



JULIANA PIERANGELI FONSECA

**ERLIQUIOSE CANINA EM LAVRAS, SUL DE
MINAS GERAIS, BRASIL**

**LAVRAS – MG
2012**

JULIANA PIERANGELI FONSECA

**ERLIQUIOSE CANINA EM LAVRAS, SUL DE MINAS GERAIS,
BRASIL**

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

Orientador

Dr. Antônio Marcos Guimarães

Coorientador

Dr. Christian Hirsch

**LAVRAS – MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Fonseca, Juliana Pierangeli.

Erliquiose canina em Lavras, sul de Minas Gerais, Brasil /
Juliana Pierangeli Fonseca. – Lavras : UFLA, 2012.
92 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
Orientador: Antônio Marcos Guimarães.
Bibliografia.

1. *Ehrlichia canis*. 2. Sorologia. 3. Epidemiologia. 4. RIFI. 5.
Hemograma. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.7089692

JULIANA PIERANGELI FONSECA

**ERLIQUIOSE CANINA EM LAVRAS, SUL DE MINAS GERAIS,
BRASIL**

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

APROVADA em 31 de julho de 2012

Dr. Christian Hirsch UFLA

Dr. Rodrigo Bernardes Nogueira UFLA

Dr. Thales Augusto Barçante PUC/MG

Dr. Antônio Marcos Guimarães
Orientador

**LAVRAS – MG
2012**

*Feche a porta, mude o disco, limpe a casa, sacuda a poeira.
Deixe de ser quem era, e se transforme em quem é.
Torna-te uma pessoa melhor e assegura-te de que sabes bem quem és tu
próprio.
E lembra-te: Tudo o que chega, chega sempre por alguma razão.*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha mãe, meu pai, minha irmã e família pelo apoio e compreensão de sempre e amor incondicional. Sem vocês, nada disso seria possível.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) pela oportunidade cedida para executar tal projeto e ampliar meus conhecimentos.

Ao setor de Clínica Médica e Cirurgia do Hospital Veterinário da UFLA e seus residentes pela colaboração neste percurso.

À clínica veterinária Climeve e ao Dr. José Eduardo Guimarães Pereira pela colaboração nas coletas.

Um agradecimento especial ao prof. Dr. Antônio Marcos Guimarães, pela orientação, dedicação, ensinamentos e tempo cedido para que tal projeto fosse devidamente executado.

Ao prof. Dr. Christian Hirsch pelo apoio e colaboração.

Ao Setor de Epidemiologia do DMV, em especial ao Fábio Rafael Pascoti Bruhn e a Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha, pela ajuda indispensável na análise estatística.

Aos professores do DMV pelos ensinamentos, que com certeza serão de grande valia futuramente.

Aos meus amigos pela compreensão, respeito e companhia fundamentais.

A conquista de um bonito trabalho. Foi um longo caminho, um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar!

RESUMO

Ehrlichia canis, bactéria Gram negativa, intracelular obrigatória, causa a erliquiose monocítica canina (EMC), doença infecciosa transmitida pelo carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus*. Na EMC as manifestações clínicas são inespecíficas e multissistêmicas, podendo apresentar três formas: aguda, subclínica e crônica. O diagnóstico clínico da EMC é difícil e os sinais clínicos são facilmente confundíveis com outras doenças infecciosas. Este estudo observacional de corte transversal teve como objetivos determinar a frequência de cães soropositivos para *E. canis*, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI $\geq 1:80$), e correlacionar o *status* sorológico com algumas variáveis epidemiológicas, bem como, avaliar a interferência da soropositividade sobre os parâmetros hematológicos. Foram analisadas amostras de sangue de 161 cães, de ambos os sexos, e diferentes raças e idades, atendidos em clínica veterinária particular e no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras (UFLA), independente do que tenha motivado a consulta. Essas amostras foram coletadas no período de setembro de 2011 a março de 2012. Em todas as amostras de sangue foi realizado hemograma completo, plaquetometria e pesquisa de mórulas de *E. canis* em concentrado leucocitário (“capa de leucócitos”). A associação entre as variáveis epidemiológicas e a soropositividade para *E. canis* foi realizada por meio da análise múltipla de regressão logística. Para a análise estatística, inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov nos resultados do hemograma completo e depois de verificada ausência de normalidade dos dados, aplicou-se o teste de Mann-whitney nessas variáveis entre cães soropositivos e soronegativos. A associação entre os sinais clínicos e a soropositividade foi avaliada por meio de um modelo múltiplo de regressão logística, e determinada a Odds Ratio (OR). A frequência média global de cães soropositivos para *E. canis* foi 23,6% (38/161), e 1,9% (3/161) dos animais apresentaram mórulas compatíveis com *E. canis*. Variáveis epidemiológicas como sexo, idade, raça, local e forma de criação dos cães, não apresentaram associação significativa ($p > 0,05$) com a soropositividade para *E. canis*. Em relação ao eritrograma e plaquetometria, cães soropositivos e soronegativos para *E. canis*, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para os valores medianos de hemácias ($5,66 \times 10^6/\text{mm}^3$ e $6,11 \times 10^6/\text{mm}^3$), hematócrito (33,2% e 40,3%), hemoglobina (13 g/dL e 13,9 g/dL) e plaquetas ($169 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $181 \times 10^3/\text{mm}^3$), respectivamente. Resultado similar foi observado em relação ao leucograma, entre cães soropositivos e soronegativos, para os valores medianos de leucócitos ($13,0 \text{ mil}/\text{mm}^3$ e $11,6 \text{ mil}/\text{mm}^3$), linfócitos ($28,5 \text{ mil}/\text{mm}^3$ e $28,0 \text{ mil}/\text{mm}^3$) e monócitos ($3,5 \text{ mil}/\text{mm}^3$ e $3,0 \text{ mil}/\text{mm}^3$), respectivamente. Para os cães soropositivos, os cinco sinais clínicos mais observados foram: prostração (18,4%), alterações pulmonares (18,4%), hiporexia (15,8%), emagrecimento (10,5%) e desidratação (10,5%). Porém, prostração foi o único sinal clínico que

apresentou associação com a soropositividade para *E. canis* ($p= 0,02$; $OR= 3,742$; $IC\ 95\%= 1,22-11,46$). Inferências sorológicas deste estudo sugerem que a exposição à infecção por *E. canis* é alta na população canina atendida em clínica particular e no Hospital Veterinário da UFLA, predominando provavelmente a fase subclínica (assintomática) da erliquiose canina para os cães soropositivos.

Palavras-chave: Cães. *Ehrlichia canis*. Sorologia. Epidemiologia. Hemograma completo.

ABSTRACT

Ehrlichia canis, gram negative bacterium, obligate intracellular, causes canine monocytic ehrlichiosis (CME), an infectious disease transmitted by the tick vector *Rhipicephalus sanguineus*. In the CME the clinical manifestations are nonspecific and multisystemic, and may have three forms: acute, subclinical and chronic. The clinical diagnosis of CME is difficult and the clinical symptoms are easily confused with other infectious diseases. This cross-sectional observational study had as objective to determine the frequency of seropositive dogs for *E. canis*, by indirect immunofluorescence assay (RIFI $\geq$ 1:80), and to correlate the serological status with some epidemiological variables, as well as, to evaluate the interference of seropositivity on the hematological parameters. The blood samples were analyzed from 161 dogs, both sexes and different ages and races, attended in particular veterinary clinic and in the Veterinary Hospital of Federal University of Lavras (UFLA), regardless of what has motivated the query. These samples were collected during april to december 2011. In all blood samples was performed complete blood count, platelet count and morulae research of *E. canis* leukocyte concentrate ("cover leukocyte"). The association between epidemiological variables and seropositivity for *E. canis* was performed by multiple logistic regression analysis. Statistical analysis was initially applied the test of normality *Kolgomorov-smirnov* in the results of the complete blood count and after verifying the absence of data normality, it was applied the *Mann-whitney* in these variables between seropositive and seronegative dogs. The association between clinical signs and seropositivity was evaluated using a multiple logistic regression model, and determined the *Odds Ratio* (OR). The overall average frequency of seropositive dogs for *E. canis* was 23.6% (38/161) of which 1.9% (3/161) were consistent with *E.canis* morulae. Epidemiological variables such as sex, age, race, place and manner of dogs creation showed no significant association ($p > 0.05$) with seropositivity for *E. Canis*. In relation to erythrogram and platelet count, dogs seropositive and seronegative for *E. canis*, showed no significant differences ($p > 0.05$), and median values of erythrocytes ($5.66 \times 10^6/\text{mm}^3$ and $6.11 \times 10^6/\text{mm}^3$), hematocrit (33.2% and 40.3%), hemoglobin (13 g/dl and 13.9 g/dL), and platelets ($169 \times 10^3/\text{mm}^3$ and $181 \times 10^3/\text{mm}^3$), respectively. A similar result was observed in leukocyte count ratio, between dogs seropositive and seronegative, and median values of leukocytes ($13.0 \text{ mil}/\text{mm}^3$ and $11.6 \text{ mil}/\text{mm}^3$), lymphocytes ($28.5 \text{ mil}/\text{mm}^3$ and $28.0 \text{ mil}/\text{mm}^3$) and monocytes ($3.5 \text{ mil}/\text{mm}^3$ and $3.0 \text{ mil}/\text{mm}^3$), respectively. In seropositive dogs, the five most frequent clinical signs were: prostration (18.4%), pulmonary disorders (18.4%), hyporexia (15.8%), weight loss (10.5%) and dehydration (10.5 %). However, prostration was the only clinical sign that was associated with seropositivity for *E. canis* ($p = 0.02$; OR= 3.742; IC 95%= 1.22-11.46). Serological inferences from this study suggest that exposure to

infection by *E. canis* is high in the canine population treated in private clinic and in the Veterinary Hospital at UFLA, probably the subclinical stage (asymptomatic) of canine ehrlichiosis in seropositive dogs.

Keywords: Dogs. *Ehrlichia canis*. Serology. Epidemiology. Complete blood count.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1	Mapa de Minas Gerais e em destaque o município de Lavras (em vermelho).....	44
Quadro 1	Ocorrência de <i>E. canis</i> , segundo diferentes métodos de diagnóstico, relatada em estudos nacionais e internacionais	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fatores epidemiológicos associados à soropositividade por <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	49
Tabela 2	Frequência de títulos de anticorpos anti- <i>E. canis</i> , por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 80), em 38 cães soropositivos* atendidos em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	49
Tabela 3	Mediana e quartis (Q) dos parâmetros de eritrograma e plaquetometria, de acordo com o <i>status</i> sorológico para <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	50
Tabela 4	Mediana e quartis (Q) de parâmetros do leucograma, de acordo com o <i>status</i> sorológico para <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	50
Tabela 5	Frequência de anemia, trombocitopenia, leucopenia e leucocitose, de acordo com o <i>status</i> sorológico para <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG.....	51
Tabela 6	Frequência de magnitude da anemia em 66 cães, soropositivos (+) ou soronegativos (-) para <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	52

Tabela 7	Frequência de magnitude da trombocitopenia em 79 cães, de acordo com o <i>status</i> sorológico para <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	52
Tabela 8	Ocorrência de anemia, trombocitopenia e leucopenia, de acordo com titulação final por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 80), em 38* cães soropositivos para <i>E. canis</i> , atendidos em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	52
Tabela 9	Frequência de sinais clínicos, de acordo com o <i>status</i> sorológico para <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	53
Tabela 10	Relação da presença de carrapatos e do número de tratamentos acaricidas com a soropositividade para <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	54
Tabela 11	Relação da presença ou não de carrapato no homem e do tempo dedicado ao lazer com a soropositividade para <i>E. canis</i> (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Histórico da erliquiose canina	18
2.2	Taxonomia.....	18
2.3	Morfologia e biologia de <i>Ehrlichia canis</i>	19
2.4	Mecanismo de transmissão	20
2.5	Patogenia e aspectos imunológicos.....	21
2.6	Diagnóstico	22
2.6.1	Clínico.....	23
2.6.2	Laboratorial	25
2.6.2.1	Citológico.....	25
2.6.2.2	Sorológico	26
2.7	Epidemiologia	27
2.7.1	Fatores de risco	32
2.7.2	Exposição ao carrapato vetor e potencial zoonótico de <i>Ehrlichia canis</i>	33
2.8	Estrutura antigênia.....	36
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivos específicos.....	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Local do estudo e população experimental	43
4.2	Coleta e processamento das amostras.....	44
4.3	Exame do concentrado leucocitário	45
4.4	Sorologia.....	45
4.5	Análise estatística	47

5	RESULTADOS	48
5.1	Perfil da população canina experimental	48
5.5	Achados clínicos	53
5.6	Presença de carrapatos em cães e no homem	53
6	DISCUSSÃO	55
6.1	Frequência de cães com citologia positiva para <i>E. canis</i>	55
6.2	Frequência de cães expostos à infecção por <i>E. canis</i>	56
6.3	Fatores epidemiológicos associados à infecção por <i>E. canis</i>	59
6.4	Parâmetros hematológicos	60
6.4.1	Eritrograma e plaquetometria	61
6.4.2	Leucograma	64
6.5	Achados clínicos	65
6.6	Presença de carrapatos em cães e no homem	68
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

Erliquiose monocítica canina (EMC), cujo agente etiológico primário é *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*), uma bactéria Gram negativa intracelular obrigatória, é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2008). Reconhecida como uma das principais doenças infecciosas que acometem os cães em várias partes do mundo, a EMC desperta um grande interesse veterinário e também de saúde pública, pois além dos aspectos relacionados à saúde animal, recentemente foi reconhecida como potencial agente zoonótico (PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996; PEREZ et al., 2006; STICH et al., 2008).

Também conhecida como pancitopenia tropical canina, a EMC apresenta uma grande variedade de sinais clínicos e achados laboratoriais inespecíficos, em diferentes fases da doença (aguda, subclínica ou crônica), tal como febre, depressão, dispneia, anorexia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, petéquias, equimoses na pele, uveíte anterior e opacidade da córnea (BREITSCHWERDT, 2004).

Os cães infectados com *E. canis* apresentam alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas bastante inespecíficas, o que dificulta o diagnóstico. Portanto, o diagnóstico presuntivo deve ser firmado com base nos sinais clínicos e nos exames laboratoriais. Porém, o diagnóstico conclusivo depende da visualização de mórulas em monócitos e linfócitos, da determinação de altos títulos de anticorpos anti-*E. canis* ou da detecção de DNA de *E. canis* pela PCR (Reação em cadeia da polimerase) (AGUIRRE et al., 2004; SOUSA et al., 2010; UENO et al., 2009; WANER et al., 2001).

O cultivo em célula da *E. canis* permitiu a utilização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), tanto na pesquisa como na titulação de anticorpos anti-*E. canis*, sendo uma das técnicas sorológicas mais utilizadas no

diagnóstico e na pesquisa da EMC. A RIFI, descrita por Ristic e colaboradores em 1972, é considerada, correntemente, como “padrão ouro”, sendo utilizada como referência para avaliação de outras técnicas sorológicas de diagnóstico (LÓPEZ et al., 2007; WANER et al., 2001).

A possibilidade de ocorrer reação cruzada entre *E. canis* e *E. chaffeensis* (RIKIHISA et al., 1992; WANER et al., 2001), associado à persistência de títulos de anticorpos pós-tratamento, são limitações da RIFI, que podem comprometer a interpretação do resultado sorológico, sendo necessária a utilização de outros testes mais específicos para a identificação do agente etiológico, como por exemplo, a PCR (NEER et al., 2002).

Pouco ainda é conhecido sobre a imunopatologia relacionada com a infecção por *E. canis* (COHN, 2003). Alguns animais são assintomáticos e em outros as manifestações clínicas são inespecíficas e muitas vezes acometem diferentes sistemas. As alterações hematológicas durante a infecção são destacadas por trombocitopenia e leucopenia (HARRUS; WANER, 2011; UENO et al., 2009; WANER et al., 1997).

