

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Curso de Medicina e Bem Estar Animal

Stephanny Eringis de Queiroz

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS GERAIS EM CÃES
DIAGNOSTICADOS COM *Erlichia canis* POR PCR OU SOROLOGIA**

São Paulo

2019

STEPHANNY ERINGIS DE QUEIROZ

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS GERAIS EM CÃES
DIAGNOSTICADOS COM *Erlichia canis* POR PCR OU SOROLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina e Bem Estar Animal

Orientador: Prof. Dr Jonas Moraes Filho

São Paulo

2019

Stephanny Eringis De Queiroz

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS GERAIS EM CÃES
DIAGNOSTICADOS COM *Erlichia canis* POR PCR OU SOROLOGIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Pós graduação *Strictu sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Medicina e Bem Estar Animal

Orientador: Prof. Dr. Jonas Moraes Filho

São Paulo de de 20....

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Profa.Dra.

Profa.Dra.

CONCEITO FINAL: _____

RESUMO

A Erliquiose Monocítica Canina no Brasil vem apresentando casuística crescente em hospitais e clínicas veterinárias. Devido a necessidade de realizar um diagnóstico rápido para melhor bem estar do animal, existe a necessidade de mais conhecimento sobre as alterações hematológicas presentes em animais com suspeita de Erliquiose canina. Essas informações podem ser de grande ajuda para o médico veterinário, especialmente em casos com sintomatologia inespecífica, que podem evoluir para um quadro de prognóstico reservado a ruim. O presente projeto possuiu como objetivo geral, avaliar as alterações hematológicas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro, apresentando trombocitopenia e diagnosticados com *Ehrlichia canis*. Os objetivos específicos foram: (1) Correlacionar os dados encontrados no hemograma dos cães com diagnóstico molecular e sorológico positivo para *E. canis*; (2) Correlacionar os dados encontrados no hemograma dos cães com diagnóstico sorológico positivo para *E. canis*. Os 54 (cinquenta e quatro) cães foram divididos em 3 grupos para análise deste estudo científico, sendo distribuídos da seguinte maneira: Grupo 1: cães apresentando alterações clínicas ou trombocitopenia no hemograma e com diagnóstico molecular e sorológico positivo para *E. canis*; Grupo 2: cães apresentando alterações clínicas trombocitopenia no hemograma e com diagnóstico sorológico positivo para *E. canis*; Grupo 3: cães apresentando alterações clínicas ou trombocitopenia no hemograma e negativo no diagnóstico molecular e sorológico para *E. canis*. Com este estudo pode-se concluir que: a) a trombocitopenia e a anemia são os mais importantes achados hematológicos em todas as fases da enfermidade, podendo também ocorrer a pancitopenia; b) animais positivos em PCR apresentaram anemia e trombocitopenia mais intensas, porém a RIFI se mostrou uma excelente opção diagnóstica para animais em fase crônica da enfermidade; c) testes moleculares e sorológicos são úteis e devem ser utilizados em conjunto com a história clínica do animal com fim de diagnosticar e diferenciar a doença entre as fases aguda, crônica e assintomática.

Palavras-chave: Erliquiose Monocítica Canina, *Ehrlichia canis*, RIFI, PCR, trombocitopenia, anemia.

ABSTRACT

The Canine Monocytic Ehrlichiosis in Brazil has presented increasing casuistry in hospitals and veterinary clinics. Due to the need to perform a rapid diagnosis for better animal welfare, there is a need for more knowledge about the hematological alterations present in animals with suspected canine ehrlichiosis. This information can be of great help to the veterinarian, especially in cases with nonspecific symptomatology, which may progress to a predicted bad condition. The present project aimed to evaluate the hematological changes in dogs treated at the Veterinary Hospital of the Santo Amaro University, presenting thrombocytopenia and diagnosed with *Ehrlichia canis*. The specific objectives were: (1) To correlate the data found in the hemogram of dogs with positive molecular and serological diagnosis for *E. canis*; (2) Correlate the data found in the hemogram of dogs with positive serological diagnosis for *E. canis*. The 54 dogs were divided into 3 groups for analysis of this scientific study, being distributed as follows: Group 1: dogs presenting clinical alterations or thrombocytopenia in the blood count and with positive molecular and serological diagnosis for *E. canis*; Group 2: dogs presenting clinical alterations or thrombocytopenia on the blood count and positive serological diagnosis for *E. canis*; Group 3: dogs presenting clinical alterations or thrombocytopenia in the blood count and negative in the molecular and serological diagnosis for *E. canis*. With this study, it can be concluded that: a) thrombocytopenia and anemia are the most important hematological findings in all phases of the disease, and pancytopenia may also occur; b) positive animals in PCR showed more intense anemia and thrombocytopenia; however, RIFI proved to be an excellent diagnostic option for animals in the chronic phase of the disease; c) Molecular and serological tests are useful and should be used in conjunction with the animal's clinical history in order to diagnose and differentiate the disease between the acute, chronic and asymptomatic phases.

Key words: Canine Monocytic Ehrlichiosis, *Ehrlichia canis*, RIFI, PCR, thrombocytopenia, anemia.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que nos criou e foi criativo nesta tarefa, e por ser essencial em minha vida, ser guia e socorro presente nos momentos de angústia. Também ao meu pai Franklin, minha mãe Erica e às minhas irmãs Ingrid e Melody.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta dissertação se concretizasse por meio de seu estímulo, empenho e apoio. A construção dessa dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não teria se tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Agradeço primeiramente a Deus que me deu energias e força para iniciar e concluir este trabalho

Também quero agradecer ao Prof. Dr. Jonas Moraes Filho, da Universidade Santo Amaro, por ter-me deixado fazer parte do seu grupo de trabalho e ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Como professor foi o expoente máximo, abriu-me horizontes, ensinou-me a pensar. Foi, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Agradeço ainda o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões de trabalho, sem nunca ter permitido que o desalento se instalasse, mesmo quando as coisas não corriam bem, ajudando a conseguir ultrapassar dificuldades surgidas.

Ao professor Kleber Peixoto Júnior, da Universidade Santo Amaro, pelo apoio durante toda minha formação, desde a graduação.

Aos professores da banca examinadora da defesa do meu Mestrado em Medicina e Bem Estar Animal.

À Universidade Santo Amaro, que proporcionou meu aprendizado.

A FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de curso de Pós Graduação e Mestrado em Medicina e Bem Estar animal da UNISA. Quero agradecer-lhes os momentos, por vezes, magníficos, que passámos. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e, a alegria que por vezes se instalava.

Aos meus amigos que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade e o carinho que sempre me disponibilizaram.

Por fim, agradeço a toda minha família, incluindo minhas irmãs, mas especialmente ao meu PAI e à minha MÃE, pela sólida formação dada até à minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até à chegada a este mestrado, me apoiaram em todos os momentos, á eles meus eternos agradecimentos.

