica
35	Intermação/choque
36	Insuficiência renal crônica
37	Insuficiência renal crônica
38	Sem diagnóstico
39	Hepatopatia necrosante
40	Insuficiência cardíaca congestiva esquerda

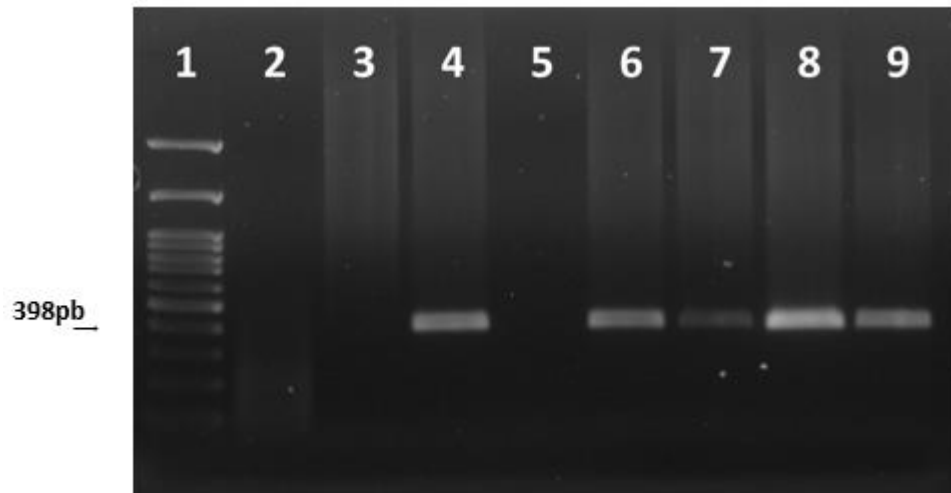


Fig.1. Eletroforese dos produtos da nested-PCR utilizando o gene 16S ribossomal de *Ehrlichia canis* (398pb), em gel agarose a 1% corado com brometo de etídio. Detecção do DNA extraído de rim mostrando marcador de peso molecular 100pb (1), controle branco (2), controle positivo (4), animais negativos (3, 5), animais positivos (6, 7, 8, 9).



Fig.2. Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 - Petéquias e equimoses em pele da região abdominal, inguinal e face medial da coxa



Fig.3. - Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Petéquias subpleurais multifocais.

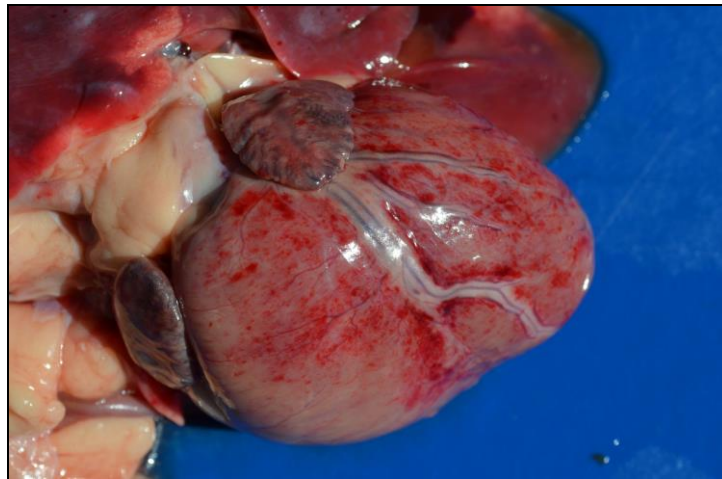


Fig.4. Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Petéquias, equimoses e sufusões subepicárdicas multifocais.



Fig.5. Erliquiose Monocítica Canina. Canino 25 – Equimoses e sufusões multifocais na mucosa de bexiga com coágulo sanguíneo na luz.



Fig.6. Erliquiose Monocítica Canina. Canino 25 – Rins pálidos e com infarto.



Fig.7. Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Hemorragia submeningeana difusa em hemisfério cerebral esquerdo.

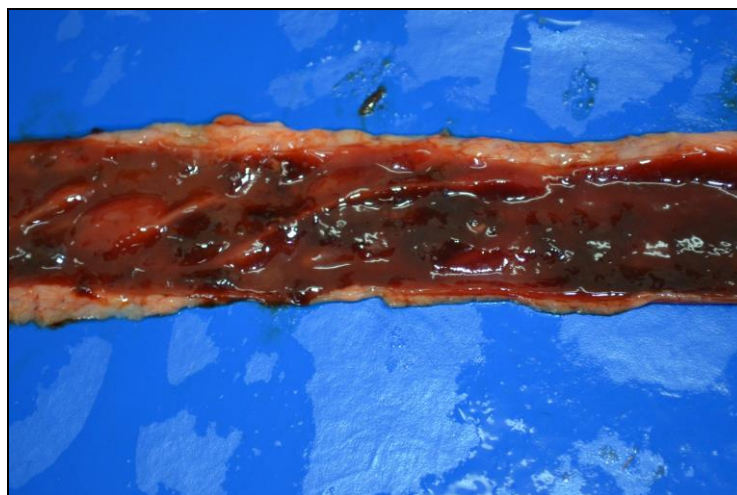


Fig.8. Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Jejunum com conteúdo sanguinolento.