Considerada uma doença cosmopolita, a EMC é particularmente mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a ocorrência da erliquiose canina vem aumentando expressivamente em várias regiões e coincide com a distribuição do carrapato vetor *R. sanguineus*, que se encontra amplamente distribuído por diversas áreas urbanas no país (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

Estudo sobre a ectofauna parasitária em uma população canina no município de Lavras, Sul de Minas Gerais, demonstrou que o *R. sanguineus* constitui o principal ectoparasito em cães urbanos domiciliados (GUIMARÃES; LIMA; ROCHA, 2011). Como esse carrapato é o vetor biológico de *E. canis*, supõe-se que a erliquiose seja uma doença frequente na população canina desse município. Entretanto, embora seja indiscutível a relevância da EMC no âmbito

da clínica veterinária, ainda não há informações sobre a frequência de cães infectados por *E. canis* provenientes da área urbana de Lavras.

Sendo assim, este estudo tem como objetivos determinar a frequência de cães expostos a infecção por *E. canis*, e correlacionar o *status* sorológico com algumas variáveis epidemiológicas e os parâmetros hematológicos, de cães atendidos em clínica particular e no hospital veterinário da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Sul de Minas Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da erliquiose canina

A erliquiose canina foi primeiramente relatada por Donatien e Lestoquard, no Instituto Pasteur na Argélia, em 1935. Por meio da observação de esfregaços sanguíneos de cães febris e infestados por *R. sanguineus*, notou-se a presença de pequenos organismos semelhantes a *Rickettsia* no interior de monócitos, os quais foram nomeados como *Rickettsia canis*. No ano de 1945, em homenagem ao famoso bacteriologista alemão, Paul Ehrlich, Moshkovshi renomeou para *Ehrlichia canis*.

A doença foi reconhecida nos EUA em 1962 (LITTLE, 2010) e obteve um significado importante durante a guerra do Vietnã (1959-1975), sendo responsável pela morte de centenas de cães do exército americano (RIKIHISA et al., 1992). No Brasil, *E. canis* é a espécie comum em cães, cujo primeiro relato no país foi realizado em Belo Horizonte, MG (COSTA et al., 1973).

2.2 Taxonomia

A classificação taxonômica dos parasitos era baseada nas características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas e clínicas. Porém, com as dificuldades para um diagnóstico específico, baseado em parâmetros fenotípicos e o desconhecimento de fatores biológicos de diferentes grupos de parasitos, trabalhos têm sido conduzidos com a utilização de técnicas moleculares e análises filogenéticas para o diagnóstico e classificação e/ou reclassificação de diferentes grupos.

A taxonomia do grupo das *Ehrlichias* foi modificada em 2001, e as espécies de *Ehrlichia*, anteriormente classificadas como pertencentes à tribo

Ehrlichiae e a família *Rickettsiaceae*, tal como os gêneros *Anaplasma* e *Neorickettsia*, foram reclassificadas para a família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001).

As espécies de *Ehrlichia* por muito tempo foram diferenciadas pelo tipo de célula parasitada, distribuição geográfica e gravidade da doença (SMITH et al., 1976). As novas propostas de classificação para esse grupo têm sido realizadas levando em consideração as características morfológicas e biológicas das formas parasitárias, a especificidade pelo hospedeiro, local de parasitismo, patogenicidade, períodos pré-patente e patente, e modo de transmissão. Além disso, as características genéticas também são consideradas, sendo avaliadas as diferenças nucleotídicas nas sequências de genes bem característicos (genes codificantes para RNA ribossomal e proteínas estruturais e funcionais) (DUMLER et al., 2001).

Esse hemoparasito, de acordo com a classificação proposta por Dumler et al. (2001), baseada na análise de sequências nucleotídicas dos genes 16S rRNA, groESL e proteínas de superfície, pertence a ordem *Rickettsiales*, família Anaplasmataceae e ao gênero *Ehrlichia*, onde estão incluídas as espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. ewingii*.

2.3 Morfologia e biologia de *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC). A doença tem esse nome devido ao tropismo de *E. canis* por monócitos e linfócitos, sendo a espécie que mais acomete os cães (RIKIHISA, 1991; STICH et al., 2008). *Ehrlichia* sp são bactérias Gram negativas pequenas (0,5 - 0,9µm), intracelulares obrigatórias, apresentam forma cocoide ou pleomórficas e podem infectar os animais e o homem (HARRUS, 2002). Esses parasitos são encontrados em células do sistema monócito macrofágico do fígado, baço e

linfonodos, caracterizado como sendo o ponto inicial de sua multiplicação (HARRUS et al., 1998).

Ehrlichia canis pode ser visualizada no citoplasma de células mononucleares, em colônias denominadas de mórulas intracitoplasmáticas (1-2µm). A proliferação da *E. canis* no hospedeiro se inicia com a aderência à membrana plasmática da célula e invaginamento da mesma. Após penetrar na célula hospedeira se localiza no interior do vacúolo onde se multiplica por divisão binária, formando as inclusões intracelulares denominadas mórulas (HARRUS et al., 1998; STICH et al., 2008).

Tem sido investigada a atividade metabólica de espécies de *Ehrlichia*, que parecem efetuar catabolismo aeróbico e assacarolítico, ou seja, não utilizam glicose-6-fosfato ou glicose para produção de ATP. As espécies do gênero *Ehrlichia* utilizam os aminoácidos glutamina ou o glutamato como fonte de energia (RIKIHISA, 1991)

2.4 Mecanismo de transmissão

Ehrlichia canis tem como vetor biológico o carrapato *R. sanguineus* (Acari: Ixodidae). Esse carrapato infecta-se ao ingerir sangue com leucócitos parasitados por *E. canis* durante o repasto sanguíneo, geralmente na segunda ou terceira semana de infecção do cão (fase aguda), quando existe um maior número de monócitos e linfócitos infectados (RIKIHISA, 1991).

No carrapato, *E. canis* se multiplica nas células epiteliais do intestino, hemócitos e na glândula salivar. Ocorre transmissão transtadial, mas não transovariana, sendo o cão o principal reservatório do agente. O parasito pode ser transmitido para os cães por ninfas e adultos de *R. sanguineus* (GROVES et al., 1975), e de forma intraestadial por machos adultos do carrapato (BREMER et al., 2005). No momento do repasto sanguíneo, o carrapato inocula *E. canis*

juntamente com a saliva (AGUIAR et al., 2007; HARRUS et al., 1998; RIKIHISA, 1991). O carrapato infectado pode transmitir *E. canis* por até cinco meses após adquirir a infecção (DAGNONE et al., 2001; DANTAS-TORRES, 2008; RIKIHISA, 1991).

2.5 Patogenia e aspectos imunológicos

Mecanismos inflamatórios e imunológicos estão envolvidos na patogenia da erliquiose canina (HARRUS; WANER; BARK, 1997). Estudos realizados em cães infectados experimentalmente com *E. canis* reforçam a teoria que a doença possui um componente imunopatológico (CASTRO et al., 2004).

Contudo a imunopatogênese desse parasito ainda é pouco conhecida, e o seu melhor entendimento contribui para o diagnóstico, prognóstico, prevenção e controle (HARRUS; WANER, 2011; SHIPOV et al., 2008). Acredita-se que o mecanismo de resposta predominante é T-dependente e com alta secreção de INF- γ . Em cães infectados experimentalmente com *E. canis* observa-se anticorpos específicos das classes IgM e IgA quatro a sete dias após a infecção (DAI) e IgG, 15 DAI (WANER et al., 2001). Algumas manifestações clínicas da erliquiose canina também são mediadas por imunocomplexos (HARRUS et al., 2001).

Os monócitos e macrófagos são importantes células do sistema imunológico com funções relacionadas à fagocitose, apresentação de antígenos a células do sistema imune adaptativo, produção de citocinas pró-inflamatórias, remodelação tecidual, entre outras (WERMELING; KARLSSON; McGAHA, 2009). *Ehrlichia canis* compromete a resposta de defesa do organismo, entre outros fatores, pela infecção nas células fagocíticas mononucleares (KAKOMA; CARSON; RISTIC, 1980), um importante mecanismo de escape imunológico que ainda não está bem esclarecido.

Os mecanismos seguintes à penetração da célula hospedeira são responsáveis pela mudança no ambiente humoral e celular. Imunofenotipagem de seções dos linfonodos e baço revelaram alterações nas populações de células CD3+ e CD8+, além de aumento das concentrações de IgG e IgM em cães infectados com *E. canis* (CASTRO et al., 2004).

A manutenção da fase aguda por *E. canis* mostrou uma queda dos elementos celulares, com acentuada queda nas subpopulações de linfócitos T CD4+, MHC II+ e CD45R+, situação que determina imunossupressão pela perda fisiológica na habilidade de reconhecimento antigênico e ativação da resposta imune adaptativa (HARRUS et al., 2003; MOREIRA, 2005).

A patogenia da erliquiose canina está relacionada em grande parte a intensa vasculite que pode ocorrer, e como consequência são observados nefrite intersticial, inflamação perivascular no fígado, com presença de degeneração hidrópica, meningo-encefalite não supurativa, esplenomegalia e hiperplasia de cordões medulares (CASTRO et al., 2004).

A anemia observada na EMC está associada à supressão da eritropoese pela medula óssea, lise celular mediada pelo sistema complemento e efeito do sistema fagocítico mononuclear (MOREIRA et al., 2003). A trombocitopenia, achado corrente na infecção por *E. canis*, deve-se ao consumo e destruição de plaquetas, sequestro de plaquetas pelo baço, diminuição da produção de plaquetas em função da hipoplasia da medula óssea (WOODY; HOSKINS, 1991) e produção de anticorpos antiplaquetas (GAUNT et al., 2010).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico pode constituir um desafio devido às diferentes fases da erliquiose e múltiplas manifestações clínicas, sendo suspeito quando o cão apresentar histórico compatível (vive ou viajou para área endêmica e exposição

prévia a carrapatos), sinais clínicos e características hematológicas comuns na doença, e presença de alterações bioquímicas (HARRUS; WANER, 2011).

2.6.1 Clínico

A EMC pode ser dividida em três fases: aguda, subaguda e crônica. Após um período de incubação de 8 a 20 dias, *E. canis* multiplica-se em linfócitos e monócitos circulantes de linfonodos e de vísceras (fígado e baço), induzindo linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular, e diversos sinais sistêmicos, iniciando a fase aguda da infecção. Na fase aguda, os sinais clínicos são geralmente inespecíficos, incluindo pirexia, anorexia, depressão, letargia, perda de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia, distúrbios pulmonares e alterações oculares como uveíte anterior e opacidade da córnea (BREITSCHWERDT, 2004).

As células infectadas por *E. canis* são carregadas por meio da circulação sanguínea para diversos órgãos, principalmente pulmões, rins e meninges, e ocorre aderência ao endotélio vascular, causando vasculite e infecção tecidual subendotelial. O consumo, o sequestro e a destruição das plaquetas induzem a trombocitopenia observada na fase aguda. A trombocitopenia é comum, mas as petéquias podem não estar evidentes e as diminuições de plaquetas em alguns animais podem ser discretas. Vasculites e mecanismos imunomediados induzem a trombocitopenia e tendências à hemorragia. Nessa fase, a contagem de leucócitos é variável (leucocitose ou leucopenia), e a anemia, devido à supressão da produção de eritrócitos e à destruição acelerada dos mesmos, desenvolve-se progressivamente (ALMOSNY, 2002; ETTINGER; FELDMAN, 2004). Os sinais clínicos da fase aguda podem ser mais graves dependendo da virulência da cepa de *E. canis* e parecem ser exacerbados na presença de coinfeções com

outros agentes também transmitidos por carrapatos, como *riquétsias* ou protozoários (GAL et al., 2007; UNVER et al., 2008).

A despeito da gravidade da fase aguda em alguns casos, incluindo até a morte, vários cães parecem tolerar bem a infecção por *E. canis* sem apresentar sinais clínicos evidentes da doença. Esses cães passam para a fase subclínica da EMC na qual podem permanecer meses ou anos cronicamente infectados, sem sinais evidentes da doença. Nessa fase os cães não apresentam sinais clínicos proeminentes, embora o agente persista intracelularmente, e podem apresentar trombocitopenia branda, leucopenia e anemia. Devido à deposição de imunocomplexos, alguns cães poderão apresentar glomerulonefrite. Na fase subclínica, os cães imunocompetentes podem eliminar o agente e se recuperarem, sem desenvolverem a fase crônica da EMC (BREISTSCHWERDT, 2004; CODNER, 1986; HARRUS et al., 1998; WANER et al., 1997).

Na fase crônica, os sinais clínicos são ausentes ou discretos em alguns cães, entretanto, graves em outros, que podem desenvolver uma forma potencialmente fatal da EMC. Os achados clínicos podem variar de acordo com os órgãos predominantemente afetados: esplenomegalia, glomerulonefrite, insuficiência renal, pneumonite intersticial, uveíte anterior e meningite associada à ataxia cerebelar, depressão, paresia, hiperestesia, anorexia e perda de peso. Nessa fase pode ocorrer pancitopenia (BREITSCHWERDT, 2004; STICH et al., 2008). Frequentemente, a trombocitopenia grave pode causar: epistaxes, petéquias ou equimoses hemorrágicas, melena e hematúria, hifema, hemorragia da retina e uveíte anterior (NEER; HARRUS, 2006).

As alterações hematológicas e bioquímicas observadas na EMC podem variar de acordo com a fase da doença. Na fase aguda, trombocitopenia, pancitopenia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hipergamaglobulinemia, e aumentos discretos da alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA)

são frequentes (STICH et al., 2008). Nessa fase, a trombocitopenia geralmente é acompanhada de uma anemia branda e uma redução discreta na contagem de leucócitos, se comparado com os valores na pré-infecção (HARRUS; WANER, 2011). Na fase subclínica, uma trombocitopenia branda pode estar presente, mesmo na ausência de sinais clínicos. Já na fase crônica, a trombocitopenia geralmente é grave e acompanhada de uma acentuada anemia e leucopenia (HARRUS; WANER; BARK, 1997). Em um estudo retrospectivo de casos letais em cães diagnosticados com EMC na forma clínica crônica, foi relatado marcada pancitopenia (devido à hipoplasia de medula óssea), anorexia, depressão, grave tendência a sangramentos, hipoalbuminemia e aumento da ALT (MYLONAKIS et al., 2004).

2.6.2 Laboratorial

Os cães infectados com *E. canis* apresentam alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas bastante inespecíficas, e o diagnóstico presuntivo pode ser firmado com base nos sinais clínicos e nos exames laboratoriais. Porém, sua confirmação (diagnóstico conclusivo) depende da visualização de mórulas em monócitos e linfócitos, da determinação de altos títulos de anticorpos anti-*E. canis* e/ou da detecção de DNA de *E. canis* pela PCR (SOUSA et al., 2010).

2.6.2.1 Citológico

Nos cães, *E. canis* forma inclusões intracelulares denominadas de mórulas, que podem ser detectadas em monócitos e linfócitos no sangue periférico e em aspirados de nódulos linfáticos. Utilizando corantes de rotina, a mórula se apresenta como uma estrutura arredondada, formada por um conjunto

de vários corpúsculos corados em roxo, medindo de um a vários micrometros de diâmetro, dentro de um vacúolo. Embora apresentando uma forma bem característica e de fácil diagnóstico, poucas mórulas são ocasionalmente visíveis microscopicamente na fase aguda da EMC, podendo gerar muitos resultados falso-negativos, já que são encontradas em apenas 4% dos casos positivos, (HARRUS; WANER; BARK, 1997), ou apresentar valores bem baixos, principalmente na fase subclínica (HARRUS; WANER, 2011). De acordo com Waner (2008), na fase subclínica da ECM, *E.canis* está provavelmente retida no baço e desse modo não pode ser detectada na circulação.

Assim, uma das formas de aumentar a eficácia do diagnóstico citológico é proceder ao exame de 1000 campos microscópicos do concentrado leucocitário (capa leucocitária) ou de material obtido de aspirados da medula óssea corados com Giemsa, que pode alcançar uma sensibilidade de 66% e 61%, respectivamente, porque mais leucócitos podem ser examinados na lâmina. Desse modo, o exame do concentrado leucocitário pode ser utilizado como método de rotina para o diagnóstico citológico da EMC, principalmente em cães que não apresentam linfadenopatia periférica, pois nesses casos deve-se proceder a pesquisa de mórula no material obtido por meio da punção aspirativa do nódulo linfático (MYLONAKIS et al., 2003).