SUMÁRIO

Introdução	1
1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Erliquiose Monocítica Canina	3
1.2 Agente etiológico	3
1.3 Vetor	4
1.4 Transmissão	5
1.5 Patogenia	6
1.5.1 Fase Aguda	7
1.5.2 Fase Assintomática	8
1.5.3 Fase Crônica	8
1.6 Epidemiologia	9
1.7 Diagnóstico	10
2 OBJETIVOS	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Cães	13
3.2 Hemograma	13
3.3 Sinais e sintomas clínicos	14
3.4 Extrações de DNA	14
3.5 PCR em tempo real para <i>E. canis</i>	14
3.6 Reações de imunofluorescência indireta (RIFI)	15
3.7 Análises estatísticas	15
4 RESULTADOS	16
4.1 Grupo 1	16
4.2 Grupo 2	18
4.3 Grupo 3	21
4.4 Análise estatística	23
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

INTRODUÇÃO

A Erliquiose Monocítica Canina no Brasil vem apresentando casuística crescente em hospitais e clínicas veterinárias, sendo considerada por muitos como uma das mais importantes doenças transmissíveis na clínica de pequenos animais, principalmente pela elevada e disseminada infestação do carrapato vetor, inexistência de vacina, inexistência de imunidade adquirida eficiente, e pela complexidade, e muitas vezes ineficiência, dos protocolos terapêuticos (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; MACHADO; COSTA; BALDANI, 2008).

A erliquiose monocítica canina é a enfermidade que se refere a uma infecção por uma bactéria em forma de coccobacilo Gram-negativo intracelular obrigatório, parasita de células mononucleares do sangue, chamada *Ehrlichia canis*. (HARRUS et al., 1996a; WOODY; HOSKINS, 1991). O microrganismo é adquirido pelo carrapato durante repasto sanguíneo em um cão infectado podendo transmitir a um outro animal em novo repasto sanguíneo (BREMER et al., 2005).

A doença é caracterizada por ser multissistêmica, de sintomatologia complexa, que varia na intensidade de acordo com as fases da doença: aguda, assintomática (subclínica) e crônica. Em animais naturalmente infectados, é difícil definir a fase da doença, uma vez que a apresentação clínica e os achados laboratoriais são similares e a duração e severidade dos sinais clínicos é variável (HARRUS et al., 1997; SANTARÉM, 2003).

Os principais sinais e sintomas são como petéquias e epitaxe, além de sintomas oftalmológicos, como uveíte anterior, opacificação da córnea e hifema e febre em fase aguda (HARRUS et al., 1998a; STILES, 2000; SWANSON, 1990). A trombocitopenia e anemia são os achados hematológicos mais frequentes em todas as fases (BULLA et al., 2004).

Devido a sinais semelhantes aos da fase aguda e crônica, em situações clínicas é extremamente difícil diferenciar a fase que o animal se encontra. Os cães podem apresentar-se com qualquer uma das manifestações clínicas da constelação de sintomas resultantes da infecção (WANER; HARRUS; BOGIN, 1997). O diagnóstico de erliquiose é realizado a partir de informações integradas de interpretação do histórico do paciente, como infestação por carrapatos, vivência e viagens a locais endêmicos, por exemplo; além de aspectos clínicos compatíveis e exames laboratoriais específicos para *E. canis* (MYLONAKIS; THEODOROU, 2017).

Devido a necessidade de realizar um diagnóstico rápido para melhor bem estar do animal, existe a necessidade de mais conhecimento sobre as alterações hematológicas presentes em animais com suspeita de Eriquiiose canina. Essas informações podem ser de grande ajuda para o médico veterinário, especialmente em casos com sintomatologia inespecífica, que podem evoluir para um quadro de prognóstico reservado a ruim.

O presente projeto possuiu como objetivo geral, avaliar as alterações hematológicas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro, apresentando trombocitopenia e diagnosticados com *Ehrlichia canis*.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Erliquiose Monocítica Canina

A EMC no Brasil vem apresentando casuística crescente em hospitais e clínicas veterinárias, sendo considerada por muitos como uma das mais importantes doenças transmissíveis na clínica de pequenos animais, principalmente pela elevada e disseminada infestação do carrapato vetor, inexistência de vacina, inexistência de imunidade adquirida eficiente, e pela complexidade, e muitas vezes ineficiência, dos protocolos terapêuticos (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; MACHADO; COSTA; BALDANI, 2008).

Em diferentes partes do mundo, incluindo o continente americano, o carrapato *R. sanguineus* é o vetor da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC) (DUMLER et al., 2001). A doença foi descrita pela primeira vez em 1935, na Argélia, onde observaram estruturas no interior de monócitos coletados de cães apresentando anemia, febre e parasitados com carrapatos, sendo nomeadas *Rickettsia canis*. Depois foi renomeada como *Ehrlichia canis*, ganhando mais destaque durante a Guerra do Vietnã, quando diversos animais foram infectados (MCDADE, 1990).

A enfermidade foi relatada no Brasil pela primeira vez em Belo Horizonte por Costa et al. (1973), posteriormente foi relatado por Carrillo; Resende; Massard (1976) no Rio de Janeiro. Com o passar do tempo, passou a ser diagnosticada com bastante frequência em todas as regiões do Brasil, principalmente nas regiões sudeste e centro-oeste, onde encontra-se com frequência o carrapato *R. sanguineus* (CARRILLO; RESENDE; MASSARD, 1976; COSTA et al., 2015, COSTA et al. 1973; SANTOS et al., 2013; SOUSA; et al., 2013; UENO et al., 2009).

1.2 Agente etiológico

A erliquiose monocítica canina é a enfermidade que se refere a uma infecção por uma bactéria em forma de cocobacilo Gram-negativo intracelular obrigatório, parasita de células mononucleares do sangue, chamada *Ehrlichia canis* (HARRUS et al., 1996a; WOODY; HOSKINS, 1991).

A penetração de corpúsculos elementares em células mononucleares

caracteriza a primeira fase do ciclo da bactéria, seguida de multiplicação e desenvolvimento de dois estágios, sendo eles os corpúsculos iniciais e as mórulas (MCDADE, 1990)

Os corpúsculos iniciais ocorrem quando os corpúsculos elementares aumentam em número e fazem um agrupamento, caracterizado por grânulos semiesféricos, medindo cerca de 0,4 a 2,0 μm . Nos dias que se seguem, por volta de sete a doze dias, esses corpúsculos iniciais se multiplicam, ocorrendo a formação das mórulas. As mórulas de *E. canis* podem variar de 2,0 a 4,0 μm de diâmetro. Após 12 a 18 dias de incubação, elas se dissociam do citoplasma, liberando corpúsculos iniciais ao se romperem, que infectarão outras células (DAVOUST; BONI; PARZY, 1999; MCDADE, 1990; POPOV et al., 2007; WOODY; HOSKINS, 1991).

1.3 Vetor

O *R. sanguineus* foi originalmente descrito por Latreille (1806) como *Ixodes sanguineus* usando uma descrição breve e vaga. A atual posição taxonômica desta espécie dentro da subordem Ixodida foi determinada por Koch (1844) que a transferiu para o gênero *Rhipicephalus* (KOCH, 1844). Mesmo diante da existência do complexo *sanguineus* de espécies filogeneticamente muito próximas, *R. sanguineus* tem sido sempre considerada a única espécie de *Rhipicephalus* ocorrendo no Novo mundo (DANTAS-TORRES et al., 2013; MORAES-FILHO et al., 2011; PETNEY et al., 2015).