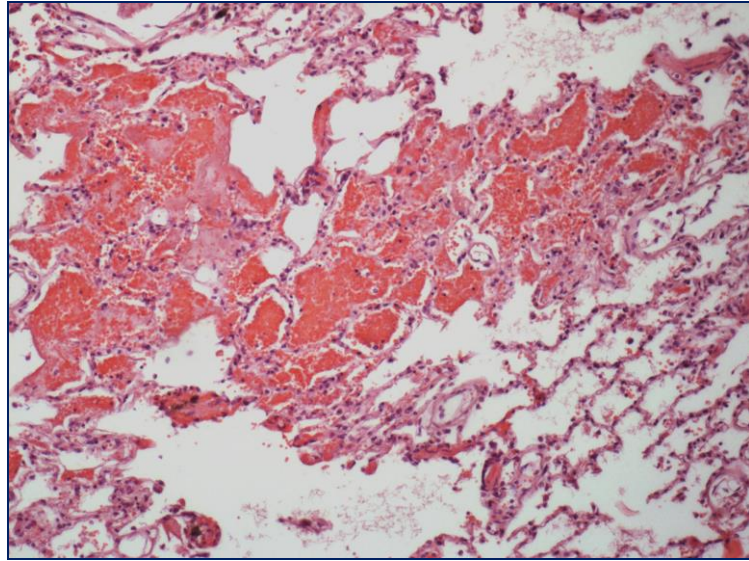


Fig.9. Erliquiose Monocítica Canina. Canino 5 – Hemorragia pulmonar focalmente extensa.
Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x

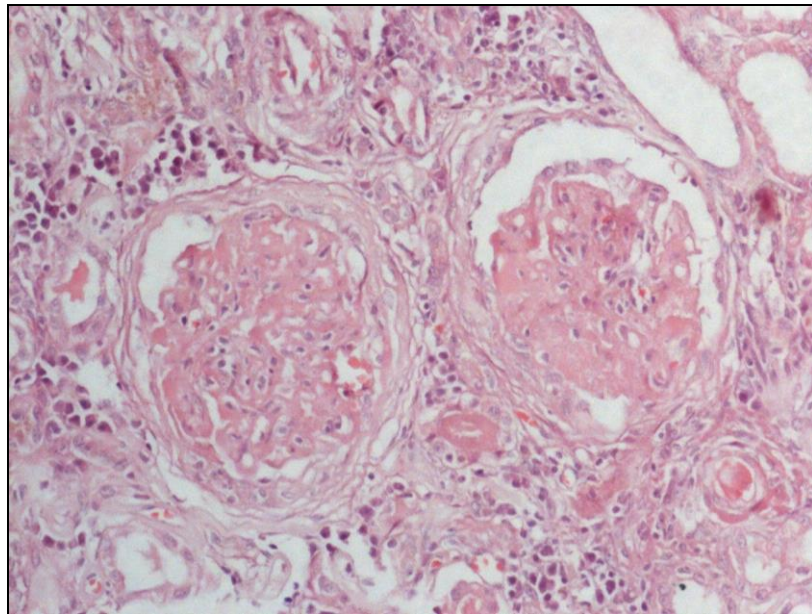


Fig.10. Erliquiose Monocítica Canina. Canino 11 - Glomerulonefrite membranosa plasmocitária.
Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x

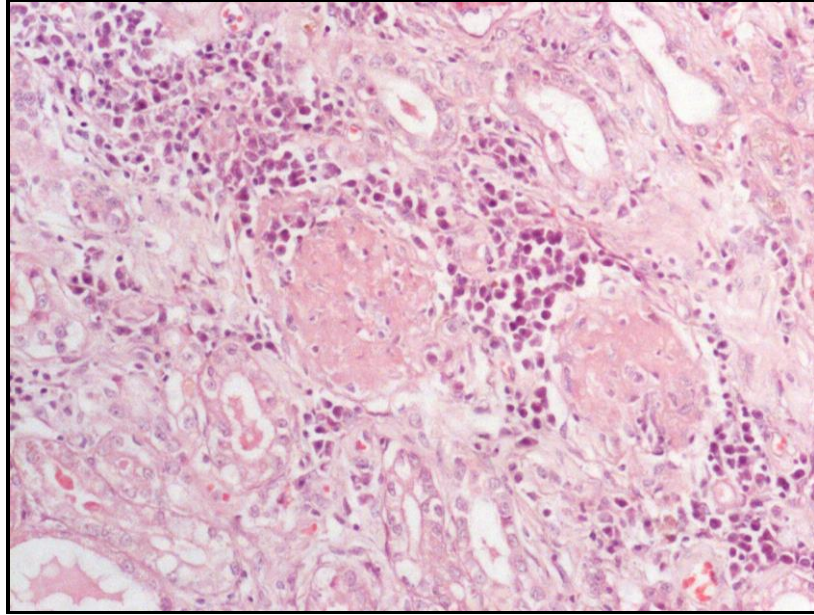


Fig.11. Erliquiose Monocítica Canina - Canino 11 - Esclerose Glomerular e infiltrado plasmocitário periglomerular. Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x