2.6.2.2 Sorológico

O diagnóstico da EMC é geralmente baseado na sorologia, utilizando testes como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA e Western *immunoblotting* (WANER et al., 2001), já que os aspectos clínicos e clínicopatológicos são altamente inespecíficos (SOUSA et al., 2010). No entanto, em áreas de alta endemicidade para EMC o diagnóstico sorológico positivo não é conclusivo, não só por causa dos sinais clínicos inespecíficos, mas

devido ao fato dos cães poderem manter altos títulos de anticorpos anti-*E. canis* durante meses ou anos, mesmo após um tratamento bem sucedido ou a eliminação do agente pelo sistema imune do hospedeiro (BARTSCH; GREENE, 1996; HARRUS et al., 1998; NEER et al., 2002; WANER et al., 2001).

A RIFI para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*E. canis* é considerada o método sorológico “padrão ouro” (“*gold standard*”), indicando exposição ao agente (HARRUS; WANER, 2011). Na interpretação de um resultado de RIFI, além do título de anticorpos anti-*E. canis*, deve-se levar em consideração os sinais clínicos e os parâmetros hematológicos sugestivos de EMC. Um cão que apresenta um título de anticorpos de IgG ≥ 64 é sugestivo de exposição a *E. canis*. Mas, cão com título ≥ 256 e com sinais clínicos e parâmetros hematológicos sugestivos de EMC, pode ser considerado como diagnóstico conclusivo para EMC. Por outro lado, um provável caso de EMC deve ser considerado no caso de cão com sinais clínicos sugestivos de EMC e um único título na RIFI ≥ 64 ou 128 (WANER et al., 2001).

Uma das limitações da RIFI é que pode ocorrer reação cruzada entre *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chaffeensis*, e outras espécies de *Ehrlichia*, gerando resultados falso-positivos. Por outro lado, na fase aguda da EMC, podem ocorrer resultados falso-negativos quando os cães falham na produção de anticorpos ou encontram-se nos primeiros dias pós-infecção (CARDENAS et al., 2007; NEER et al., 2002; WEN et al., 1997). Entretanto, não ocorre reação cruzada para *Anaplasma platys*, agente etiológico da trombocitopenia cíclica canina (FRENCH; HARVEY, 1983).

2.7 Epidemiologia

Embora a EMC seja uma doença cosmopolita, é particularmente mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais. A primeira descrição de um cão

infectado por *E. canis* ocorreu na Argélia em 1935 e foi reconhecida nos EUA em 1962 (LITTLE, 2010). Estudos sorológicos, citológicos e moleculares têm apresentado evidências de cães infectados por *E. canis* na África, Ásia, Europa, e América do Norte, Central e do Sul (STICH et al., 2008).

No Brasil, a erliquiose canina foi diagnosticada pela primeira vez em 1973, em um cão oriundo de Belo Horizonte, MG (COSTA et al., 1973). A presença de cães infectados com *E. canis* tem sido demonstrada em estudos realizados na região Sul (DAGNONE et al., 2003; TRAPP et al., 2006), Sudeste (ALBERNAZ et al., 2007; BULLA et al., 2004; COSTA JÚNIOR et al., 2007; MACIEIRA et al., 2005; MOREIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2009); Nordeste (CARLOS et al., 2007; SOUZA et al., 2010), Norte (AGUIAR et al., 2007), com a prevalência variando de 14 a 45% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias.

A prevalência da erliquiose canina pode variar em função do clima, devido a certos fatores epidemiológicos (distribuição do vetor, modo de vida dos animais e a idade da população experimental) e as práticas de manejo e o habitat dos animais (KEEFE et al., 1982; RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005; SAINZ et al., 1996).

Conforme pode ser observado no Quadro 1, a ocorrência de *E. canis* pode apresentar uma ampla variação entre diferentes países ou entre regiões de um mesmo país, em função de uma série de fatores como o método de diagnóstico utilizado, ponto de corte adotado e população experimental avaliada.

Quadro 1 Ocorrência de *E. canis*, segundo diferentes métodos de diagnóstico, relatada em estudos nacionais e internacionais

OCORRÊNCIA	POPULAÇÃO	MÉTODO	LOCAL	REFERÊNCIA
42,5% (108/254)	Aleatória	RIFI ≥ 40	Cuiabá	SILVA et al. (2010)
31,0% (97/314)	Aleatória	RIFI ≥ 40	Rondônia	AGUIAR et al. (2007)
72,5% (79/109)	Aleatória	RIFI ≥ 40	Semiárido da Paraíba	AZEVEDO et al. (2011)
35,6% (168/472)	Aleatória	RIFI ≥ 80	Salvador	SOUZA et al. (2010)
65,6% (66/101) 37,8% (38/101) 24,7% (25/101)	Área rural	RIFI ≥ 40	Nanuque Belo Horizonte Lavras	COSTA JÚNIOR. et al. (2007)
4,8% (19/389)	Aleatória	RIFI ≥ 40	Rio Grande do Sul	SAITO et al. (2008)
63,3 (19/30) 70,0% (21/30) 53,5% (16/30)	Suspeita	RIFI $1 \geq 20$ Dot-Elisa Nested PCR	Jaboticabal	NAKAGHI et al. (2008)
73,2% (145/198) 77,7% (154/198)	Suspeita	RIFI ≥ 64 PCR	Botucatu	DINIZ et al. (2007)
5,3% (4/75) 33,3% (25/75) 98,7% (74/75)	Suspeita	Esfregaço Nested PCR dot-ELISA	Salvador	MENESES et al. (2008)
7,1% (5/70) 40,0% (28/70)	Suspeita	Esfregaço PCR	Botucatu	UENO et al.(2009)
72,5% (29/40)	Suspeita	Nested PCR	Jaboticabal	FARIA et al.(2010)
5,7% (251/4407)	Hospital	Esfregaço	Uberlândia	BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA (2009)
22,8% (87/381)	Aleatória	dot-ELISA	Londrina	TRAPP et al.(2006)
36% (72/200)	Hospital	dot-ELISA	Bahia	CARLOS et al. (2011)

“continua”

Quadro 1 “continuação”

OCORRÊNCIA	POPULAÇÃO	MÉTODO	LOCAL	REFERÊNCIA
35,9% (42/117) 45,5% (5/11) 49,5% (52/105) 54,5% (6/11) 35,7% (45/126) 29,6% (125/442) 15,5% (104/671) 20,9% (93/446) 4,7% (2/43) 0,7% (1/142) 1,7% (6/356) 23,8% (24/101)	Aleatória	dot-ELISA	Bahia Ceará Pernambuco Alagoas Mato Grosso do Sul Rio de Janeiro São Paulo Minas Gerais Paraná Santa Catarina Rio Grande do Sul DF	LABARTHE et al. (2003)
30,9% (67/217)	Hospital	Nested PCR	Botocatu	BULLA et al.(2004)
38,9% (86/221)	Hospital	Nested PCR	Ribeirão preto	SANTOS et al. (2009)
88% (22/25) 38,4% (10/26)	Suspeita	Nested PCR	Jaboticabal Campo Grande	DAGNONE et al. (2009)
7,8% (12/153)	Hospital	Nested PCR	Ilhês-Itabuna	CARVALHO et al. (2008)
15% (34/226)	Aleatória	PCR	Rio de Janeiro	MACIEIRA et al. (2005)
22% (28/129)	Suspeita	PCR	Londrina	DAGNONE et al. (2003)
22% (12/55) 18,1% (10/55)	Suspeita	PCR RIFI($1 \geq 160$)	Portugal	Alexandre et al. (2009)
25% (1/4)	Suspeita	PCR	Norte de Portugal	Cardoso et al. (2010)
10,6% (13/123) 13,8% (17/123)	Hospital	Ensaio de imunocromatografia RIFI(RIFI ≥ 40	Iran	AKHTARDANESH et al. (2010)

“continua”

Quadro 1 “conclusão”

OCORRÊNCIA	POPULAÇÃO	MÉTODO	LOCAL	REFERÊNCIA
6,4% (39/601)	Suspeita	PCR	Itália	SOLANO-GALLEGO et al. (2006)
0,8%(71/8662) 0,3%(1/337) 3,6%(3/84) 0,5%(4/733) 0,2%(1/662) 0,9%(4/457) 6,3%(1/16) 1,5%(4/274) 0,8%(2/254) 0,8%(5/663) 0,7%(3/403) 1,6%(1/62) 0,4%(1/257) 0,9%(4/428) 8,8%(3/34) 2,8%(5/181) 2%(18/893) 0,5%(2/385)	Aleatória	Dot-Elisa	América do Norte Alabama Arkansas Florida Georgia Kansas Kentucky Louisiana Maryland Missouri Carolina do Norte Nebraska Nova Jersey Ohio Carolina do Sul Tennessee Texas Virginia	BEALL et al. (2012)
5,0% (5/120) 44,1% (53/120)	Aleatória	Esfregaço Dot-Elisa	México	RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO (2005)
4,3% (4/91) 82,4% (75/91) 40,6% (37/91)	Aleatória	Esfregaço RIFI $I \geq 20$ PCR	Colômbia	VARGAS-HERNÁNDEZ et al.(2011)

2.7.1 Fatores de risco

O principal fator de risco para a infecção por *E. canis* no país é a exposição direta do cão ao *R. sanguineus* (AGUIAR et al., 2007; CARLOS et al., 2011; CARVALHO et al., 2008; COSTA JÚNIOR et al., 2007; DAGNONE et al., 2001; TRAPP et al., 2006), espécie de carrapato predominante entre os cães criados em áreas urbanas com uma prevalência de infestação em torno de 30% (SZABÓ et al., 2001).

Rhipicephalus sanguineus constitui o principal transmissor da EMC no país, não sendo observada a presença de *E. canis* infectando outras espécies de ixodídeos no território nacional (LABRUNA et al., 2007). No Brasil, Aguiar et al. (2007) encontraram uma frequência de *R. sanguineus* naturalmente infectado com *E. canis* entre 2,3 a 6,2%. No país, foram identificados pela primeira vez carrapatos *R. sanguineus* naturalmente infectados por *E. canis*, coletados de cães provenientes dos Estados de Rondônia e São Paulo, por meio da PCR para um fragmento do gene *dsb* de *Ehrlichia*. Também nesse estudo, observou-se que a soroprevalência (RIFI) de *E. canis* é maior em cães criados em área urbana (37,9%) em relação aos animais mantidos na zona rural (24,8%) no município de Monte Negro, Rondônia (AGUIAR et al., 2007). Entretanto, devido às condições socioeconômicas dos proprietários, responsável pela restrição orçamentária, o que compromete o controle dos carrapatos, os cães criados em áreas rurais estão mais expostos à infecção por *E. canis* (RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005).

Em um estudo realizado com cães provenientes de três áreas rurais do estado de Minas Gerais, Costa Júnior et al. (2007) observaram que machos acima de dois anos de idade e aqueles cães infestados com carrapatos apresentaram uma alta associação ($p < 0,05$) com a soropositividade para *E. canis*.

Outros estudos também têm demonstrado associação significativa da idade com a presença de anticorpos anti-*E. canis*, mas não para sexo e raça (RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005; WATANABE et al., 2004). No Brasil, um estudo realizado em hospital veterinário, observou uma maior positividade de *E. canis* pela PCR ($p < 0,05$) em cães com idade até 12 meses, porém não houve associação significativa ($p > 0,05$) com o sexo, local de criação e presença de carrapatos durante o exame de animais com suspeita clínica de erliquiose (UENO et al., 2009). Em Cuiabá, MT, os autores não observaram predisposição racial, sexual, etária e acesso à rua ou a zona rural para cães soropositivos ou soronegativos para *E. canis* ($p > 0,05$). Também, no mesmo estudo, não foi observada associação significativa ($p > 0,05$) com o *status* sorológico, entre os cães com ou sem infestação pelo carrapato vetor (SILVA et al., 2010).

No Brasil, em uma população de cães atendidos em hospital veterinário, os autores observaram que animais com idade acima de 12 meses, com presença de carrapatos e sinais neurológicos, apresentaram associação significativa com a soropositividade para *E. canis* (TRAPP et al., 2006).

A trombocitopenia é o achado hematológico mais comum e consistente nos casos agudos de EMC (WANER et al., 1995), e está altamente associada com a soropositividade para *E. canis* (CARLOS et al., 2011; RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005), bem como, anemia e linfadenopatia (CARLOS et al., 2011), em comparação com os cães soronegativos.

2.7.2 Exposição ao carrapato vetor e potencial zoonótico de *Ehrlichia canis*

A erliquiose tem sido motivo de interesse para pesquisas em medicina veterinária e também para a saúde pública devido às recentes descobertas da infecção acometendo seres humanos (DOUDIER et al., 2010; STICH et al.,

2008). As descobertas da *Neorickettsia sennetsu* (*E. sennetsu*), agente da febre glandular, reportada durante a década de 1960 no Japão, da erliquiose granulocítica humana (*E. Ewingii*), e o isolamento de *E. chaffeensis* em seres humanos, responsável pela erliquiose monocitotrópica humana, confirmam que a erliquiose não é apenas um problema médico veterinário (ANDERSON et al., 1993; BAKKEN et al., 1996; CHEN et al., 1994; DOUDIER et al., 2010; McDADE, 1990; RIKIHISA, 1991).

A ocorrência da infecção em seres humanos por um microrganismo muito semelhante à *E. canis* foi descrita pela primeira vez em 1986 (MAEDA et al., 1987; FISHBEIN et al., 1987), com um paciente apresentando febre, mialgia, fraqueza e confusão mental. A Erliquiose monocitotrópica humana (HME) foi inicialmente tida por ser causada por *E. canis*, devido às reações cruzadas na sorologia e a afinidade de ambos os agentes patogênicos para monócitos e macrófagos (MAEDA et al., 1987). Porém, essa hipótese foi colocada em dúvida (EWING; JOHNSON; KOCAN, 1987), e posteriormente refutada por meio da análise de diferenças na ecologia, fatores genéticos e vetor, e o agente etiológico da HME foi formalmente nomeado como *E. chaffeensis* em 1991 (ANDERSON et al., 1991; DAWSON et al., 1991; EWING et al., 1995; RIKIHISA, 1991). Também foram observadas diferenças entre as sequências do 16S rDNA entre ambas espécies. *Ehrlichia canis* é enzoótica em todo o EUA, já *E. chaffeensis* parece estar restrita aos estados do sul, e tem como vetor biológico *Amblyomma americanum*, enquanto que essa espécie de carrapato não é considerada capaz de transmitir *E. canis*.

Embora *E. canis* não seja considerada um agente de HME (sigla em inglês da erliquiose monocítica humana) nos EUA, evidências recentes indicam que uma cepa venezuelana de *E. canis* pode ser transmitida a seres humanos (PEREZ et al., 2006; PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996). Essa cepa, recentemente descrita com o nome de *Ehrlichia* humana venezuelana

(VHE) está associada com casos de erliquiose no homem na Venezuela e tem a sequência do 16S rDNA com uma homologia de 99% quando comparada *E. canis* de Oklahoma, EUA (STICH et al., 2008). *Rhipicephalus sanguineus* é a espécie de carrapato mais cosmopolita, ocorrendo nos cinco continentes, parasitando principalmente o cão doméstico. Mas, ocasionalmente pode ser encontrada em outros hospedeiros como bovinos, ovinos, caprinos (NORVAL; DAILLECOURT, 1983) e também no homem (CLARK et al., 1996; FELZ; DURDEN; OLIVER JÚNIOR, 1996; NEBREDAS-MAYORAL et al., 2004; VENZAL et al., 2003). Atualmente, devido á mudanças ocorridas no estilo de vida, o cão está em contato cada vez maior com o homem, expondo este aos agentes comuns entre as duas espécies. Vale levar em consideração que na Europa, Ásia e África, *R. sanguineus* é o vetor para o homem da *Rickettsia conorii*, agente da febre do Mediterrâneo (MERLE et al., 1998), potencial vetor da *R. rickettsii*, agente da febre maculosa no Brasil (ROZENTAL et al., 2002) e da borreliose no país (YOSHINARI et al., 1997).