O carrapato *R. sanguineus* é de grande importância na transmissão da erliquiose monocítica canina (MORAES-FILHO, 2013). Este vetor está presente em todos os continentes do planeta, com exceção da Antártida, parasitando primariamente o cão doméstico. Embora ele tenha se originado na região Afrotropical, sua distribuição quase cosmopolita se deve às migrações humanas pelo mundo, que levam consigo o cão doméstico (FOURIE, 2017; PEGRAM et al., 1987).

A introdução do *R. sanguineus* nas Américas pode ter ocorrido mais recentemente, durante colonização europeia a partir do final do século XV, ou mesmo anteriormente, já que há relatos de fósseis de cães domésticos no Peru, Bolívia e México datados de antes do século XV (LEONARD et al., 2002). De qualquer forma, é possível que tenha havido múltiplas introduções em diferentes

países do Novo Mundo, resultando em diferentes recombinações gênicas entre as populações que conhecemos hoje, formando o complexo *R. sanguineus* (LEONARD et al., 2002; MORAES-FILHO et al., 2011).

Esse artrópode habita ambientes urbanos e tem hábitos nidícolas, vivendo em tocas, ninhos e até mesmo em esconderijos nos canis. Preferem se fixar nas regiões do pescoço, orelhas, espaços interdigitais e dorso de seus hospedeiros (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

Nas últimas décadas, tanto a prevalência quanto a intensidade das infestações por *R. sanguineus* em cães vêm aumentando. No Rio Grande do Sul, por exemplo, este carrapato foi citado de baixa ocorrência em 1947, tendo sido encontrado em apenas 1,29% dos cães examinados (CORRÊA, 1955 apud MORAES-FILHO, 2013). Cinquenta anos mais tarde, este mesmo carrapato foi encontrado em 48,8% de 450 cães da cidade de Porto Alegre (RIBEIRO et al., 1997). O cenário atual mudou muito com o passar dos anos. Hoje o *R. sanguineus* é considerado, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães em todo o Brasil (MORAES-FILHO et al., 2011; MORAES-FILHO; KRAWCZAK; COSTA, 2015).

1.4 Transmissão

No Brasil, a única espécie de bactéria responsável pela EMC descrita até o momento é *Ehrlichia canis*, doença considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas, onde abundam populações do carrapato *Rhipicephalus*, principal e possivelmente o único vetor da doença (EWING; BUCKNER, 1965; LABRUNA; PEREIRA, 2001).

O microrganismo é adquirido pelo carrapato durante repasto sanguíneo em um cão infectado podendo transmitir a um outro animal em novo repasto sanguíneo (BREMER et al., 2005; GROVES et al., 1975). Segundo Lewis Jr. et al. (1977), durante 155 dias pós-infectado, o artrópode ainda pode possuir capacidade de transmitir a enfermidade (LEWIS JR. et al., 1977). Um estudo recente mostrou que a transmissão de *E. canis* por carrapatos de *R. sanguineus* começa dentro de 3 horas após a fixação do carrapato ao cão (FOURIE 2013).

A transmissão entre os carrapatos apresenta perpetuação transestadial, e não há transmissão transovariana (BREMER et al., 2005; DUMLER et al., 2001; GROVES et al., 1975). As larvas e ninfas se infectam ao alimentarem-se em cães infectados na fase aguda da doença, mantendo-se infectadas até o estágio adulto

(LEWIS JR. et al., 1977). No carrapato, o microrganismo se dissemina em hemócitos, para a glândula salivar, e a infecção do hospedeiro ocorre através das secreções salivares no sítio de alimentação do vetor (HARRUS; BARK; WANER, 1997; HARRUS et al., 1996b).

Outra via de transmissão é através da transfusão de sangue. Devido ao potencial de transmissão destes patógenos através do sangue infectado, o rastreamento de produtos sanguíneos caninos para DNA bacteriano com um ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) é recomendado em áreas altamente endêmicas para garantir a segurança dos produtos sanguíneos (HARRUS et al., 1999).

1.5 Patogenia

A patogenia da erliquiose monocítica canina envolve um período de incubação de oito a 20 dias e em geral cursa com febre, prostração e disorexia. A doença é caracterizada por ser multissistêmica, de sintomatologia complexa, que varia na intensidade de acordo com as fases da doença: aguda, assintomática (subclínica) e crônica. Em infecções experimentais, é possível diferenciar as três fases, mas em animais naturalmente infectados, é difícil definir a fase da doença, uma vez que a apresentação clínica e os achados laboratoriais são similares e a duração e severidade dos sinais clínicos é variável (HARRUS et al., 1997; SANTARÉM, 2003). A trombocitopenia é a principal alteração hematológica nos cães com erliquiose, qualquer que seja a fase da doença (SANTARÉM, 2003).

Após ser inoculada na pele do cão através de secreções salivares do carrapato, a *E. canis* penetra em células mononucleares sob a forma de corpúsculos elementares, seguindo com sua multiplicação em fagolisossomos celulares. Seu desenvolvimento ocorre em dois estágios: corpúsculos iniciais e mórulas (POPOV et al., 1998; SANTARÉM, 2003).

Quando existe uma quantidade pequena da bactéria, os mecanismos de defesa do organismo conseguem debelar a infecção, ocorrendo a ausência de sinais clínicos. A doença ocorre quando há um grande número do agente etiológico no hospedeiro (RIKIHISA; JOHNSON; BURGER, 1987).

As espécies de *Ehrlichia* não induzem uma severa reação inflamatória nos tecidos do hospedeiro. A bactéria inibe a união do lisossomo com o vacúolo nos macrófagos e impedem a ativação dos mesmos, não induzindo a liberação de

mediadores químicos como interleucinas e fatores de necrose tumoral. Porém, existem outros fatores que podem ativar os macrófagos que são os estímulos exógenos, como o aumento intracelular dos níveis de íons de cálcio, interferon gama e concanavalina, ocorrendo linfadenopatia afolicular no processo infeccioso. O desaparecimento de folículos, a depleção de linfócitos e histiocitose em linfonodos locais são características comuns da infecção por *E. canis* (RIKIHISA; JOHNSON; BURGER, 1987).

1.5.1 Fase Aguda

Em infecção experimental em cães, a fase aguda tende a durar duas a quatro semanas, e é o período em que o agente se multiplica em leucócitos mononucleares e se dissemina para órgãos como baço, fígado e linfonodos (HARRUS et al., 1999). A detecção de mórulas em esfregaços sanguíneos é mais comum nesta fase da doença (SANTARÉM, 2003).

Os principais sinais e sintomas nesta fase se caracterizam por febre, apatia, emaciação e anorexia, alterações essas que ocorrem devido a liberação de interleucina 1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral alfa pelo sistema imunológico do animal.(HASEGAWA, 2005; NYINDO et al., 1980). Outros sintomas relacionados a trombocitopenia também podem ocorrer, como petéquias e epitaxe, além de sintomas oftalmológicos, como uveíte anterior, opacificação da córnea hifema (HARRUS et al., 1998a; STILES, 2000; SWANSON, 1990).

1.5.2 Fase Assintomática

Na fase assintomática, caracterizada pela persistência do agente no organismo, o animal pode apresentar-se clinicamente saudável por meses e até anos, ou apresentando sinais clínicos muito brandos da doença, sendo associada por febre em estudos experimentais (HARRUS; WANER, 2011; WANER; HARRUS; BOGIN, 1997).