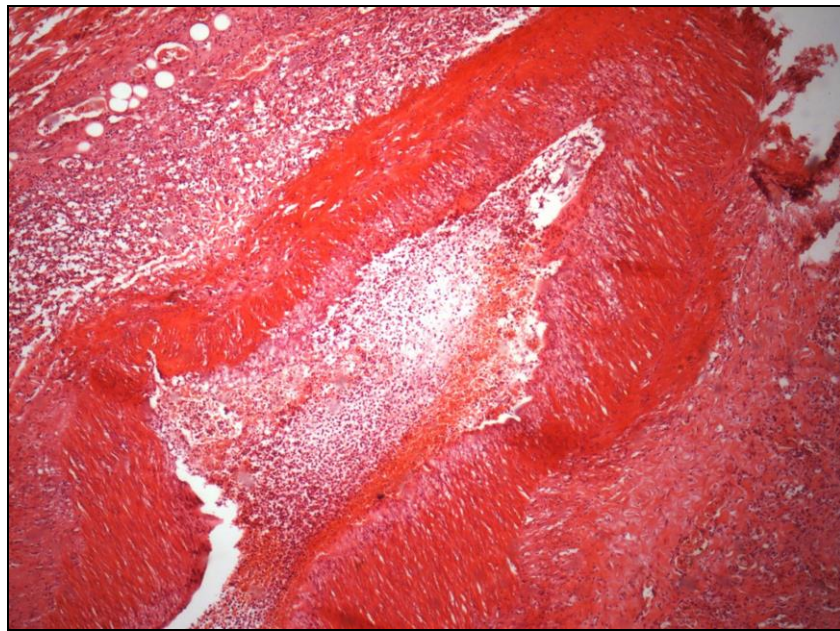


Fig.12. Erliquiose Monocítica Canina - Canino 7 -Rim com necrose fibrinóide da parede de artéria. Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.

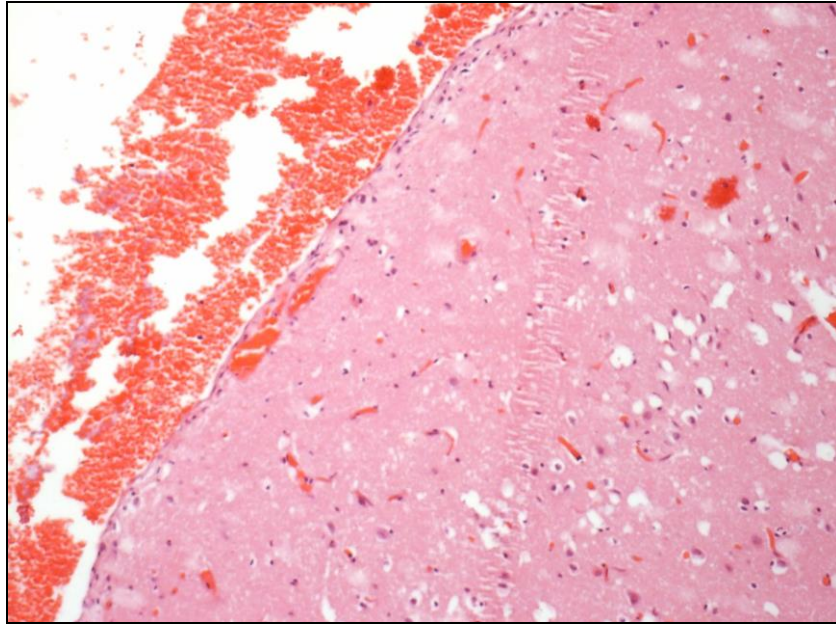


Fig.13. Erliquiose Monocítica Canina – Canino 7 – Hemorragia focalmente extensa em leptomeninges. Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x

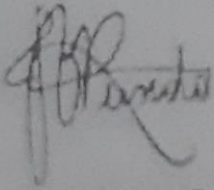
ANEXO 1 (certificado comitê de ética)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Cx P 3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@rntec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Diagnóstico patológico e molecular da infecção por *Ehrlichia canis* em caninos de Minas Gerais", protocolo nº 056/17, sob a responsabilidade de Mary Suzan Varaschin, Deborah de Oliveira Freitas, Ana Paula Peconick, Flademir Wouters, Angélica T. Barth Wouters e Djerson Lutier Raimundo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 8.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 16/10/2017.

Vigência da autorização de 01/02/2018 a 21/10/2018
 Finalidade () Ensino (x) Pesquisa Científica
 Espécie/linhagem/raça Cão / -
 Número de animais aprovados 15
 Peso/Idade 10kg / todas as idades
 Sexo macho e fêmea
 Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA): cães encaminhados por proprietários e/ou médicos veterinários para diagnóstico por meio de necropsia



Prof. Juliano Vogas Peixoto
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
 Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
 Campus Universitário
 Caixa Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras MG - Brasil
 Tel. +55 (35) 3829-5182
 cba@rntec.ufla.br - www.prp.ufla.br