Há poucos relatos de parasitismo por *R. sanguineus* em humanos no Brasil, embora esse carrapato seja frequentemente encontrado nesse hospedeiro em outras partes do mundo: USA (CLARK et al., 1996; FELZ; DURDEN; OLIVER JÚNIOR, 1996), Espanha (NEBREDAS-MAYORAL et al., 2004) e Uruguai (VENZAL et al., 2003).

No Brasil, Dantas-Torres, Figueredo e Brandão Filho (2006), na região metropolitana de Recife, PE, descreveram os primeiros quatro casos de parasitismo humano por *R. sanguineus*. Posteriormente, Louly et al. (2006), em Goiânia, GO, e Freire et al. (2010), no Estado do Pará, também relataram o parasitismo de humanos pela mesma espécie de carrapato.

2.8 Estrutura antigênica

Estudos da resposta imune humoral frente à infecção por *E. canis*, realizados utilizando o teste de Western blot definiram polipeptídeos antigênicos presentes na superfície desse agente que variam de 21 a 160 kDa (ALLEMAN et al., 2001; McBRIDE; YU; WALKER, 2000a; STICH et al., 2002) e algumas glicoproteínas como gp120, gp200 e gp36 (CHEN; CULLMAN; WALKER, 1997; McBRIDE; YU; WALKER, 2000b).

Ehrlichia canis é considerada uma bactéria deficiente em componentes estruturais, tais como peptideoglicanas e lipopolissacarídeos. Essa deficiência resultou no desenvolvimento de algumas estruturas proteicas complexas de membrana, que têm papel na evasão do sistema imune e interação de *E. canis* com as células do hospedeiro (MAVROMATIS et al., 2006).

O código genético de *E.canis* é considerado como sendo bem caracterizado (WALSH et al., 1998), bem como, há várias cepas mutantes que podem ser utilizadas de acordo com a necessidade (BANEYX, 1999). Estudos moleculares identificaram grupos de proteínas imunorreagentes que incluem glicoproteínas, proteínas do sistema secretório do tipo IV (Vir) e a família de proteínas dominantes de superfície de membrana. Essas proteínas imunorreagentes, contendo 25 genes parálogos que podem ser expressos de formas diferentes nos hospedeiros, e manter as infecções persistentes (MAVROMATIS et al., 2006).

A proteína antigênica de superfície 2 (MAP2) presente na *E. canis*, cuja função é ainda desconhecida, foi clonada e expressada a partir do seu gene, e o seu recombinante (rMAP2) caracterizado e testado pelo teste tipo ELISA, sendo detectada 97,2% de concordância entre este e a RIFI com antígeno total do parasito. Este resultado sugere que a rMAP2 de *E. canis* pode ser utilizada no diagnóstico sorológico da erliquiose canina (ALLEMAN et al., 2001).

Estudos das características antigênicas de *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* revelaram a presença de antígenos imunodominantes de tamanhos similares que compartilham epítomos. Um grupo de antígenos, variando de tamanhos de 27 a 32 kDa, é predominante nesses e em outros membros do Gênero Ehrlichia (REDDY et al., 1998), sendo que variações antigênicas dessas proteínas de superfície de membrana podem estar relacionadas à capacidade dessas bactérias evadirem do sistema imune (McBRIDE et al., 2000a).

A proteína P28 é codificada pelo locus multigênico que têm, pelo menos, 22 alelos do gene p28 (p28-1 a p28-22) no cromossomo da *E. canis* e da *E. chaffeensis* (LONG et al., 2002). Zhang et al. (2004) relataram a detecção de anticorpos contra todas as proteínas P28 em cães infectados com *E. chaffeensis*. Entretanto, Long et al. (2002) acreditam que todos os genes p28 podem ser transcritos, mas não necessariamente expressos. É possível que alterações pós-transcricionais estejam relacionadas no processo de expressão desses genes. A ocorrência de genes múltiplos contendo regiões conservadas e variadas nas Ehrlichias pode resultar em recombinações genéticas levando a variações nos epítomos de superfície (REDDY et al., 1998).

Mecanismos imunes contra *E. canis* envolvem tanto componentes celulares e humorais do sistema imunológico. Imunidade parcial ao desafio tem sido documentada em cães que se recuperaram da erliquiose canina aguda e crônica grave (BUHLEs et al., 1974), mas um estudo mais recente sugere que a infecção por *E. canis* não confere imunidade contra a reinfeção e uma redução de sinais clínicos (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998). Foi relatado que anticorpos podem suprimir o crescimento de *E. canis in vitro* (LEWIS et al., 1978), e as evidências suportando um papel importante para o anticorpo em imunidade a infecções por Ehrlichia foram demonstradas em trabalhos em que a transferência passiva de anticorpos forneceu proteção contra infecção letal por *E. chaffeensis* em ratos jovens SCID (WINSLOW et al.,

2000). Estudos adicionais relatam que os anticorpos contra epítomos lineares específicos em p28, localizadas numa região hipervariável, medeiam esta proteção (LI et al., 2002). Embora a cinética de respostas de anticorpos contra proteínas imunorreativas individuais de *E. canis* não foram relatadas, as respostas de anticorpos séricos para todo antígeno em cães com infecções experimentais e naturais por *E.canis* consistem principalmente de imunoglobulina G2 (IgG2) (HARRUs et al., 2001).

Numerosas proteínas que contêm repetições em tandem foram identificadas em *E. canis* (n = 12) e *E.chaffeensis* e *E. ruminantium* (n = 31) (COLLINS et al., 2005). Notavelmente, três proteínas imunorreativas com repetições em tandem foram identificadas e caracterizadas molecularmente em *E. chaffeensis* (gp120, gp47, e de comprimento variável alvo da PCR [VLPT]), bem como dois ortólogos de *E. canis* (gp140 e gp36). O ortólogo do gene VLPT de *E. chaffeensis* não foi identificado em *E. canis* ou outros genomas de Ehrlichia (DUNNING HOTOPP et al., 2006). Uma grande variabilidade no número e / ou uma sequência de repetições em série nas proteínas imunorreativas (gp120, gp47, e VLPT), de *E. chaffeensis* bem como gp36 de *E. canis* está bem documentada (CHEN; CULLMAN; WALKER, 1997, DOYLE et al., 2005). A presença de repetições em tandem em ambas as regiões, codificantes e não codificantes, do genoma tem sido associada a um processo ativo de expansão e redução dos genomas de Ehrlichia (FRUTOS et al., 2006) e é considerada uma das principais fontes de mudança e instabilidade genômica (BZYMEK et al., 2001).

As sequências genéticas da região 16S rRNA DNA caracterizam-se por sua estabilidade e, portanto, são úteis em métodos diagnósticos moleculares direcionadas à detecção de gêneros de bactérias. Entretanto, essa propriedade limita os resultados quando se pretende caracterizar espécies ou variantes dentro de um mesmo gênero. Para superar essa limitação e investigar mais

detalhadamente as amostras circulantes de *E. canis* coletadas, o presente projeto propõe uma análise molecular, por meio de sequenciamento direto de produto de PCR, de parte do gene da glicoproteína de superfície gp200 deste parasito, que se apresenta mais variável.

Por meio dessa estratégia, Huang et al. (2010) demonstraram a ocorrência de variante específica em Taiwan, diferenciando-as de isolados brasileiros, israelenses e americanos, o que não havia sido evidenciado nas análises da região gênica 16S rRNA. O grau de identidade entre as amostras taiwanesas e as demais disponíveis no Genbank, em relação a essa região, ficou entre 99% a 100%. Já em relação às sequências de GP200 houve variação de até 6,3% e permitiu a formação de agrupamento distintos das amostras taiwanesas na árvore filogenética construída.

Em outro estudo foi analisada a variabilidade genética e antigênica de quatro glicoproteínas que contém epítomos imunodominantes de *E. canis* (ZHANG et al., 2008). Foram comparadas as sequências das glicoproteínas gp19, gp36, gp140 e gp200, de uma amostra de origem americana, uma brasileira e duas israelenses, onde foi observada maior variabilidade nos GP36 e GP200. Os autores também constataram uma maior afinidade antigênica e genética entre as amostras americana e brasileira, que se distanciaram das amostras israelenses. Por esse trabalho é possível concluir que o uso de análise genética de GP200 é uma forma viável para se caracterizar variações regionais em isolados de *E. canis*.

Esta ideia é reforçada pela caracterização de variação genética em outra glicoproteína de isolado brasileiro, mas não na região 16S rRNA. Segundo Aguiar et al. (2008), um isolado de *Ehrlichia canis* de cão naturalmente infectado, oriundo do município de São Paulo, SP, apresentou sequência parcial dos genes *dsb* e 16Sr RNA idênticas a três e cinco sequências respectivamente, de *E. canis* provenientes de diferentes países e continentes (América do Norte,

África, Ásia e Europa). Contrariamente, a sequência parcial do gene *p28* do isolado São Paulo diferiu em um nucleotídeo do isolado Jake (EUA) e dois nucleotídeos dos isolados Oklahoma (EUA) e VHE (Venezuelan Human *Ehrlichia*, Venezuela).

O gene de *E. canis* GP200 é composto por 4.263pb e origina um polipeptídeo com 1.421 aminoácidos. Quatro sub-regiões gênicas foram caracterizadas: porção N-terminal (terminação amina), com 1.107pb; porção interna amina (N), com 910pb; porção interna carboxila (C), com 1.000 pb e porção C-terminal (terminação carboxila), com 1.280pb (NETHERY et al., 2007).

Segundo esses autores, o produto dessas sub-regiões gênicas é um polipeptídeo com três regiões que são reconhecidas fortemente por anticorpos (consideradas regiões imunodominantes): sequências peptídicas N-terminal, C-interno e C-terminal, com 369, 332 e 426 aminoácidos, respectivamente. Outro estudo demonstrou que existe uma associação entre uma forte imunidade contra essa glicoproteína e outras glicoproteínas de *E. canis* e a fase de convalescença da doença. Provavelmente, a imunidade contra gp200 é importante para a recuperação dos animais e, possivelmente, para a prevenção, caso utilizado em vacinas (McBRIDE et al., 2001; McBRIDE et al., 2003). Esses dados reforçam o interesse no estudo genético de GP200 de amostras brasileiras, uma vez que caracterizam esta glicoproteína como eletiva para imunização e para atuar como antígeno em testes imunodiagnósticos.

A evolução tecnológica que ocorreu no campo da microbiologia para a detecção e identificação de microrganismos, utilizando técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), inaugurou uma nova era com relação ao diagnóstico e pesquisa das doenças infecciosas. Dentro dessa linha, os genes de rRNA (rRNA DNA) são particularmente adequados para fins de identificação bacteriana, já que são onipresentes nesses microrganismos. Essas

sequências de DNA são bastante conservadas dentro de um mesmo gênero bacteriano, mas diferem significativamente entre espécies de bactérias de gêneros diferentes (FENOLLAR; RAOULT, 2004; HARRUS; WANER, 2011).

Dessa forma, para a identificação em nível de gênero, é possível o uso de PCR direcionada para amplificação de segmentos do gene 16S rRNA (GREISEN et al., 1994). Entretanto, essa propriedade limita os resultados quando se pretende caracterizar espécies ou variantes dentro de um mesmo gênero. Para superar essa limitação e investigar mais detalhadamente as amostras circulantes de *E. canis* coletadas, o presente projeto também propõe uma análise molecular, por meio de sequenciamento direto de produto de PCR, de parte do gene da glicoproteína de superfície gp200 desse parasito, que se apresenta mais variável (AGUIAR et al., 2008; HUANG et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- a) Determinar a frequência de cães expostos a infecção por *E. canis* e correlacionar o *status* sorológico com algumas variáveis epidemiológicas, parâmetros hematológicos e sinais clínicos, de uma população canina atendida em clínica particular e no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a frequência de cães expostos a infecção por *E. canis*, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).
- b) Correlacionar a soropositividade com algumas variáveis epidemiológicas, em cães naturalmente expostos a infecção por *E. canis*.
- c) Determinar a interferência da soropositividade sobre os valores de eritrograma, leucograma e plaquetometria, em cães naturalmente expostos a infecção por *E. canis*.
- d) Avaliar o efeito da soropositividade sobre a frequência de sinais clínicos, em cães naturalmente expostos a infecção por *E. canis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo e população experimental

Este estudo observacional de corte transversal foi realizado no município de Lavras (21° 14 S - 45° 00') localizado na região Sul do Estado de Minas Gerais (Figura 1), possui uma população estimada em 92.200 habitantes (IBGE, 2010). Na ausência de um censo específico no município de Lavras, o número de cães estimado é de 13.171 animais, utilizando a quantidade de habitantes como indicador do tamanho da população canina, na proporção de um cão para cada sete moradores na área urbana (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1990).

Amostras de sangue de 161 cães foram coletadas de forma aleatória e por conveniência no período de setembro de 2011 a março de 2012, em animais de diferentes raças e idades, ambos os sexos, e atendidos em clínica particular e no Hospital Veterinário da UFLA, independente do que tenha motivado a consulta. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFLA e registrado na instituição sob o número 018/2011 (Anexo A).

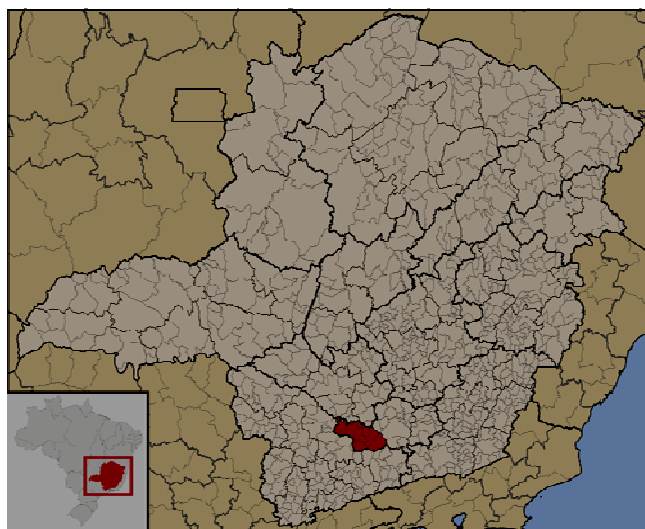


Figura 1 Mapa de Minas Gerais e em destaque o município de Lavras (em vermelho)

4.2 Coleta e processamento das amostras

Após antissepsia, três tubos, com capacidade para 3mL de sangue cada, foram coletados de cada cão, por venopunção cefálica ou jugular, com agulhas estéreis e descartáveis para tubos a vácuo. Um tubo de sangue com anticoagulante (EDTA a 1%) foi utilizado para realização do hemograma completo (eritrograma e leucograma) e plaquetometria, outro sem anticoagulante para RIFI, e o terceiro, com anticoagulante, para a confecção de esfregaços a partir do concentrado leucocitário (“capa de leucócitos”). As amostras de sangue utilizadas na sorologia, após a coagulação, foram centrifugadas a 500 g por 10 minutos, os soros foram identificados individualmente e mantidos congelados em criotubos estéreis de 1,5 mL a -20 °C, até o momento de proceder à sorologia.

O exame citológico e a RIFI foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. Já o

hemograma completo (volume globular, hematimetria, hemoglobinometria, leucometria global e específica, hematoscopia e leucocitoscopia) e a plaquetometria foram realizados por método automatizado em laboratório de patologia clínica situado no município de Lavras.

Após o exame clínico, o proprietário respondeu a um questionário referente ao cão sobre: a origem, residência, sexo, raça, idade, frequência de tratamentos acaricidas, infestações anteriores ou atuais de carrapatos, histórico de erliquiose canina e suspeita clínica de erliquiose canina, que compuseram uma ficha individual para cada animal (Anexo B).

4.3 Exame do concentrado leucocitário

Esfregaço sanguíneo, preparado a partir do concentrado leucocitário (“capa de leucócitos”), obtido após a centrifugação do sangue total em tubos de microhematócrito, e corado pelo *kit* Panótico rápido (Laborclin[®]), foi utilizado para detectar a presença de mórula em monócitos e linfócitos. Optou-se por essa técnica por ser mais sensível que o esfregaço sanguíneo preparado a partir de sangue total na pesquisa de mórulas em leucócitos (MYLONAKIS et al., 2003). Para cada cão foram preparadas duas lâminas, e o animal foi considerado positivo se pelo menos uma mórula foi identificada em monócitos ou linfócitos, após o exame de ambos os esfregaços sanguíneos por meio de microscopia óptica, realizando-se a leitura total das lâminas, utilizando objetiva com aumento de 100 vezes (Olympus[®]).