1.5.3 Fase Crônica

Nesta fase os sinais e sintomas reaparecem, recorrendo de forma branda ou severa, podendo levar o animal a óbito. Os sinais clínicos mais comuns desta fase são apatia, caquexia, e distúrbios hemostáticos decorrente da trombocitopenia, como petéquias, equimoses, distúrbios gastrointestinais hemorrágicos e hematúria (BUHLES; HUXOLL; HILDERBRANDT, 1975; HUXOLL; et al., 1972; HUXSOLL, 1976; PRINCE; SAYER; DOLAN, 1987). Hifema, hemorragia retinal e deslocamento de retina são comuns nessa fase (HARRUS et al., 1998a; SWANSON, 1990).

A pancitopenia registrada com frequência nos cães em fase crônica é consequência da hipoplasia da medula óssea (BUHLES; HUXOLL; HILDERBRANDT, 1975; PRINCE; SAYER; DOLAN, 1987; WANER; HARRUS; BOGIN, 1997). A hipoplasia medular dos animais nesta fase pode ser originada da infecção das células-tronco por *E. canis*, que interferiria no metabolismo ou proliferação celular. Alguns autores notaram que nos casos crônicos severos, a hipoplasia medular foi consequência de anemia aplástica e que associado a pancitopenia o animal tende a óbito (BUHLES; HUXOLL; HILDERBRANDT, 1975; MYLONAKIS et al., 2004).

Devido a sinais semelhantes aos da fase aguda e crônica, em situações clínicas é extremamente difícil diferenciar a fase que o animal se encontra. Os cães podem apresentar-se com qualquer uma das manifestações clínicas da constatação de sintomas resultantes da infecção. (WANER; HARRUS; BOGIN, 1997).

1.6 Epidemiologia

A erliquiose monocítica canina é conhecida em todos os continentes, mas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde o artrópode se desenvolve com maior facilidade (BUHLES; HUXOLL; HILDERBRANDT, 1975; EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000; GUGLIELMONE et al., 2006; HARRUS; WANER, 2011; MORAES-FILHO et al., 2011). Em diversos países já foram relatadas infecções por *E. canis*, como México (PAT-NAH et al., 2015), Uruguai (MORAES-FILHO, 2013), Argentina (EIRAS et al., 2012; MORAES-FILHO, 2013), Costa Rica (ROMERO et al., 2011), e Colombia (VARGAS-HERNÁNDEZ et al., 2012).

No Brasil, a EMC ocorre em praticamente todas as cinco regiões (LABARTHE et al. 2003, AGUIAR et al. 2007b; COSTA Jr. et al., 2007; TRAPP et al. 2006;

SANTOS et al. 2009). A enfermidade já foi relatada em estados como Maranhão (COSTA et al., 2015), Paraíba (UZÊDA et al., 2010) São Paulo (UENO et al., 2009), Mato Grosso (SANTOS et al., 2013) e Londrina (DAGNONE et al., 2003).

Em um estudo, Bulla et al. (2004) verificaram que 30,9% das amostras de cães coletadas aleatoriamente apresentavam material genético para *E. canis* no teste de PCR em Botucatu, município localizado no Estado de São Paulo. Em outro estudo realizado por Ueno et al., a prevalência foi ainda maior, representando 40% das amostras testadas por PCR (BULLA et al., 2004; UENO et al., 2009).

Já no estado de Rondônia, Aguiar et al. (2007) encontraram anticorpos reativos por RIFI em cães em uma prevalência de 37,9% e 24,8% em regiões urbanas e rurais respectivamente (AGUIAR et al., 2007).

A região Sul apresenta um viés, isto é, enquanto o estado do Paraná apresenta frequências de infecções >20% (DAGNONE et al., 2003; TRAPP et al., 2006), semelhantemente às demais regiões do Brasil, porém os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul apresentam frequências muito mais baixas chegando a <5% (LABARTHE et al., 2003; LABRUNA; PEREIRA, 2001; MARTINS et al., 2007; SAITO, 2009; MORAES-FILHO, 2015). Em um estudo recente realizado no Rio grande do Sul, foi encontrada uma soroprevalência de 4,43% para *E. canis* em animais testados no município de Santa Maria (KRAWCZAK et al., 2012).

1.7 Diagnóstico

O diagnóstico da doença é realizado a partir de informações integradas de interpretação do histórico do paciente, como infestação por carrapatos, vivência e viagens a locais endêmicos, por exemplo; além de aspectos clínicos compatíveis e exames laboratoriais específicos para *E. canis* (MYLONAKIS; THEODOROU, 2017).

A citologia, a partir do esfregaço de sangue, é considerada como diagnóstico definitivo para erliquiose e se fundamenta na identificação de mórulas de *E. canis* em monócitos, em linfócitos, ou ambos (MYLONAKIS; THEODOROU, 2017). Porém, este exame é pouco efetivo em fases crônicas ou subclínicas (PARMAR et al., 2013; WANER; HARRUS; BOGIN, 1997).

O teste de PCR para *E. canis* tem sido amplamente empregado para o diagnóstico da doença, sendo possível detectar o agente mesmo com quantidades baixas de mórulas circulantes por meio da amplificação de DNA da bactéria,

podendo ser utilizado na fase aguda da enfermidade (DOYLE et al., 2005; HARRUS et al., 1998b; HARRUS; WANER, 2011; PAT-NAH et al., 2015). Na fase aguda a infecção pode ser identificada a partir do quarto dia de infecção (MILONAKIS 2009). Já foram detectados DNA da bactéria no sangue periférico, aspirados de baço e medula óssea, entre outros órgãos (HARRUS 2004, BANETH, 2009). Entretanto, após pouco tempo de tratamento, o PCR torna-se menos sensível, podendo tornar-se negativo com apenas nove dias de tratamento (BANETH et al 2009). Quando o teste é utilizado para controle do tratamento, o exame deve ser realizado após duas semanas do término do tratamento, e repetido em dois meses. Apenas após dois testes negativos pode-se considerar esterilização da infecção (NEER 2002), levando ainda em consideração a possibilidade de falso negativo por sequestro esplênico (HARRUS 2004).

A erliquiose também pode ser diagnosticada por meio de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), um teste sorológico capaz de detectar anticorpos na circulação sanguínea a partir de 7 a 15 dias de infecção (HARRUS; WANER, 2011). Uma das vantagens desses testes é que eles permitem a determinação dos níveis de anticorpos e suas alterações ao longo do tempo (HARRUS; ALLEMAN; BARK, 2002). Um resultado sororeagente indica uma infecção passada ou atual, mas nem sempre denota uma doença em curso. Um único resultado de título positivo pode refletir apenas uma infecção passada que pode já haver sido resolvida, porque os títulos de anticorpos podem persistir por vários meses ou anos (GAUNT et al., 2010; HARRUS et al., 1998b). Os casos suspeitos devem ser avaliados com base no desempenho de dois ou mais testes sorológicos realizados em intervalos de 2 a 4 semanas, sendo realizado um sorodiagnóstico pareado. Essa abordagem pode fornecer informações sobre a cinética dos anticorpos como aumento, nenhuma alteração ou uma diminuição, o que pode indicar o status atual da infecção (SAINZ et al., 2015). Tem sido sugerido que um aumento de quatro vezes nos anticorpos IgG ao longo do tempo pode ser tomado como evidência de uma infecção em curso (WANER et al., 2001). A soroconversão pode ser usada como uma técnica para corroborar sinais que sugerem uma infecção aguda com *E. canis*. Uma sorologia inicial pode ser usada para detectar níveis de anticorpos, quando o cão apresenta sinais clínicos e/ou achados laboratoriais anormais, então outra sorologia quantitativa é conduzida para detectar os níveis de anticorpos convalescentes após 2 a 4 semanas (SAINZ et al., 2015). A administração de doxiciclina terá efeito ao longo de dias e semanas, não influenciando na produção de anticorpos ou na

soroconversão (SAINZ et al., 2015).

Devido a necessidade de realizar um diagnóstico rápido para melhor bem estar do animal, existe a necessidade de mais conhecimento sobre as alterações hematológicas presentes em animais com suspeita de Eriquiose canina. Essas informações podem ser de grande ajuda para o médico veterinário, especialmente em casos com sintomatologia inespecífica, que podem evoluir para um quadro de prognóstico reservado a ruim.

2. OBJETIVO

O presente projeto possuiu como objetivo geral, avaliar as alterações hematológicas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro (UNISA), em São Paulo, apresentando alterações clínicas e diagnosticados com *Ehrlichia canis* por meio de diagnóstico molecular ou sorológico.

Objetivos específicos:

(1) Correlacionar os dados encontrados no hemograma dos cães com diagnóstico molecular e sorológico positivo para *E. canis*;

(2) Correlacionar os dados encontrados no hemograma dos cães com diagnóstico sorológico positivo para *E. canis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cães

Os 54 (cinquenta e quatro) cães utilizados neste projeto foram pacientes atendidos no hospital veterinário da Universidade Santo Amaro localizado na zona sul da cidade de São Paulo. Os animais foram divididos em três grupos para análise deste estudo científico, sendo distribuídos da seguinte maneira:

- a) Grupo 1: 9 cães apresentando alterações clínicas e diagnóstico molecular e sorológico positivo para *E. canis*;
- b) Grupo 2: 23 cães apresentando alterações clínicas e diagnóstico sorológico positivo para *E. canis*;
- c) Grupo 3: 22 cães apresentando alterações clínicas negativo no diagnóstico molecular e sorológico para *E. canis*.

3.2 Hemograma

As amostras de sangue foram colhidas em tubos plásticos contendo EDTA sódico para a realização do hemograma. As amostras de sangue foram processadas imediatamente quando possível, ou mantidas refrigeradas, por um período máximo de 24 horas. Os valores de hematócrito, hemoglobina, hemácias, leucócitos, plaquetas e os bioquímicos foram obtidos em analisador automático. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços de sangue corados com corante de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) de acordo com a metodologia utilizada rotineiramente no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro. Os parâmetros hematológicos reportados por Feldman et al. (2000) serão utilizados como valores de referência, que estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 1 – Valores de referência de hemograma

Hemácias	5,0 - 8,5 milhões/mm ³
Hemoglobina	12 - 18 g/dl
Hematócrito	37 - 55%
Proteínas totais	6,0 – 8,0 g/dl
Leucócitos	6.000 - 17.000 cel./mm ³
Plaquetas	200 -900 mil/mm ³

3.3 Sinais e sintomas clínicos

As alterações clínicas de animais suspeitos de erliquiose canina incluíram febre, apatia, emaciação, anorexia, disorexia e mucosas pálidas (HASEGAWA, 2005; NYINDO et al., 1980). Outros sintomas como petéquias e epistaxe, hematúria, distúrbios gastrointestinais hemorrágicos (BUHLES; HUXOLL; HILDERBRANDT, 1975; HASEGAWA, 2005; HUXOLL; et al., 1972; HUXSOLL, 1976; NYINDO et al., 1980; PRINCE; SAYER; DOLAN, 1987), além de sintomas oftalmológicos, como uveíte anterior, opacificação da córnea e hifema (HARRUS et al., 1998a; STILES, 2000; SWANSON, 1990).

3.4 Extrações de DNA

As amostras de sangue total foram processadas individualmente à extração de DNA, utilizando-se o “kit” de extração “Dneasy Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante.

3.5 PCR em tempo real para *E. canis*

Os materiais obtidos da extração de sangue canino foram analisados para *E. canis* pela determinação da seqüência de nucleotídeos amplificados do gene dsb, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados Dsb-321 (5´-TTGCAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA - 3´), Dsb-671 (5´ - GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA - 3´), e a sonda TaqMan (5´-AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA - 3´) 5´ FAM/BHQ - 1 3´, específica para a espécie *E. canis*, conforme previamente padronizado (DOYLE et al., 2005). A reação foi realizada em placas de 96 poços submetidas a variações térmicas correspondentes a um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de

95°C por 15 segundos e 60°C por minuto, conforme descrito por Doyle et al. (2005). A amplificação, aquisição e análise de dados foram realizadas em um sistema de detecção multicolor para Real-Time PCR (7500 Real-Time PCR Systems – Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA).

3.6 Reações de imunofluorescência indireta (RIFI)

As amostras de soro dos animais deste trabalho foram submetidas à reação de imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção e titulação de anticorpos anti-*E. canis* conforme Aguiar et al. (2007). Foram considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência de intensidade na diluição maior que 1:40 (WANER et al, 2001).

3.7 Cálculo Estatístico

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE). Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o método dos quadrados mínimos empregando-se o procedimento PROC GLM do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2001) onde foi avaliado o efeito dos 3 grupos descrito acima, sobre os valores de temperatura retal, leucócitos, plaquetas, hemácias, hemoglobina, hematócrito e proteína total. Foi adotado um nível de significância de 5% para todos os testes realizados e na análise de variância, quando observou efeito significativo, foi realizada comparação das médias pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1 GRUPO 1

O grupo foi formado por nove animais dos cinquenta e quatro testados, apresentando positividade para *E. canis* no teste sorológico e molecular, conforme tabela 1. Os valores de hemograma e temperatura de cada animal estão descritos na tabela 3, e as titulações sorológicas citadas na tabela 2.

A idade média dos animais deste grupo foi de 5,74, apresentou amplitude desde animais jovens, com mínima de seis meses, até animais idosos, com máxima de 10 anos.

A média de temperatura se manteve dentro da normalidade (38,6°C) e nenhum animal do grupo apresentou febre.

Em relação aos leucócitos, 7/9 dos animais do grupo apresentaram leucócitos dentro da normalidade, mantendo uma média de 15.200 mil/mm³, sendo que apenas 2 apresentaram leucocitose, com máxima de 43.500 mil/mm³.

A trombocitopenia deste grupo foi o aspecto hematológico que apresentou os valores mais baixos em relação aos demais grupos. A média total de plaquetas foi de 77.667 mil/mm³, sendo que apenas um animal apresentou 205.000 mil/mm³, sendo dentro dos valores referenciais de normalidade, porém próximo ao limite mínimo. O animal com a trombocitopenia mais acentuada apresentou 18.000 mil/mm³.