4.4 Sorologia

A frequência de cães expostos à infecção por *E. canis* foi determinada por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Essa técnica é

considerada como teste sorológico de referência (“padrão ouro”) para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia*, e tem sido utilizada na avaliação de outros testes de diagnóstico (WANER et al., 2001). A RIFI foi realizada conforme descrito por Ristic et al. (1972) e usou-se como antígeno o isolado Jaboticabal/SP de *E. canis* fixado em lâminas de imunofluorescência, com 12 cavidades/cada, adquiridas do Laboratório Imunodot (Jaboticabal/SP, Brasil).

As amostras de soros foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas e diluídas em solução de PBS (sendo 1 µL de soro para 79 µL de PBS) e distribuídas (10 µL/cavidade) nas lâminas com antígeno de *E. canis*. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas em estufa a 37°C por 45 minutos, e em seguida lavadas três vezes com PBS (5 min. cada) e após uma lavagem por 5 min. com água destilada.

Após a secagem das lâminas à temperatura ambiente, foi acrescentado o conjugado de anti-IgG de cão (Sigma Aldrich®) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), previamente diluindo conforme orientação do fabricante em PBS Tween a 2%, na quantidade de 10 µL por cavidade nas lâminas. As lâminas foram novamente incubadas por 45 min. e após serem submetidas ao processo de lavagem como descrito anteriormente, foram secas em temperatura ambiente e cobertas com glicerina tamponada a 10%. Em cada lâmina foram incluídos controles positivos e negativos. A leitura das lâminas foi realizada sempre pela mesma pessoa em microscópio epifluorescente utilizando objetiva de 40x e considerou-se como positivo (*cut off*) a diluição inicial de 1:80, quando observou-se completa fluorescência de mórulas intracitoplasmáticas de *E. canis* (SOUZA et al., 2010).

4.5 Análise estatística

A soroprevalência obtida por meio da RIFI foi determinada com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). A avaliação da associação entre a soropositividade para *E. canis* e os resultados do eritrograma, leucograma e plaquetometria, foi determinada por meio do teste de Qui-quadrado (χ^2).

Na análise estatística, para identificar os fatores epidemiológicos e os sinais clínicos associados à infecção por *E. canis* entre os cães, utilizou-se os resultados sorológicos obtidos por meio da RIFI como variável dependente e as variáveis coletadas nas entrevistas e os sinais clínicos mais comuns como variáveis independentes. Assim, a variável dependente foi transformada em dicotômica (0-negativo; 1-positivo) e foi feita a análise univariada por meio do teste de qui-quadrado (χ^2). As variáveis que mostraram associação com $p < 0,02$ pelo teste de χ^2 ou Exato de Fischer (menos de cinco observações em pelo menos uma célula da tabela de contingência) foram selecionadas para a construção do modelo múltiplo. Foi calculado o risco por meio da *Odds Ratio* (OR) ajustada e seu intervalo de confiança a 95% para aquela variável que apresentou associação significativa ($p < 0,05$) na regressão logística.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil da população canina experimental

De acordo com a tabela 1, a maioria dos membros da população canina analisada (161 cães) era composta por machos (58,4%), adultos (76,4%), sem raça definida (54,0%), e provenientes de domicílios da área urbana de Lavras (86,3%).

5.2 Exame citológico

Foram realizados esfregaços sanguíneos, a partir do concentrado leucocitário (“capa de leucócitos”), de todas as amostras de sangue coletadas e observou-se a presença de mórula de *E. canis* em 1,9% (3/161) dos cães.

5.3 Exame sorológico e variáveis epidemiológicas

Dos 161 cães submetidos à RIFI, 38 (23,6%) apresentaram anticorpos anti-*E. canis*, sendo a maioria dos animais soropositivos composta por machos (52,6%), adultos (71,1%), sem raça definida (52,6%), criados em área urbana (89,5%), e com o acesso restrito à rua (65,8%). Entretanto, nenhuma das variáveis epidemiológicas testadas apresentou associação significativa ($p>0,05$) com a soropositividade dos cães para *E. canis*. De acordo com a Tabela 2, a maioria dos cães (57,9%) apresentou título 80, sendo que apenas três animais (7,9%) exibiram título 1280.

Tabela 1 Fatores epidemiológicos associados à soropositividade por *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Fatores risco		Nº de cães examinados			Valor de P ¹
		n	soropositivos	%	
Sexo	Macho	67	20	29,8	0,115
	Fêmea	94	18	19,1	
Idade	Jovem	38	11	28,9	0,375
	Adulto	123	27	21,9	
Raça definida	Sim	74	18	24,3	0,842
	Não	87	20	23,0	
Área de criação	Urbana	139	34	24,5	0,601
	Rural	22	4	18,2	
Local de criação	Casa	103	26	25,2	-
	Apartamento	10	0	0	0,113
	Outro	34	9	26,5	0,887
Forma de criação	Sem acesso à rua	28	7	25,0	-
	Acesso livre à rua	29	6	20,7	0,698
	Acesso controlado à rua	104	25	24,0	0,916
	Não	99	22	22,2	

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, ¹Teste de Qui-quadrado, n= número de cães analisados.

Tabela 2 Frequência de títulos de anticorpos anti-*E. canis*, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 80), em 38 cães soropositivos* atendidos em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Título final	Nº de cães	Frequência (%)
80	22	57,9
160	02	5,3
320	09	23,7
640	02	5,3
1280	03	7,9

*38/161= 23,6% de cães soropositivos para *E. canis*.

5.4 Parâmetros hematológicos e plaquetometria

Com relação ao eritrograma e plaquetometria (Tabela 3), e leucograma (Tabela 4), não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de

mediana desses parâmetros hematológicos em função do *status* sorológico dos cães; ou seja, não houve associação com a soropositividade para *E. canis*.

Tabela 3 Mediana e quartis (Q) dos parâmetros de eritrograma e plaquetometria, de acordo com o *status* sorológico para *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Parâmetros hematológicos*	Cães soropositivos	Cães soronegativos	Valor de P**	Valores de referência***
Hemácias (milhões/mm ³)	5,66 (Q1= 4,09; Q3= 6,67)	6,11 (Q1= 5,04; Q3=7,04)	0,084	5,5 a 8,5
Hematócrito (%)	33,2 (Q1= 25; Q3= 45,6)	40,3 (Q1= 32,6; Q3= 47,6)	0,18	37 a 55
Hemoglobina (g/dL)	13 (Q1= 9,0; Q3= 16,2)	13,9 (Q1= 11,2; Q3= 17,1)	0,123	12 a 18
VCM (fL)	69,8 (Q1= 66,4; Q3= 72,6)	68,4 (Q1= 65,8; Q3= 71,7)	0,488	60 a 77
HCM (pg)	23,7 (Q1= 22,6; Q3= 24,7)	23,4 (Q1= 22,6; Q3= 24,5)	0,475	19 a 24
CHCM (%)	34,1 (Q1= 33,5; Q3= 35)	34,2 (Q1=33,5; Q3= 35)	0,922	31 a 36
Plaquetas (mil/mm ³)	169 (Q1= 88; Q3= 265,5)	181 (Q1= 92; Q3= 271)	0,477	200 a 500

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, VCM = Volume corpuscular médio, HCM= Hemoglobina corpuscular média, CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média, *Ausência de normalidade dos dados pelo teste de Kolgomorov-smirnov, **Teste de Mann-Whitney, ***Jain (1993).

Tabela 4 Mediana e quartis (Q) de parâmetros do leucograma, de acordo com o *status* sorológico para *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Parâmetros hematológicos*	Cães soropositivos	Cães soronegativos	Valor de P**	Valores de referência***
Leucócitos totais (mil/mm ³)	13,0 (Q1= 8,5; Q3= 17,6)	11,6 (Q1= 8,3; Q3= 17)	0,750	6,0 a 11,0
Neutrófilos (Segmentados) (mil/mm ³)	61,5 (Q1= 51,7; Q3= 74,5)	65,00 (Q1= 54,0; Q3= 78,0)	0,250	60 a 77
Linfócitos (mil/mm ³)	28,5 (Q1= 18,7; Q3= 42,2)	28,0 (Q1= 15,0; Q3= 39,0)	0,803	12 a 30

“continua”

Tabela 4 “conclusão”

Parâmetros hematológicos*	Cães soropositivos	Cães soronegativos	Valor de P**	Valores de referência***
Monócitos (mil/mm ³)	3,5(Q1=1,7; Q3=7,0)	3,0(Q1=2,0; Q3=6,0)	0,979	3 a 10
Eosinófilos (mil/mm ³)	1,0 (Q1= 0; Q3= 7,2)	2,0(Q1= 0; Q3= 7,0)	0,235	2 a 10
Bastonetes	3,0 (Q1= 0,0; Q3= 8,25)	1,0 (Q1= 0,0; Q3= 3,0)	0,045	0 a 2

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, *Ausência de normalidade nos dados pelo teste de Kolgomorov-smirnov, **Teste de Mann-Whitney, ***Jain (1993).

De acordo com a Tabela 5, não foi observado associação significativa ($p>0,05$) entre a soropositividade para *E. canis* e ocorrência de anemia, trombocitopenia, leucopenia ou leucocitose. Da mesma forma, não houve associação significativa ($p>0,05$) entre o *status* sorológico dos cães e a magnitude da anemia e trombocitopenia, conforme consta nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Conforme a Tabela 8, houve um número maior de cães soropositivos com trombocitopenia (13) e anemia (7) que apresentavam título final considerado baixo (1:80). Em cães soropositivos, com título final considerado alto (entre 320 e 1280), o número de animais com quadros de anemia e trombocitopenia foi igual (6).

Tabela 5 Frequência de anemia, trombocitopenia, leucopenia e leucocitose, de acordo com o *status* sorológico para *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Alterações Hematológicas	Cães soropositivos (%)	Cães soronegativos (%)	Total (%)	Valor de P*
Anemia	18 (27,2)	48 (72,7)	66 (40,9)	0,374
Não anêmico	17 (20,9)	64 (79,0)	81 (50,3)	
Trombocitopenia	20 (25,3)	59 (74,6)	79 (49,0)	0,644
Não trombocitopênico	15 (22,0)	53 (77,9)	68 (42,2)	
Leucograma normal	11 (19,2)	46 (80,7)	57(35,4)	-
Leucopenia	04 (26,6)	11 (73,3)	15 (9,3)	0,499
Leucocitose	20 (26,7)	55 (73,3)	75 (46,5)	0,323

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, *Teste de Qui-quadrado.

Tabela 6 Frequência de magnitude da anemia em 66 cães, soropositivos (+) ou soronegativos (-) para *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Anemia (hemácias/milhões /mm ³)	Cães + (%)	Cães - (%)	Total (%)	Valor de p*	Odds ratio	IC (95%)
Leve (<5,5 a 4,1)	9 (21,4)	33 (78,6)	42 (26,0)	-	1	-
Moderada** (<4,1 a 2,75)	8 (47,0)	9 (53,0)	17 (10,5)	0,049	3,259	0,9 - 10,9
Grave** (<2,75 a 1,4)	1 (14,3)	6 (86,0)	07 (4,3)	1,000	0,611	0,06 - 5,7

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, *Teste de Qui-quadrado, **Moderada x Grave: p= 0,191.

Tabela 7 Frequência de magnitude da trombocitopenia em 79 cães, de acordo com o status sorológico para *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Trombocitopenia (plaquetas/mil/mm ³)	Cães soropositivos (%)	Cães soronegativos (%)	Total (%)	Valor de P*
Leve (<200 a 150)	8 (22,9)	27 (77,1)	35 (21,7)	-
Moderada (<150 a 100)	4 (26,7)	11 (73,3)	15 (9,3)	1,000
Grave (<100 a 50)	2 (18,2)	9 (81,8)	11 (6,8)	1,000
Muito grave (<50)	6 (33,3)	12 (66,7)	18 (11,2)	0,413

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, *Teste de Qui-quadrado.

Tabela 8 Ocorrência de anemia, trombocitopenia e leucopenia, de acordo com titulação final por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 80), em 38* cães soropositivos para *E. canis*, atendidos em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Titulação	Anemia	Trombocitopenia	Leucopenia	Total
80	7	13	2	22
160	1	1	0	02
320	3	4	1	08
640	1	1	0	02
1280	2	1	1	04

*38/161= 23,6% de cães soropositivos para *E. canis*.

5.5 Achados clínicos

Na Tabela 9, encontram-se os resultados da análise univariada do teste de qui-quadrado, em que a desidratação e a prostração foram os únicos sinais clínicos que apresentaram associação significativa ($p < 0,05$) para os cães soropositivos em comparação aos animais soronegativos. Após os ajustamentos, por meio da regressão logística, apenas a prostração se manteve associada significativamente com a soropositividade por *E. canis* ($p = 0,02$; OR = 3,742; IC 95% = 1,22-11,46).

Tabela 9 Frequência de sinais clínicos, de acordo com o *status* sorológico para *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Sinais clínicos**	Soropositivos (%)	Soronegativos (%)	Total (%)	Valor de P* ¹
Alterações intestinais	3 (30,0)	7 (70,0)	10 (6,2)	0,701
Alterações oculares	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (3,1)	0,086
Alterações pulmonares	7 (36,8)	12 (63,2)	19 (11,8)	0,148
Desidratação	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (2,4)	0,003
Emagrecimento	4 (25,0)	12 (75,0)	16 (9,9)	1,000
Epistaxe	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (0,62)	0,236
Esplenomegalia	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (0,62)	1,000
Febre	2 (5,3)	1 (8,0)	3 (1,86)	0,139
Hiporexia	6 (40,0)	9 (60,0)	15 (9,3)	0,116
Linfadenomegalia	3 (33,3)	6 (66,7)	9 (5,5)	0,442
Mucosas pálidas	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (2,4)	0,237
Prostração	7 (50,0)	7 (50,0)	14 (8,6)	0,015

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, *¹Teste de Qui-quadrado, **Sinais clínicos concomitantes

5.6 Presença de carrapatos em cães e no homem

Conforme a Tabela 10, a presença de carrapatos no momento do exame clínico, bem como, o número de tratamentos acaricidas não apresentou associação significativa ($p > 0,05$) com a soropositividade dos cães para *E. canis*.

Resultado similar foi observado em relação a pessoas que observaram carrapatos fixados a pele, assim como, ao tempo dedicado ao lazer com os cães, que também não apresentaram associação ($p>0,05$) com o *status* sorológico desses animais (Tabela 11).

Tabela 10 Relação da presença de carrapatos e do número de tratamentos acaricidas com a soropositividade para *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Variável		Cães			Valor de P ¹
		n	Soropositivos	%	
Presença de carrapato durante o exame clínico	Sim	40	9	22,5	0,850
	Não	121	29	24,0	
Historio de infestação por carrapatos nos últimos 12 meses*	Sim	122	32	26,2	0,454
	Não	26	5	19,2	
Número de tratamentos acaricidas nos últimos 12 meses	≤ 6 /ano	75	16	21,3	1,000
	> 6 /ano	14	3	21,4	
	Não tratou	72	16	22,2	

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, ¹Teste de Qui-quadrado, n= número de cães analisados, *13 proprietários não souberam informar.

Tabela 11 Relação da presença ou não de carrapato no homem e do tempo dedicado ao lazer com a soropositividade para *E. canis* (RIFI ≥ 80), em uma população canina atendida em clínica e hospital veterinário de Lavras, MG

Variável		Cães			Valor de P ¹
		n	Soropositivos	%	
Observaram carrapatos fixados na pele nos últimos 12 meses*	Sim	32	8	25,0	0,813
	Não	70	16	22,8	
Tempo de lazer dedicado ao cão	≤ 7 h/semana	82	18	21,9	0,871
	> 7 h/semana	34	7	20,6	
	Não dedicou	45	10	22,2	

RIFI= Reação de imunofluorescência indireta, ¹Teste de Qui-quadrado, n= número de cães analisados, *59 proprietários não souberam informar.