A anemia também esteve presente no grupo. Apenas um animal apresentou contagem de hemácias acima de 5,5 milhões/mm³, com uma contagem total de 6,4 milhões/mm³. Os demais tinham anemia discreta a importante. A menor contagem de hemácias foi de 1,4 milhões/mm³, mantendo uma média de 4,34 milhões/mm³. Os valores de hemoglobina e hematócrito apresentaram média de 9,57 milhões/mm³ e 28,6% respectivamente.

Tabela 2 – Dados sorológicos e moleculares no diagnóstico para *E. canis* em amostras de cães apresentando alterações clínicas com diagnóstico molecular e

sorológico positivo para *E. canis*, pertencentes ao grupo 1

Ident. Geral	PCR <i>E. canis</i>	RIFI
		<i>E. canis</i>
3	POSITIVO	10240
6	POSITIVO	2560
11	POSITIVO	10240
16	POSITIVO	10240
27	POSITIVO	10240
31	POSITIVO	10240
47	POSITIVO	2560
49	POSITIVO	10240
52	POSITIVO	10240

Tabela 3 - Hemograma e características gerais dos cães apresentando alterações clínicas com diagnóstico molecular e sorológico positivo para *E. canis* pertencentes ao grupo 1.

No. do Animal	Idade	Temperatura °C	Leucocitos cel./mm ³	Plaquetas mil/mm ³	Hemacias milhões/mm ³	Hemoglobina g/dl	HTO %	PT g/dl
3	5 anos	38,1	5.100	50.000	4,39	10	30	7,2
6	1 ano	38,7	14.000	41.000	6,4	15,1	45	6,2
11	9 anos	38,1	33.200	59.000	1,4	3,9	11	5,6
16	10 anos	38,6	7.800	70.000	5,26	11,5	32	8,4
27	8 anos	38,7	5.200	205.000	4,45	9,3	28	11,6
31	9 anos	38,6	14.600	18.000	3,3	6,9	19	3,6
47	6 meses	39	5.100	55.000	4,89	10,4	36	6,8
49	4 anos	39,2	43.500	132.000	5,3	10,9	32	6
52	5 anos	38	6.400	69.000	3,7	8,2	24	6

4.2 GRUPO 2

O grupo 2 foi formado por vinte e três animais dos cinquenta e quatro testados. Os valores de hemograma e temperatura de cada animal estão descritos na tabela 4.

A idade média dos animais deste grupo foi de 6,43 anos, sendo que houve uma amplitude de animais jovens, de 1 ano, e também animais idosos, com 15 anos.

A média de temperatura se manteve dentro da normalidade (38,7°C), porém 4 animais estavam com febre no momento da mensuração.

Em relação aos leucócitos, 4/23 dos animais apresentaram leucopenia, 8/23

em leucocitose e 11/23 estavam com leucócitos dentro da normalidade, mantendo uma média de 13.020 mil/mm³, com máxima de 29.200 mil/mm³ e mínima de 400 mil/mm³.

A trombocitopenia esteve presente no grupo. A média total de plaquetas foi de 149.520 mil/mm³, sendo que apenas 6/23 animais apresentaram contagem plaquetária dentro da normalidade. O animal com a trombocitopenia mais acentuada apresentou 13.000 mil/mm³.

A anemia também esteve presente em alguns animais do grupo. Foram 16/23 dos animais que apresentaram contagem de hemácias dentro da normalidade, e 7/23 que estavam com anemia, gerando uma média de 5,41 milhões/mm³. A menor contagem de hemácias foi de 0,8 milhões/mm³, e a maior contagem foi de 8 milhões/mm³. Os valores de hemoglobina e hematócrito apresentaram média de 12,42 milhões/mm³ e 36,4%, respectivamente.

Os animais que responderam positivamente ao teste sorológico apresentaram títulos variando de 40 a 2048; conforme tabela 5.

Tabela 4 - Hemograma e características gerais dos cães apresentando alterações clínicas com diagnóstico sorológico positivo para *E. canis*, pertencentes ao grupo 2.

No. do Animal	Idade	Temperatura °C	Leucocitos cel./mm ³	Plaquetas mil/mm ³	Hemácias milhões/mm ³	Hemoglobina g/dl	HTO %	PT g/dl
1	6 anos	39	18.300	90.000	5,5	13,2	37	6,6
2	8 anos	39,6	9.500	70.000	5,9	14,2	40	5,6
4	-	36,6	18.500	237.000	5	11,4	36	12
7	10 anos	39	8.200	35.000	4,67	9,7	32	7,4
9	4 anos	38,4	10.700	66.000	3	5,9	19	6,2
13	9 anos	37,7	12.500	92.000	5,4	12,1	34	12
14	13 anos	39,1	4.700	350.000	7,4	18,7	53	7
17	15 anos	37,9	12.700	83.000	7,1	16,7	49	9,2
22	4 anos	39	5.300	53.000	5,5	13,3	40	7,2
23	5 anos	39,3	19.600	377.000	7,1	17,7	49	7,6
24	2 anos	37,9	21.780	492.000	4,63	8,7	24,8	6,8
26	1 ano	38,7	22.200	100.000	3,1	7,3	22	5,8
28	6 anos	39,3	7.700	131.000	1,7	3,3	12	6,8
29	4 anos	40,4	29.200	166.000	8	18,3	53	8,8
33	1 ano	39,9	400	15.000	0,8	1,9	6	4,4
36	3 anos	38,7	16.000	255.000	7,4	17,9	50	7,2
38	4 anos	38,5	8.000	144.000	7,8	19	53	5,4
40	8 anos	38,2	6.600	60.000	6,9	17,7	49	6
44	9 anos	39,3	16.100	142.000	6,99	15,4	48	7,6
46	-	39,9	3.100	13.000	5,84	10,7	33	6,2
48	13 anos	39,1	19.200	99.000	3,9	8,2	24	8,6
50	4 anos	37,5	9.700	161.000	5,8	13,6	41	12
51	6 anos	38,2	19.900	208.000	5,03	10,8	32	10,4

Tabela 5: Titulações encontradas em amostras de teste sorológico de Imunofluorescência Indireta (RIFI) anti – *E. canis*. cães apresentando alterações clínicas com diagnóstico sorológico positivo para *E. canis*, pertencentes ao grupo 2.

No. do Animal	PCR <i>E. canis</i>	RIFI
		<i>E. canis</i>
1	NEGATIVO	2560
2	NEGATIVO	2560
4	NEGATIVO	10240
7	NEGATIVO	10240
9	NEGATIVO	10240
13	NEGATIVO	10240
14	NEGATIVO	160
17	NEGATIVO	10240
22	NEGATIVO	10240
23	NEGATIVO	640
24	NEGATIVO	640
26	NEGATIVO	40
28	NEGATIVO	10240
29	NEGATIVO	10240
33	NEGATIVO	10240
36	NEGATIVO	640
38	NEGATIVO	160
40	NEGATIVO	10240
44	NEGATIVO	2560
46	NEGATIVO	10240
48	NEGATIVO	10240
50	NEGATIVO	10240
51	NEGATIVO	2560

4.3 GRUPO 3

O grupo 3 foi formado por 22 animais que apresentaram resultados negativos nos exames sorológico e molecular para *E. canis*. Os valores de hemograma e temperatura de cada animal estão descritos na tabela 6.

A idade média dos animais deste grupo foi de 7,65 anos, a mais alta de todos os grupos, sendo que houve uma amplitude de animais jovens, de apenas 4 meses, e também animais idosos, com 17 anos.

A média de temperatura retal se manteve dentro da normalidade (38,3°C), porém 4/22 animais estavam com febre no momento da mensuração.

Em relação aos leucócitos, 2/22 animais apresentaram leucopenia, 9/22 em leucocitose, e 11/22 estavam com leucócitos dentro da normalidade, mantendo uma média de 19.255mil/mm³, com máxima de 64.800mil/mm³ e mínima de 700 mil/mm³.

A trombocitopenia esteve presente no grupo, porém a média total de plaquetas foi de 251.190mil/mm³, sendo que 12/22 animais apresentaram contagem plaquetária dentro da normalidade e 10/22 em trombocitopenia. O animal com a trombocitopenia mais acentuada apresentou contagem plaquetária de 11.000 mil/mm³.

A anemia também está presente neste grupo. Foram 12/22 animais que apresentaram contagem de hemácias dentro da normalidade, e 10/22 estavam com anemia, gerando uma média de 4,872 milhões/mm³. A menor contagem de hemácias foi de 1,7 milhões/mm³, e a maior contagem foi de 8,2 milhões/mm³.

Os valores de hemoglobina e hematócrito seguiram o mesmo padrão, com média de 11,42 milhões/mm³ e 33% respectivamente.

Tabela 6 – Hemograma e características gerais dos cães apresentando alterações clínicas negativo no diagnóstico molecular e sorológico para *E. canis*, pertencentes ao grupo 3.

No. do Animal	Idade	Temperatura °C	Leucocitos cel./mm ³	Plaquetas mil/mm ³	Hemacias milhões/mm ³	Hemoglobina g/dl	HTO %	PT g/dl
5	4 anos	38,1	11.800	493.000	6,57	14,1	43	9,4
8	11 anos	38,7	12.600	103.000	6,77	13,8	41	9
10	2 anos	39,6	13.200	458.000	6,17	14	42	7
12	17 anos	37,3	32.400	160.000	2	4	12	5,6
15	16 anos	38,9	21.600	21.000	4,5	11,9	33	6
18	9 anos	39	13.100	11.000	1,8	4,8	13	5,4
19	16 anos	37,2	37.300	737.000	4,4	10,8	32	6,8
20	16 anos	37,9	9.200	746.000	5,2	11,1	35	6,4
21	3 anos	38,6	8.600	367.000	5,5	13	38	6,4
25	4 anos	33,5	64.800	48.000	2,1	5	14	4,6
30	16 anos	37,2	22.000	15.000	1,8	5,5	16	5,2
32	1 ano	39	10.500	155.000	8,2	21	60	6,2
34	6 anos	38,1	15.800	469.000	5,18	12	36	8
35	9 anos	37,8	23.200	297.000	1,7	4,6	13	7,6
37	10 anos	39,6	21.710	395.000	2,7	7,2	20	6,4
39	4 anos	38,1	12.100	254.000	6,4	15,7	44	6,8
41	4 meses	39,8	700	47.000	6,2	14,7	40	5,4
42	5 anos	38,7	38.400	91.000	3,7	7,9	24	4
43	11 anos	38,1	5.410	221.000	6,3	14,5	38,8	8,1
45	2 anos	40,3	14.600	423.000	4,7	10	29	10
53	11 meses	38,1	16.600	100.000	8	18,2	51	5,2
54	5 anos	39,2	18.000	212.000	7,3	17,6	52	9,2

4.4 Análises Estatísticas

Na tabela 7 são apresentados os valores médios e desvios padrão dos parâmetros do hemograma e temperatura retal referente aos grupos 1, 2 e 3, conforme descrita abaixo:

Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão dos parâmetros do hemograma e temperatura retal referente aos grupos 1, 2 e 3

	G1		G2		G3		p=
	Média	CV%	Média	CV%	Média	CV%	
Temperatura	38.55 ^a ± 0.41	1.07	38.69 ^a ± 0.77	2.00	38.30 ^a ± 1.36	3.56	0.3897
Hemacias	4.34 ^a ± 1.43	33.02	5.41 ^a ± 1.92	35.51	4.87 ^a ± 2.10	43.19	0.3454
Hb	9.57 ^a ± 3.12	32.63	12.42 ^a ± 4.97	40.05	11.42 ^a ± 4.83	42.33	0.3070
Hto %	28.55 ^a ± 9.82	34.40	36.39 ^a ± 13.55	37.23	33.04 ^a ± 13.90	42.08	0.3124
Pt	6.82 ^a ± 2.21	32.39	7.68 ^a ± 2.15	28.08	6.75 ^a ± 1.63	24.16	0.2529
Plaquetas x10³	77.66 ^c ± 56.82	73.16	149.52 ^b ± 122.29	81.78	251.19 ^a ± 228.45	90.94	0.0245
Leucocitos x10³	15.2 ^a ± 13.97	93.23	13.02 ^a ± 7.25	55.69	19.25 ^a ± 13.91	72.29	0.2003

A partir das análises estatísticas dos parâmetros analisados apresentados acima, pode-se verificar que, de fato, há uma diferença entre os valores de plaquetas entre os três grupos, com um valor de p igual a 0.0245.

Com relação aos valores dos outros parâmetros de hemograma e temperatura retal, não foi encontrado diferença estatísticas entre os 3 grupos analisados.

5. DISCUSSÃO

A trombocitopenia foi os fatores mais importante encontrado nesse estudo, sendo de discreta a moderada intensidade, e condiz com o encontrado em outros estudos, sendo mais importante no grupo 1 (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; NEER et al., 2002; WANER; HARRUS; BOGIN, 1997). A trombocitopenia ocorre devido à inflamação do endotélio vascular e conseqüente consumo de plaquetas, destruição imunomediada e até mesmo sequestro esplênico (WANER; HARRUS; BOGIN, 1997), sendo o aspecto hematológico mais importante encontrado nesse estudo. A anemia e a trombocitopenia podem ser encontrados tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença, podendo estar presente em animais com sintomas vagos, como anorexia, disorexia, alterações oftalmológicas, neurológicas, e gastrointestinais (BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009).

Como destacado acima, a trombocitopenia pode ocorrer por diferentes motivos (BUHLES; HUXOLL; HILDERBRANDT, 1975): como a inflamação do endotélio vascular (HARRUS et al., 1999); por destruição Imunomediada, citada por Harrus et al. (1996b), no qual estes autores propuseram que a infecção por *E. canis* resulte na superprodução de anticorpos antiplaquetários naturais. Outros fatores podem ser citados como causa desta alteração plaquetária, como por exemplo, os que inibem a agregação e adesividade plaquetária (BULLA et al., 2004; HARRUS et al., 1996c). No presente estudo, a trombocitopenia foi o único parâmetro encontrado no hemograma que apresentou diferença estatística entre os grupos de cães testados, mostrando a importância desta alteração hematológica no diagnóstico da doença.

Segundo Hasegawa (2005), a leucopenia é comum nos estágios terminais na doença, raramente descrita na fase aguda. A leucopenia foi um achado que esteve presente em todos os grupos deste estudo, inclusive no grupo 3, em que os animais foram considerados negativos para *E. canis*. Isso sugere que, em quadros de leucopenia, esta doença deve ser uma hipótese considerada, porém não se podem ignorar outras causas, como enfermidades virais, neoplasias, entre outras (FARO et al., 2008; SILVA et al., 2007).