6 DISCUSSÃO

6.1 Frequência de cães com citologia positiva para *E. canis*

No presente trabalho, a presença de mórulas compatíveis com *E. canis* foi observada em um número muito pequeno de cães, correspondendo aproximadamente 2% dos animais examinados (3/161). Fato similar foi observado por Rodriguez-Vivas, Albornoz e Bolio (2005), no México, e Vargas-Hernández et al. (2011), na Colômbia, que relataram a presença de mórulas de *E. canis* em apenas 4,2 (5/120) e 4,4% (4/91) dos cães analisados, respectivamente.

Meneses et al. (2008), em Salvador, BA, em uma população suspeita para EMC, observaram inclusões sugestivas de corpúsculos elementares e mórulas de *E. canis* no citoplasma de células mononucleares em 5,3% (4/75) dos cães. Ueno et al. (2009), em Botucatu, SP, também analisando uma população suspeita para EMC, relataram o encontro de mórulas de *E. canis* em 7,1% (5/70) dos cães. Faria et al. (2010), em Jaboticabal, SP, também utilizando cães com suspeita clínica para EMC, porém, examinando esfregaços sanguíneos confeccionados a partir de aspirados do baço e da “capa leucocitária”, observaram a presença de mórulas de *E. canis* em 48,6% (17/35) e 5,7% (2/35), respectivamente. De acordo com alguns pesquisadores o baço pode ser o abrigo para *E. canis* por períodos mais longos se comparado ao tempo que a bactéria permanece na corrente sanguínea (FOLEY et al., 1999; HARRUS et al., 2004).

Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), em Uberlândia, MG, baseado em um levantamento da casuística natural de atendimentos de cães do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, relataram que de 4.407 cães atendidos, 251 (5,7%) eram portadores de mórulas de *Ehrlichia* spp.

Apesar da facilidade de execução e baixo custo, esse exame tem apresentado baixa sensibilidade e relativa baixa especificidade, o que pode ser justificado pela flutuação parasitêmica de *Ehrlichia* spp. (ELIAS, 1991). A visualização microscópica de mórulas de *Ehrlichia* spp. no interior de leucócitos ocorre principalmente durante a fase aguda da doença e em aproximadamente 4% dos casos (WANER; HARRUS, 2001).

6.2 Frequência de cães expostos à infecção por *E. canis*

Das amostras de soro canino submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 80), 23,6% apresentaram anticorpos anti-*E. canis* (38/161). Resultado similar foi observado por Trapp et al. (2006), em Londrina, PR, que utilizando uma população canina hospitalar, encontraram 23,0% (87/381) de cães soropositivos para *E. canis* (RIFI ≥ 80). Do mesmo modo, no presente estudo, a frequência de cães expostos a infecção por *E. canis* está dentro da faixa observada por outros trabalhos realizados no Brasil, com valores variando entre 14 a 45% de cães soropositivos para populações atendidas em hospitais e clínicas veterinárias (DAGNONE et al., 2003).

Neste estudo, o título final dos cães soropositivos, variou entre 80 a 1280, permitindo especular que esses animais apresentavam infecção subclínica no momento da consulta, porém, com títulos baixos, por se tratar de infecção natural por *E. canis*, e provável estabilidade endêmica. Esse resultado está coerente com o perfil da população canina amostrada, constituída predominantemente de animais aparentemente saudáveis e sem suspeita clínica de erliquiose canina. Entretanto, cães infectados experimentalmente, que se recuperaram da infecção aguda e evoluíram para a forma subclínica, assintomática, apresentaram títulos altos de IgG anti-*E. canis* entre 2.560 e 20.480, indicando uma infecção de duração prolongada e estimulação antigênica

persistente (WANER et al., 2001). Esses títulos altos podem se manter em cães que passam para a fase crônica da infecção, mas nesse estágio os animais são pancitopênicos, sintomáticos e o prognóstico é grave (BARTSCH e GREENE, 1996).

Desse modo, é importante ressaltar que, embora a sorologia seja útil no diagnóstico da EMC, em áreas endêmicas não é um método de diagnóstico conclusivo, pois os cães podem manter altos títulos de anticorpos anti-*E. canis* durante meses ou anos, mesmo após a eliminação do agente ou de um tratamento mal sucedido (BARTSCH; GREENE, 1996; HARRUS et al., 1998; WANER et al., 2001; NEER et al., 2002; HARRUS; WANER, 2011).

A frequência de cães sororeagentes a *E. canis* em Lavras, MG, ficou abaixo dos resultados observados por Silva et al. (2010) em Cuiabá, MT, 42,5% (108/254) (RIFI ≥ 40), Aguiar et al. (2007) no Estado de Rondônia, 31% (97/314) (RIFI ≥ 40), Azevedo et al. (2011) no semiárido da Paraíba, 72,5% (79/109) (RIFI ≥ 40), e Souza et al. (2010), em Salvador, BA, 35,6% (168/472) (RIFI ≥ 80). Costa Júnior et al. (2007), em cães provenientes de áreas rurais do Estado de Minas Gerais, encontraram prevalências (RIFI ≥ 40) acima da observada no presente estudo, nos municípios de Nanuque (65,6%; 66/101) e Belo Horizonte (37,8%; 38/101), mas similar em Lavras (24,7%; 25/101). Porém, Saito et al. (2008), no Rio Grande do Sul, observaram uma prevalência de 4,8% (19/389) (RIFI ≥ 40), bem abaixo da observada no presente estudo.

A prevalência da EMC varia de acordo com as condições climáticas (KEEFE et al., 1982), e devido a fatores epidemiológicos, tais como diferenças na distribuição do carrapato vetor, média de idade dos cães, práticas de manejo e habitat dos animais, e método e ponto de corte utilizado na detecção do agente (HARRUS; WANER, 2011; RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005; SAINZ et al., 1996; VIEIRA et al., 2011). Assim, Diniz et al. (2007) e Nakaghi et al. (2008) utilizando uma população suspeita para EMC nos

municípios de Jaboticabal e Botucatu, SP, observaram uma prevalência de 63,3 (19/30; RIFI ≥ 20) e 73,2% (145/198; RIFI ≥ 64), respectivamente. Essas prevalências tão altas podem ser justificadas pela utilização de uma população amostral com suspeita clínica de EMC, aumentando a possibilidade de encontrar cães com anticorpos anti-*E. canis*. No presente estudo, realizado em Lavras, MG, a frequência de cães com anticorpos anti-*E. canis* ficou bem abaixo desses trabalhos, por se tratar de um estudo epidemiológico, onde a maioria dos animais são aparentemente sadios, evidenciando o aspecto subclínico dessa infecção, sendo que nessa fase a ausência de sinais é evidente (WANER et al., 1997).

No Brasil, diferentes soroprevalências são observadas entre Estados do Nordeste e do Sul. As taxas de infecção por *E. canis* apresentam variação de uma região para outra, sendo maiores nas áreas tropicais e subtropicais, provavelmente devido à melhor adaptação do carrapato *R. sanguineus* ao clima quente e úmido (LABRUNA et al., 2007; WINKLER et al., 1988).

Assim, esses levantamentos sorológicos citados anteriormente, tal como nesta pesquisa, utilizando populações caninas com perfis bem variados, não levando em consideração fatores epidemiológicos como idade, sexo e sistema de criação dos cães, e trabalhando com pontos de corte diferentes, dificulta a comparação dos resultados entre os estudos, incluindo esse realizado no município de Lavras, MG.

Embora considerando que *E. canis* seja a principal causa de erliquiose canina no Brasil, não se pode excluir a possibilidade de infecção por *E. ewingii*, já que essa espécie, por meio da nested-PCR, foi encontrada em 5% (5/100) dos cães em Viçosa, MG, (OLIVEIRA et al., 2009). Na América do Norte, *E. ewingii* tem com vetor *Amblyomma americanum*, espécie que não é comum na América do Sul, porém, essa bactéria foi encontrada infectando cães e *R. sanguineus* nos EUA (MURPHY et al., 1998).

6.3 Fatores epidemiológicos associados à infecção por *E. canis*

Não foi observada associação significativa ($p > 0,05$) do *status* sorológico dos cães para *E. canis* com nenhuma das variáveis epidemiológicas avaliadas neste estudo, como por exemplo, idade, sexo e raça. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2010), que também não observaram associação ($p > 0,05$) entre idade e soropositividade para *E. canis*. Outros autores, também não observaram associação ($p > 0,05$) entre a infecção por *E. canis* com a idade, sexo ou raça dos cães (CARLOS et al., 2011; HARRUS; WANER; BARK, 1997; RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005; SAITO et al., 2008; SILVA et al., 2010; WATANABE et al., 2004). No entanto, é descrita uma maior gravidade clínica da erliquiose em cães da raça Pastor Alemão, embora não haja uma predisposição dessa raça para a doença, segundo Harrus, Waner e Bark (1997). Também, conforme esses mesmos autores, não há predisposição sexual, ou seja, machos e fêmeas têm igual oportunidade de exposição ao carrapato vetor e se infectarem por *E. canis*.

Entretanto, Rodriguez-Vivas, Albornoz e Bolio (2004), observaram que cães acima de dois anos de idade apresentaram alta associação com a soropositividade para *E. canis* (OR= 6,77; IC=1,76-25,97; $p = 0,005$). Trapp et al. (2006) consideraram que cães com mais de um ano de vida fazem parte do grupo de risco para infecção por esse agente (OR= 5,3; IC= 2,4-11,6; $p = 0,001$). Carlos et al. (2007) também relataram associação entre a idade e soropositividade por *E. canis* (2-5 anos: OR= 2,20; IC= 1,2-4,6; $p = 0,02$; >5 anos: OR= 2,96; IC= 1,5-5,7; $p = 0,001$), que de acordo com os autores, pode ser justificada pelo estado imunológico do hospedeiro ou exposição por um longo período ao carrapato vetor *R. sanguineus*, o que aumentaria a probabilidade de adquirir a infecção com o aumento da idade.

No presente estudo, não foi observado associação entre soropositividade a *E. canis* e acesso ou não dos cães a rua. Porém, segundo Silva et al. (2010), os cães com acesso apenas ao intradomicílio apresentaram menor frequência ($p < 0,05$) de infecção por *E. canis*. De acordo com esses autores, provavelmente isso se deve a um menor parasitismo dos cães pelo carrapato vetor, devido ao convívio próximo com seus proprietários, o que gera um maior zelo pelo controle de ectoparasitos (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Azevedo et al. (2011), apontaram o manejo do tipo solto ou semiconfinado como fator de risco para infecção por *E. canis* (OR= 6,24; IC= 1,28-30,39; $p = 0,023$), o que pode ser justificado pelo maior risco de contato dos cães com o carrapato *R. sanguineus*.

Neste estudo, não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) na soropositividade para *E. canis* entre cães oriundos de área urbana ou zona rural, embora, apenas quatro animais reagentes habitassem propriedades rurais, enquanto 34 eram de área urbana. Todavia, resultados similares foram relatados em outros estudos (MELO et al., 2011; SAITO et al., 2008; SILVA et al., 2010).

De acordo com Carlos et al. (2007), o ambiente rural, onde a situação socioeconômica dificulta o controle do carrapato vetor *R. sanguineus*, apresenta maior risco de infecção (RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005), embora esse ixodídeo seja mais abundante em áreas urbanas do Brasil (LABRUNA; PEREIRA, 2001; SZABÓ et al., 2001).

6.4 Parâmetros hematológicos

Na EMC, os achados laboratoriais mais frequentemente observados, também variam de acordo com a fase clínica, contudo, muitas vezes, repetem-se com maior ou menor intensidade.

6.4.1 Eritrograma e plaquetometria

Com relação aos parâmetros hematológicos e plaquetometria, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os cães com ou sem anticorpos anti-*E. canis*, embora, a trombocitopenia seja considerado o achado hematológico mais consistente em animais infectados por esse agente (ALMOSNY et al., 2000; AIELLO et al., 2001; ASGARALI et al., 2012; COUTO et al., 2003; DAGNONE et al., 2003; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2005). Esse resultado pode ser explicado, em parte, devido ao fato de se tratar de um estudo epidemiológico, onde a maioria dos cães é assintomática, evidenciado o aspecto subclínico dessa infecção (WANER et al., 1997). Durante essa fase, uma trombocitopenia branda pode estar presente na ausência de sinais clínicos. Assim, é importante ressaltar que, na maioria dos estudos em que houve associação da soropositividade com a trombocitopenia, a população amostral era composta de animais com suspeita clínica para EMC, onde os sinais clínicos são evidentes na fase aguda e crônica (HARRUS; WANER; BARK, 1997).

Em relação ao presente estudo, a frequência e a magnitude da anemia não apresentaram associação significativa ($p>0,05$) com o *status* sorológico dos cães para *E. canis*, sendo que de 66 animais com anemia, 18 (27,2%) eram soropositivos. Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), em Uberlândia, MG, trabalhando com uma população canina suspeita de infecção por *E. canis*, em que foram levadas em consideração as fichas clínicas e laboratoriais dos cães que apresentavam mórula de *Ehrlichia* spp., observaram que 82,3% (167/203) dos cães apresentaram anemia. Santos et al. (2009), em Ribeirão Preto, SP, observaram que 66,3% (57/86) dos cães positivos pela PCR apresentavam trombocitopenia. Porém, Dagnone et al. (2003), encontraram 20% (12/61) dos animais infectados por *E. canis* com trombocitopenia e quatro de 19 (21%)

animais anêmicos positivos para esse agente, resultados mais próximos aos observados no presente estudo.

Moreira et al. (2005), em Belo Horizonte, MG, realizaram hemograma e plaquetometria em 50 cães com mórulas no esfregaço sanguíneo, dos quais 70,3% (35) apresentaram anemia e 50% (25) trombocitopenia. Carlos et al. (2011), no Sul da Bahia, utilizando dot-ELISA como técnica de diagnóstico, relataram que cães soropositivos frequentemente estão anêmicos (53,8%; 42/78; $p \leq 0,01$) e apresentam trombocitopenia (63,2%; 48/76; $p \leq 0,01$), quando comparados aos animais soronegativos. Rodriguez-Vivas, Alborno e Bolio (2005), em Yucatan, Mexico, por meio do dot-ELISA, observaram que trombocitopenia (89,65%; 26/29) estava altamente associada com a soropositividade de cães por *E. canis* ($p = 0,000$, OR= 18,91, IC 95%= 4,47-80,03), resultado similar ao observado por Ueno et al. (2009), em Botucatu, SP por meio da PCR e trabalhando com cães que tiveram um diagnóstico clínico presuntivo de EMC, cujos animais trombocitopênicos (43,8%; 28/64) apresentaram associação significativa ($p = 0,04$) com a positividade para essa *riquétsia*.

Neste estudo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de hematócrito (volume globular), hemoglobina, VCM, HCM e CHCM para os cães reagentes se comparado com os animais soronegativos; resultado similar foi observado para o hematócrito por outros autores (COSTA JÚNIOR et al., 2007; UENO et al., 2009).

De acordo com Macieira et al. (2005) esses resultados contrastantes observados em diferentes estudos com relação ao eritrograma e plaquetometria, podem estar associados ao perfil da população canina amostrada, diferenças na prevalência da doença, ocorrência do carrapato vetor, e peculiaridades das relações parasito-hospedeiro em diferentes regiões do Brasil.

Em relação ao estudo em questão, a falta de associação dos parâmetros hematológicos com o perfil sorológico dos cães, se deve ao fato de utilizar uma população canina constituída predominantemente por cães assintomáticos, ou seja, aparentemente normais e sem sinais clínicos sugestivos de erliquiose canina. Assim, os achados hematológicos foram inespecíficos, ocorrendo tanto anemia e trombocitopenia, quanto valores de eritrograma e plaquetometria dentro da faixa de normalidade para a espécie canina. Anemia, trombocitopenia, e/ou leucopenia são achados frequentes em cães na fase subclínica da EMC (WANER, 2008).

Os mecanismos da trombocitopenia são multifatoriais, como aumento de consumo ou destruição de plaquetas e sequestro de plaquetas no baço (HARRUS et al., 1998). Neste estudo, de 79 cães com trombocitopenia, 59 (74,6%) não apresentavam anticorpos anti-*E. canis*, indicando que, embora seja um achado característico, não é exclusivo da erliquiose canina, podendo estar presente em diferentes enfermidades (DAGNONE et al., 2003). Borin, Crivelenti e Ferreira (2009) relataram que 19,1% dos cães (48/251) com erliquiose apresentaram patologias concomitantes, dentre as quais associações com outros hemoparasitos (12,7%), destacando-se *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. Coinfecções com hemoparasitos já foram verificadas em 9,6% (5/52) dos cães com erliquiose em Belo Horizonte, MG, associadas à presença de *B. vogeli* e *Mycoplasma haemocanis* (MOREIRA et al., 2003). Já O'Dwyer et al. (2006), em Botucatu, SP, observaram que de 222 cães errantes testados, menos de 1% (1/222) apresentou-se coinfestado por *E. canis* e *B. vogeli*.

Assim, no presente estudo, cães soronegativos para *E. canis*, mas com alguma alteração nos parâmetros hematológicos e/ou na plaquetometria, ou seja, apresentando valores abaixo do valor de referência para a espécie canina, provavelmente, podem apresentar uma infecção por outros hemoparasitos, como *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, que são transmitidos pelo

carrapato vetor *R. sanguineus* (GAL et al., 2007; HUA et al., 2000). Do mesmo modo, cães soropositivos para *E. canis* podem apresentar coinfeção por outros hemoparasitos, como *B. vogeli* (TRAPP et al., 2006). De acordo com estudo realizado por Guimarães et al. (2009), utilizando uma população canina atendida em clínicas veterinárias de Lavras, MG, 73,3% dos cães (220/300) foram soropositivos para *B. vogeli* (RIFI $\geq$ 1:80). Esses autores sugerem que Lavras é área endêmica para babesiose canina, corroborando a hipótese de coinfeção dos cães no presente estudo. Anemia e trombocitopenia são alterações hematológicas frequentes na babesiose canina, e cães com coinfeção por *A. platys* apresentam quadros mais graves desses distúrbios (FOGLIA; CAPPIELLO; OLIVA, 2006; GAUNT et al., 2010).

6.4.2 Leucograma

No presente trabalho, não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos parâmetros do leucograma de cães com ou sem anticorpos anti-*E. canis*, exceto para os bastonetes, que apresentaram valores mais elevados ($p= 0,045$) para os animais soropositivos. Os parâmetros do leucograma mantiveram os valores dentro da faixa de normalidade para a espécie canina.

Valores maiores que a faixa considerada normal para a espécie canina se caracteriza como leucocitose e valores menores a leucopenia. O fato de tanto leucopenia como leucocitose poderem ser observados pode ser devido aos diferentes estágios da doença em cães. Na fase aguda da EMC a contagem de leucócitos é variável, na fase subclínica ocorre principalmente leucopenia e na fase crônica ocorre tanto leucopenia como leucocitose (ETTINGER; FELDMAN, 1992; SAITO et al., 2008).

No presente trabalho, observou-se que a frequência de leucopenia (26,6%) e leucocitose (26,0%) foi similar em cães soropositivos. Borin,

Crivelenti e Ferreira (2009) estudando uma população suspeita de infecção por *E. canis* observaram leucopenia em 24,6% (50/203) e leucocitose em 20,2% (41/203) dos cães. Com relato semelhante, Ueno et al. (2009), por meio da PCR, observaram a ocorrência de leucopenia em 32,0% (8/25) dos animais positivos para *E. canis*. Moreira et al. (2003), utilizando esfregaços sanguíneos, observaram leucopenia em 30% (15/50) dos cães positivos. Nakaghi et al. (2008) analisando uma população suspeita para *E. canis*, por meio das técnicas de RIFI, Dot-ELISA e Nested PCR, observaram 50,0% (2/4), 50,0% (2/4) e 100,0% (4/4) dos cães positivos com leucocitose, respectivamente.

Neste estudo, observou-se um aumento significativo ($p= 0,045$) na contagem de bastonetes para os animais soropositivos por *E. canis*, similar ao resultado relatado por Moreira et al. (2003), que por meio de esfregaços sanguíneos, observaram esse achado em 66% (33/50) dos animais.

É importante salientar que a maioria dos estudos, incluindo o presente, utiliza cães infectados naturalmente por *E. canis*, sem saber qual a fase da doença e desconsiderando a influência do *stress* causado pelo parasito no desenvolvimento de alterações secundárias no leucograma, fato que dificulta a comparação dos resultados entre os diferentes trabalhos.

6.5 Achados clínicos

A erliquiose monocítica canina (EMC) apresenta uma gama muito grande de sinais clínicos inespecíficos, que podem variar de acordo com a fase da doença (aguda, subclínica ou crônica), o que dificulta o seu diagnóstico (BREITSCHWERDT, 2004).

Neste estudo, 33,1% (41/124) dos cães já haviam apresentado suspeita clínica de EMC nos últimos 12 meses, segundo seus proprietários (37 não souberam informar), sendo que desses 24,1% (20/83) eram sororeagentes. No

final do exame clínico, 38,5% (62/161) dos cães examinados apresentaram suspeita de EMC, sendo que desses, 25,8% (16/62) eram soropositivos para *E. canis*.

De 38 cães sororeagentes, 16 (42,1%) apresentaram sinais clínicos compatíveis com EMC, e desidratação e prostração foram os únicos sinais associados significativamente ($p > 0,05$) com soropositividade, pelo teste de qui-quadrado (Tabela 8). Posteriormente, realizou-se a regressão logística e a prostração foi o único sinal clínico que apresentou associação significativa com a soropositividade por *E. canis* ($p = 0,02$; OR = 3,742; IC 95% = 1,22-11,46).

Uma infecção experimental de quatro cães com cepa brasileira de *E. canis*, conforme descrito por Buhles, Huxsoll e Ristic (1974), isolada a partir de um cão infectado (UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil), causou meningite não supurativa com presença de manguitos perivasculares de células mononucleares no córtex cerebral, cerebelo e medula espinhal, o que poderia ser responsável pela ocorrência de sinais neurológicos (CASTRO et al., 2004). Trapp et al. (2006), em Londrina, PR, observaram em uma população canina suspeita de EMC a ocorrência de sinais neurológicos em 53,3% (8/15) dos cães soropositivos (dot-ELISA), e houve associação significativa com a soropositividade por *E. canis* ($p = 0,009$; OR = 7,7; IC 95% = 2,1-28,3). No presente trabalho, não se observou a ocorrência de sinais neurológicos, o que pode ser justificado pelo abrandamento dos sinais clínicos na fase subclínica da EMC e o perfil da população canina amostrada.

Meneses et al. (2008), na Bahia, em uma população canina suspeita de EMC, observaram que febre, desidratação, mucosas hipocoradas e petéquias apresentaram associação significativa ($p < 0,05$) com a soropositividade (dot-ELISA) por *E. canis*. Resultado similar foi encontrado por Nakaghi et al. (2008), em Jaboticabal e Botucatu, SP, em uma população canina com sinais clínicos compatíveis com EMC, observaram apatia (60,0%; 18/30), inapetência (56,7%;

17/30), palidez de mucosas (43,3%; 13/30), febre (43,3%; 13/30), linfadenopatia (43,3%; 13/30), esplenomegalia (43,3%; 13/30), hemorragias (33,3%; 10/30), e uveíte (40%; 12/30). Também no presente estudo, alguns sinais clínicos foram comuns aos citados por esses autores, como prostração (50,0%; 7/14), hiporexia (40,0%; 6/15) e emagrecimento (25,0%; 4/16), porém, apenas prostração apresentou associação significativa (na regressão logística) com a soropositividade por *E. canis*.

Ueno et al. (2009), em Botucatu, SP, por meio da PCR, em uma população canina com diagnóstico clínico presuntivo de EMC, observaram que de 29 cães com diarreia, 16 (55,2%) estavam infectados com *E. canis* ($p = 0,05$). No presente trabalho, três cães soropositivos apresentaram alterações intestinais (30,0%; 3/10), mas sem associação significativa ($p > 0,05$) com *E. canis*.

Silva et al. (2010), em Cuiabá, MT, em uma população canina aleatória, observaram os seguintes sinais clínicos em 31 cães soropositivos (RIFI $1 \geq 40$) para *E. canis*: sinais dermatológicos (64,5%; 20), nervosos (3,2%; 1) e oftálmicos (29,0%; 9), linfadenopatia (6,4%; 2), emagrecimento (6,4%; 2), petéquias (6,4%; 2), apatia (3,2%; 1), hepatomegalia (3,2%; 1) e esplenomegalia (3,2%; 1). Carlos et al. (2011), nos municípios de Ilhéus e Itabuna, BA, observaram em uma população de cães escolhidos aleatoriamente, febre (41,7%; 10/24), apatia (69,2%; 9/13), petéquias (100%; 3/3), desidratação (53,8%; 7/13) e linfadenopatia (57,1%; 28/49) em 72 cães soropositivos pelo dot-ELISA (36%; 72/200). No presente trabalho, alterações oculares (60,0%; 3/5) e linfadenomegalia (33,3%; 3/9) foram observados em cães soropositivos para *E. canis*, sinais também relatados por outros autores.

Os sinais clínicos observados na EMC podem variar de acordo com a forma clínica da doença (aguda, subclínica e crônica), com a virulência da cepa e com o estado imunológico dos animais. *Ehrlichia canis* pode causar sinais clínicos bem variáveis (BREITSCHWERDT, 2004), o que torna o diagnóstico

clínico ainda mais difícil, bem como, a comparação dos resultados obtidos em estudos observacionais relatados por diversos autores.

6.6 Presença de carrapatos em cães e no homem

Neste estudo, de 161 cães submetidos ao exame clínico, aproximadamente 25% (40) estavam infestados por carrapatos durante a consulta. É importante ressaltar que, essa taxa de infestação pelo *R. sanguineus* pode estar subestimada, pois os clínicos veterinários normalmente priorizam a visualização de formas adultas, negligenciando a presença de larvas e ninfas, estádios parasitários de menor tamanho, e consequentemente, de maior dificuldade de visualização (GUIMARÃES; LIMA; ROCHA, 2011).

Embora, os carrapatos não tenham sido identificados, é muito provável que seja *R. sanguineus*, considerada a principal espécie observada em cães criados em áreas urbanas no Brasil (LABRUNA; PEREIRA, 2001; MELO et al., 2011; RIBEIRO et al., 1997; RODRIGUES; DAEMON; D'AGOSTO, 2001; SOARES et al., 2006), desde a sua introdução a partir da Europa. Esse fato reforça ainda mais essa suspeita, já que 86% da população canina deste estudo era composta por cães urbanos domiciliados. Segundo Oyafuso et al. (2002), dos carrapatos coletados em 71 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, PR, 94% foram identificados como *R. sanguineus* e 4% como *Amblyomma cajennense*. De acordo com Guimarães, Lima e Rocha (2011), em estudo sobre ectofauna parasitária em 67 cães urbanos domiciliados, atendidos em clínicas veterinárias particulares de Lavras, MG, *R. sanguineus* foi a única espécie de carrapato observada nos animais.

O contato com o carrapato vetor pode indicar maior risco de infecção por *E. canis* (AGUIAR et al., 2007; CARLOS et al., 2011; CARVALHO et al., 2008; COSTA JÚNIOR et al., 2007; DAGNONE et al., 2001; TRAPP et al.,

2006), porém, esse fato não foi comprovado no presente estudo. Provavelmente, o número relativamente pequeno de cães, associado ao perfil da população amostrada (aleatória), podem justificar, em parte, o resultado observado no presente estudo. Entretanto, é importante ressaltar que, embora, sem apresentar associação significativa ($p>0,05$) com o *status* sorológico para *E. canis*, 84,2% dos cães soropositivos tiveram contato com carrapatos nos últimos 12 meses, conforme relatado pelos seus proprietários.

O carrapato *R. sanguineus* ocasionalmente pode ser encontrado parasitando outros mamíferos (NORVAL; DAILLECOURT, 1983), inclusive o homem (CLARK et al., 1996; FELZ; DURDEN; OLIVER JÚNIOR, 1996; NEBREDAS-MAYORAL et al., 2004; VENZAL et al., 2003). Atualmente, devido á mudanças ocorridas no estilo de vida, o cão está em contato cada vez maior com o homem. Nesse estudo, 51,0% dos proprietários relataram dedicar até sete horas/semana de lazer aos seus cães e 21,0% mais de sete horas/semana, reforçando o papel de companhia desses animais para o homem, e consequentemente exposição e risco de infestação pelo carrapato *R. sanguineus*.

No Brasil, ainda são escassos os estudos sobre o parasitismo de *R. sanguineus* em seres humanos. Dantas-torres, Figueredo e Brandão Filho (2006), na região metropolitana de Recife, PE, descreveram quatro casos de parasitismo humano por *R. sanguineus*. Louly et al. (2006), em Goiânia, GO, também relataram o parasitismo de seres humanos por esse carrapato no Brasil.

No presente estudo, quatorze proprietários (35,0%), cujos cães tinham carrapatos no momento da consulta (14/40), relataram já terem observado também carrapatos fixados a sua pele, e sete (50,0%) animais desses donos apresentaram suspeita clínica para EMC, sendo quatro cães (57,0%) soropositivos para *E. canis*. Trapp et al. (2006), avaliando a soroprevalência de babesiose e erliquiose canina em uma população hospitalar no Sul do Brasil,

observaram que os proprietários de cães com carrapato apresentaram maior risco (OR= 3,2) de serem expostos a esse ectoparasito.

Freire et al. (2010), no Estado do Pará, realizaram um inquérito com 2.160 pessoas, sem discriminação étnica, de sexo, idade, e social, classificados em quatro faixas de idade, seis tipos de atividades na sociedade, e ambos os sexos. Esses autores observaram 44,4% (960/2160) das pessoas infestadas por carrapatos, sendo que os principais acometidos eram estudantes (47,3%; 345/731) e trabalhadores rurais (51,3%; 379/740). Dos 10916 carrapatos encontrados parasitando os seres humanos, 51,3% (4020/10916) foram identificados como sendo *R. sanguineus*.

A erliquiose monocítica canina é uma das principais doenças infecciosas que acometem os cães, e tem interesse também na saúde pública devido às recentes descobertas da infecção por *E. canis* em seres humanos na Venezuela, onde o agente, provavelmente, foi transmitido pelo carrapato vetor *R. sanguineus* (STICH et al., 2008; UNVER et al., 2001). Desse modo, levando em consideração a preocupação com o potencial zoonótico de *E.canis* e de outros hemoparasitos, são necessários estudos mais aprofundados sobre o parasitismo de seres humanos pelo *R. sanguineus*.

7 CONCLUSÕES

- a) Inferências sorológicas, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), sugerem que, é alta a frequência de cães expostos à infecção por *E. canis* (24,0%), atendidos em clínica particular e hospital veterinário de Lavras, MG.
- b) A soropositividade para *E. canis* não apresentou associação significativa ($p>0,05$) com nenhuma das variáveis epidemiológicas da população canina, como sexo, idade e raça, bem como, área, local e forma de criação dos animais.
- c) Anticorpos anti-*E. canis* não interferiram significativamente ($p>0,05$) nos valores de eritrograma, leucograma e plaquetometria, sugerindo que, na população canina em questão, houve um predomínio da infecção subclínica (assintomática).
- d) Alterações hematológicas, como anemia e trombocitopenia, e os achados clínicos, foram inespecíficos, não sendo exclusivos de cães expostos a infecção por *E. canis*, sugerindo que animais soropositivos ou soronegativos podem apresentar coinfeção por outros hemoparasitos.
- e) A prostração foi o único sinal clínico que apresentou associação significativa ($p<0,05$) com a soropositividade de cães para *E. canis*.
- f) Novos estudos, utilizando métodos mais sensíveis e específicos, são necessários na comprovação da infecção, e na determinação de coinfeção por outros hemoparasitos, cujo vetor também é o carrapato *R. sanguineus*.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.
- AGUIRRE, E. et al. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, p. 365-372, 2004.
- AIELLO, S. E. et al. **Manual Merk de veterinária**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2001. 457 p.
- AKHTARDANESH, B. et al. Serological evidence of canine monocytic ehrlichiosis in Iran. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 19, p. 469–474, 2010.
- ALBERNAZ, A. P. et al. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, p. 799-806, 2007.
- ALEXANDRE, N. et al. Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. **The Veterinary Journal**, London, v. 181, p. 343-344, 2009.
- ALLEMAN, A. R. et al. Recombinant major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis*: a potencial diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 7, p. 2494-2499, 2001.
- ALMOSNY, N. R. P. et al. Avaliação hematológica de cães infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 111-111, 2000.
- ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F Livros de Veterinária, 2002. Cap 1, p.16.
- ANDERSON, B. E. et al. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 775-80, 1992.
- ANDERSON, B. E. et al. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 2838-2842, 1991.

ASGARALI, Z. et al. **Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.03.006>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

AZEVEDO, S. S. et al. Associação entre brucelose e ocorrência de abortamentos em bovinos do estado do Espírito Santo - nota prévia. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 3, jun. 2011. Disponível em: <http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962011000300005&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 3 jul. 2012.

BAKKEN, J. S. et al. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 275, p. 199-205, 1996.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 10, p. 411-421, 1999.

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

BEALL, M. J. et al. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, p. 29, 2012.

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**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v. 42, p. 362-368, 1998.

BREITSCHWERDT, E. B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 422-429.

BREMER, W. G. et al. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, p. 95-105, 2005.

BUHLES, W. C.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 130, p. 357-367, 1974.

BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 35, p. 141-14, 2004.

BZYMEK, M.; LOVETT, S. T. Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 98, p. 8319-8325, 2001.

CARDENAS, A. M. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, p. 123-128, 2007.

CARDOSO, L. et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. **The Veterinary Journal**, London, v. 183, p. 232-233, 2010.

CARLOS, R. S. A. et al. Frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, p. 117-120, 2007.

CARLOS, R. S. A. et al. Risk factor and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 20, p. 210-214, 2011.

CARVALHO, F. S. et al. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetic Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, p. 657-662, 2008.

CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, p. 73-86, 2004.

CHEN, S. M.; CULLMAN, L. C.; WALKER, D. H. Western immunoblotting analysis of the antibody responses of patients with human monocytic ehrlichiosis to different strains of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 4, n. 6, p. 731-735, 1997.

CHEN, S. M. et al. Identification of a Granulocytotropic Ehrlichia Species as the Etiologic Agent of Human Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 589-595, 1994.

CLARK, K. L. et al. Ticks removed from dogs and animal care personal in Orangeburg County, South Carolina. **Journal of Agromedicine**, Oxford, v. 3, p. 55, 1996.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **The Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 863-884, 2003.

COLLINS, N. E. J. et al. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 102, p. 838-884, 2005.

COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 25, p. 199-200, 1973.

COSTA JÚNIOR, L. M. et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 174, p. 673-676, 2007.

COUTO, C. G. Doenças rickettsiais. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, E. G. **Manual saunders: clínica de pequenos animais**. 2nd ed. São Paulo: Roca. 2003, p. 138-140.

DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 285-90, 2003.

DAGNONE, A. S. et al. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**, Teresina, v. 22, p. 191-201, 2001.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Parasitology**, London, v. 152, p. 173-185, 2008.

DAWSON, J. E. et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 2741-2745, 1991.

DINIZ, P. P. V. P. et al. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from Southeastern Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Disease**, Larchmont, v. 7, n. 4, p. 689-697, 2007.

DOUDIER, B. et al. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, p. 149-154, 2010.

DOYLE, C. K. et al. Molecular characterization of *E. canis* gp3 and *E. chaffeensis* gp47 tandem repeats among isolates from different geographic locations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1063, p. 433-435, 2005.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DUNNING HOTOPP, J. C. et al. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 2, p. 21, 2006.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 540-543, 1991.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1992.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

EWING, S. A. et al. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 32, p. 368-374, 1995.

EWING, S. A.; JOHNSON, E. M.; KOCAN, K. M. Human infection with *Ehrlichia canis* [letter]. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 317, p. 899-900, 1987.

FARIA, J. L. M. et al. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 19, p. 98-102, 2010.

FELZ, M. W.; DURDEN, L. A.; OLIVER JÚNIOR, J. H. Ticks parasitizing humans in Georgia and South Carolina. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 82, p. 505- 508, 1996.

FENOLLAR, F.; RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 112, p. 785-807, 2004.

FISHBEIN, D. B. et al. Unexplained febrile illnesses after exposure to ticks. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 257, n. 22, p. 3100-3104, 1987.

FOGLIA, M. V.; CAPPIELLO, S.; OLIVA, G. Tick-transmitted diseases in dogs: clinicopathological findings. **Parasitologia**, London, v. 48, p. 135-136, 2006.

FOLEY, J. E. et al. A simian model of human granulocytic ehrlichiosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 6, p. 987-993, 1999.

FRANK, J.; BREITSCHWERDT, B. A retrospective study of Ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal Veterinary Internal Medical**, Melbourne, v. 13, p. 194-201, 1999.

FRENCH, T. W.; HARVEY, J. W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, p. 2407-2411, 1983.

FRUTOS, R. et al. Comparative genomic analysis of three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 2533-2542, 2006.

GAL, A. et al. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 48, p. 619-22, 2007.

GAUNT, S. D. et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites and Vectors**, London, v. 3, p. 33-42, 2010.

GROVES, M. G. et al. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 36, p. 937-940, 1975.

GUIMARÃES, A. M. et al. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 18, p. 49-53, 2009. Supl.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, B. S.; ROCHA, C. M. B. M. Ectofauna parasitária de cães urbanos domiciliados atendidos em clínicas veterinárias particulares na cidade de Lavras, MG, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, p. 172-177, 2011.

HARRUS, S. et al. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 73-76, 1998.

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**, London, v. 141, p. 360-363, 1997.

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**, Washington, v. 48, p. 4488-4490, 2004.

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**, Amsterdam, v. 86, p. 361-368, 2002.

HARRUS, S. et al. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 96, p. 239-243, 2003.

HARRUS, S. et al. Dynamics of IgG1 and IgG2 subclass response in dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, p. 63-71, 2001.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 36, p. 431-447, 1997.

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

HUA, P. et al. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 44, n. 9, p. 737-739, 2000.

HUANG, C. C. et al. Sequence and phylogenetic analysis of the gp200 protein of *Ehrlichia canis* from dogs in Taiwan. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 11, p. 333-340, 2010.

JAIN, N. C. Comparative hematology of common domestic animals. In: ESSENTIALS of veterinary hematology. Hoboken: W. Blackwell, 1993. Chapter 2, p. 19-20.

KAKOMA, I.; CARSON, C. A.; RISTIC, M. Direct and indirect lymphocyte participation in the immunity and immunopathology of tropical canine pancytopenia a review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 3, p. 291-298, 1980.

KEEFE, T. J. et al. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the United States. **Journal of American Veterinary Association**, Chicago, v. 181, p. 236-238, 1982.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, New Jersey, v. 4, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, p. 189-195, 2007.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, Milano, v. 30, p. 24-32, 2001.

LEWIS, G. E. J.; HILL, S. L.; RISTIC, M. Effect of canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis* within nonimmune canine macrophages. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 39, p. 71-76, 1978.

LI, J. S. et al. Antibodies highly effective in SCID mice during infection by the intracellular bacterium *Ehrlichia chaffeensis* are of picomolar affinity and exhibit preferential epitope and isotype utilization. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, p. 1419-1425, 2002.

LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinical North American Small Practice**, Suwon, v. 40, p. 1121-1140, 2010.

LONG S. W. et al. Antigenic variation of *Ehrlichia chaffeensis* resulting from differential expression of the 28-kilodalton protein gene family. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 1824-1831, 2002.

LÓPEZ, L. et al. Development of a sensitive and specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on a baculovirus recombinant antigen for detection of specific antibodies against *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, p. 635-642, 2007.

LOULY, C. C. B. et al. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciencia Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MACIEIRA, D. B. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, 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**, Washington, v. 188, n. 11, p. 4015-4023, 2006.

MCBRIDE J. W. et al. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 2516-2524, 2003.

MCBRIDE J. W. et al. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 315-322, 2001.

McBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. A conserved, transcriptionally active p28 multigene locus of *Ehrlichia canis*. **Gene**, Amsterdam, v. 254, p. 254-252, 2000a.

McBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 13-18, 2000b.

MAEDA, K. et al. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 316, p. 853-856, 1987.

McDADE, J. E. Ehrlichiosis--a disease of animals and humans. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 161, n. 4, p. 609-617, Apr. 1990.

MELO, A. L. T. et al. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, North Carolina, v. 2, p. 213-218, 2011.

MENESES, S. D. I. et al. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

MERLE, C. et al. Disease course of Mediterranean Spotted Fever: remark on 16 cases. 7e Colloque sur le Controle Epidemiologique des Maladies Infectieuses, Paris, France. **Medecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 28, n. 5, p. 400-401, 1998.

MOREIRA, S. M. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.

MOREIRA, S. M. et al. Estudo retrospectivo (1998-2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, p. 141-147, 2003.

MURPHY, G. L. et al. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M. E. et al. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 40, n. 3, p. 174-184, 2004.

MYLONAKIS, M. E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 91, p. 197-204, 2003.

NAKAGHI, A. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 766-770, 2008.

NEBREDA-MAYORAL, T. et al. Detection of antibodies to tick salivary antigens among patients from a region of Spain. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 19, p. 79-83, 2004.

NEER, T. M. et al. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 16, p. 309-315, 2002.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd ed. St Louis: S. Elsevier, 2006. p. 203-216.

NETHERY, K. A. et al. Ehrlichia canis gp200 contains dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, p. 4900-4908, 2007.

NORVAL, R. A. I.; DAILLECOURT, T. The ticks of Zimbabwe. The *Rhipicephalus sanguineus* group. **Zimbabwe Veterinary Journal**, Salisbury, v. 13, p. 38-46, 1983.

O'DWYER, L. H. et al. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by Hepatozoon canis in São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, p. 688-690, 2006.

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

OYAFUSO, M. K. et al. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar do norte do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 71-74, 2002.

PEREZ, M. et al. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 1078, p. 110-117, 2006.

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

REDDY, G. R. et al. Molecular characterization of a 28-kDa surface antigen gene family of the tribe Ehrlichiae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 247, p. 636-643, 1998.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 285-289, 1997.

RIKIHISA, Y. et al. Analyses of *Ehrlichia canis* and a Canine Granulocytic *Ehrlichia* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 143-148, 1992.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 4, p. 286-308, 1991.

RISTIC, M. et al. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infectious Immunology**, Oxford, v. 6, p. 226-231, 1972.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; D'AGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitas em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2001.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, p. 75-79, 2005.

ROZENTAL, T. et al. Evidence of spotted fever group rickettsiae in State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 155-158, 2002.

SAINZ, A. et al. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (north-west Spain). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 29, p. 1-7, 1996.

SAITO, T. B. et al. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANTOS, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SHIPOV, A. et al. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, p. 131-138, 2008.

SILVA, J. N. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*E. canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 19, p. 108-111, 2010.

SMITH, R. D. et al. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic *Rickettsia*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 37, n. 2, p. 119-126, 1976.

SOARES, A. O. et al. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 13-16, 2006.

SOLANO-GALEGO, L. et al. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 37, n. 2, p. 231-244, 2006.

SOUSA, V. R. F. et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1309-1313, 2010.

SOUZA, B. M. P. S. et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, 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**, Washington, v. 40, n. 2, p. 540-546, 2002.

STICH, R. W. et al. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 158, p. 256-273, 2008.

SZABÓ, M. P. J. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental Applied Acarology**, Amsterdam, v. 25, n. 10-11, p. 909-916, 2001.

TRAPP, S. M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, p. 223-230, 2006.

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**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

UNVER, A. et al. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 15, p. 1-3, 2008. Suppl. 1.

UNVER, A. et al. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 2788-93, 2001.

UNVER, A. et al. Western and dot blotting analices of *Ehrlichia chaffeensis* indirect fluorescent-antibody assay-positive and –negative human sera by using native and recombinant *E. chaffeensis* and *E. canis* antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 12, p. 3888-3895, 1999.

VARGAS-HERNÁNDEZ, G. et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, n. 3/4, p. 254-260, 2011.

VENZAL, J. M. et al. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasitising humans in Uruguay. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, p. 769-772, 2003.

VIEIRA, R. F. C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology**. Londres: J. Wiley, 1998. p. 94-99.

WANER, T. et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 69, p. 307-317, 1997.

WANER, T. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 48, p. 177-182, 1995.

WANER, T. et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 95, p. 1-15, 2001.

WANER, T. Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Journal Veterinary Medical**, Hamilton, v. 63, p. 19-22, 2008.

WATANABE, M. et al. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 124, p. 101-107, 2004.

WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay detection of *Ehrlichia canis* infection the dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WERMELING, F.; KARLSSON, M. C. I.; McGAHA, T. L. An anatomical view on macrophages in tolerance. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 9, p. 49-52, 2009.

WINKLER, G. C. et al. Klinische und serologische Diagnose von Ehrlichiose bei Hunden in der Schweiz. **Schweiz Arch Tierheilkd**, Zurich, v. 130, p. 357-367, 1988.

WINSLOW, G. M. et al. Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. **Infections Immunology**, Oxford, v. 68, p. 2187-2195, 2000.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinical North American: Small Animal Practice**, Oxford, v. 21, p. 75-98, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for dog population management**. Geneva, 1990.

YOSHINARI, N. H. et al. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v. 52, p. 111-117, 1997.

ZHANG, J. Z. et al. Expression of members of the 28-kilodalton major outer membrane protein family of *Ehrlichia chaffeensis* during persistent infection. **Infections Immunology**, Oxford, v. 72, p. 4336-4343, 2004.

ZHANG, X. et al. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, p. 1080–1088, 2008.

ANEXOS

ANEXO A Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFLA



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@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 018/11**, relativo ao projeto intitulado **"MÉTODOS SOROLÓGICO E MOLECULAR NO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA NO SUL DE MINAS GERAIS"**, que tem como responsável **Antônio Marcos Guimarães**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de 01/09/2011.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 018/11**, related to the project entitled **"SEROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS IN EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF EHRlichiosis CANINE MONOCYTIC IN SOUTHERN MINAS GERAIS**, under the supervision of **Antônio Marcos Guimarães**, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, and was approved in **September 01, 2011**.

Lavras, 01 de setembro de 2011

Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente em exercício 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@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

Anexo B Ficha Individual dos Cães

1) Nome do proprietário: _____ **Fone:** _____

2) Data da coleta: _____

3) Nome do cão: _____

4) Sexo:

- a) Macho
- b) Fêmea

5) Idade:

- a) Jovem (≤ 1 ano)
- b) Adulto (> 1 ano)

6) Raça:

- a) Com raça definida
- b) Sem raça definida (SRD)

7) O cão vive em área:

- a) Urbana
- b) Rural

8) O local de criação:

- a) Casa
- b) Apartamento
- c) Outro: _____

9) Forma de criação:

- a) Sem acesso à rua
- b) Acesso livre à rua
- c) Acesso controlado à rua

10) Presença de carrapatos no momento da consulta:

- a) Sim
- b) Não

11) Você já observou a presença de carrapatos no seu cão nos últimos 12 meses?

- a) Sim
- b) Não

c) Não soube informar

12) Qual foi a frequência de uso de carrapaticidas no seu cão nos últimos 12 meses?

a) 1 a 2 vezes

b) 3 a 4 vezes

c) 5 a 6 vezes

d) 7 a 8 vezes

e) Mais de 8 vezes

f) Não soube informar

13) Você ou algum membro da família já encontrou o carrapato do cão fixado na sua pele nos últimos 12 meses?

a) Sim

b) Não

c) Não soube informar

14) Quantas horas por semana você se dedica ao lazer com o seu cão?

a) 1 a 3h

b) 4 a 7h

c) 8 a 10h

d) Mais de 10h

15) O cão já teve suspeita ou diagnóstico de erliquiose nos últimos 12 meses?

a) Sim

b) Não

c) Não soube informar

16) Há suspeita clínica de erliquiose após o exame clínico?

a) Sim

b) Não

c) Outro: _____