Com o objetivo de identificar fatores prognósticos para sobrevida em EMC, SHIPOV et al. (2008), realizaram um estudo retrospectivo com 40 casos da doença. Os cães do grupo não sobrevivente tinham contagens de glóbulos brancos, hematócrito e plaquetas significativamente mais baixas. Estes animais foram

considerados em pancitopenia, e esta característica foi relatada como fator de risco para mortalidade. Estes pesquisadores consideraram pancitopenia grave quando o animal apresenta leucócitos abaixo de 4.000 cel./mm³, plaquetas abaixo de 50 mil/mm³ e hematócrito abaixo de 25%. No presente estudo, um dos animais do grupo 2 apresentou pancitopenia grave, o qual foi a óbito durante o tratamento, ocorrendo conforme os dados encontrados pelos autores citados. Alguns estudos sugerem que quadros clínicos de pancitopenia mais acentuada, os animais podem estar acometidos por erliquiose monocítica canina crônica, visto que esta é considerada a alteração hematológica típica desta fase (MYLONAKIS et al., 2004; SHIPOV et al., 2008).

Alguns animais neste estudo apresentaram febre, sendo 4/23 no grupo 2 e 4/22 no grupo 3. Alguns autores consideram difícil e até mesmo impossível diferenciar clinicamente as fases da EMC (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; NEER et al., 2002). BOTELHO et al. 2004, realizaram um estudo de infecção experimental em oito cães da raça pastor alemão, e feita a mensuração da temperatura retal dos animais, identificando febre em fase aguda. Mucosa pálida, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, emaciação e aumento da perda de pelame foram outros sinais clínicos observados. A apatia, anorexia e febre são decorrentes dos efeitos de interleucinas sobre o sistema nervoso central e o fígado, na tentativa de eliminar microrganismos que circulam no hospedeiro (TIZARD, 2000).

Os dados encontrados em relação à idade dos animais foram semelhantes aos observados por Harrus et al. (1997), que mostraram que a idade média dos animais positivos para a doença era de cães adultos com cerca de 3 anos e oito meses, e o mesmo foi relatado por Cocco et al. (2003), que encontraram animais adultos com cerca de 5 anos. No presente estudo foi encontrada uma média de animais positivos para *E. canis* com 6 anos de idade.

Os resultados obtidos da amplificação do fragmento do gene *dsb* de *E. canis* através da técnica de Real-Time PCR foram utilizados para determinar uma quantificação relativa do agente no sangue dos animais e a positividade no teste molecular coincidiu com alterações hematológicas no hemograma destes pacientes. Baneth et al. (2008), relataram quantificação absoluta de fragmentos do gene 16sRNA de *E. canis* detectável no sangue de cães no sétimo dia de infecção. Neste presente estudo, os animais positivos no teste molecular pertenciam ao grupo 1.

Segundo Harrus et al. (2004), a detecção molecular da bactéria *E. canis*,

obtida de sangue periférico é inferior em relação à encontrada em baço e medula. Devido a isso, resultados enganosos podem ocorrer em infecções crônicas da doença, devido nesta fase da doença, a bacteremia na circulação periférica é escassa (COHN, 2003). É importante ressaltar, que o DNA erliquial detectado em aspirados esplênicos pode persistir de bactérias mortas, não representando infecção ativa propriamente dita (BARSTCH, GREENE, 1996; NEER et al., 2002).

Os altos títulos sorológicos encontrados neste trabalho já foram citados na literatura, conforme Frank et al., (1999). A maioria dos animais apresentou títulos de anticorpos entre 2.560 a 10.240, sendo sugestivos de infecção recente ou persistente, podendo na maioria das vezes, estar relacionada com a cronicidade da doença e tipo de resposta excepcional ao antígeno (WANER et al., 2001), originados pelo estímulo antigênico prolongado e na produção de imunoglobulinas por parte dos plasmócitos (PERRILE, MATUS, 1991). Porém, a possibilidade de animais infectados recentemente não ter tempo hábil para soroconversão, podem apresentar resultado negativo na sorologia, neste caso, o diagnóstico para EMC deve ser baseado na associação das alterações hematológicas com os resultados encontrados no teste molecular (WANER et al., 1996; WEN et al. 1997; WANER et al., 2001; NEER et al., 2002; MYLONAKIS et al. 2009).

6. CONCLUSÃO

- A trombocitopenia foi o único parâmetro hematológico que houve diferença estatística entre os grupos analisados.
- Ambos os exames são úteis e devem ser utilizados em conjunto com a história clínica do animal com fim de diagnosticar e diferenciar entre as fases aguda, crônica e assintomática.

REFERENCIAS

AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) in Dogs and Rhipicephalus sanguineus (Acari : Ixodidae) Ticks from Brazil Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) in Dogs and Rhipicephalus sanguineus (Acari : . 2007.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.3, n. 4, p 35-45, 2008.

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 International Medicine**, v. 10, p. 271-274, 1996.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 61, n. 3, p. 566–571, 2009.

BOTELHO, M. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis : clinicopathological and immunopathological findings. v. 119, p. 73–86, 2004.

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

BUHLES, W. C.; HUXOLL, D. L.; HILDERBRANDT, P. K. Tropical Canine Pancytopenia: Role of Aplastic Anemia in the Pathogenesis of Severe Disease. **J. Comp. Path**, v. 85, p. 511–521, 1975.

BULLA, C. et al. The Relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, v. 35, n. 9, p. 141–146, 2004.

CARRILLO, B. J. .; RESENDE, H. E. B. .; MASSARD, C. L. **Erlichiose canina no**

Estado do Rio de Janeiro, Brasil. XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. **Anais...**1976

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

COSTA, A. P. DA et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli* , *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp . among dogs in the state of Maranhão , northeastern Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol**, v. 2961, n. 1, p. 28–35, 2015.

COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte – Brazil. **Arq Esc Vet Univ Minas Gerais**, v. 25, p. 199–200, 1973.

DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285–290, 2003.

DANTAS-TORRES, F. et al. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. 2013.

DAVOUST, B.; BONI, M.; PARZY, D. Apport du laboratoire au diagnostic de l'ehrlichiose monocyttaire canine. **Revue Francaise des Laboratoires**, v. 1999, n. 310, p. 25–32, 1999.

DOYLE, C. K. et al. Detection of Medically Important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504–510, 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 co. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145–2165, 2001.

EIRAS, D. F. et al. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys*

infections in dogs from Argentina. “**Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**”, p. 6–10, 2012.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A Review of the Ticks (Acari , Ixodida) of Brazil , Their Hosts and Geographic Distribution - 1 . The State of Rio Grande do Sul , Southern Brazil. v. 95, n. 4, p. 453–470, 2000.

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

FARO, A. M. et al. Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida - Estudo Experimental. **ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP**, v. 24, n. 1, p. 1–8, 2008.

FOURIE, L. J. The Genus Rhipicephalus (Acari : Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World Guide to the Brown Ticks of the World by J . B . v. 7020, n. July, 2017.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A Retrospective Study of Ehrlichiosis in 62 Dogs from North Carolina and Virginia Johanna. **J Vet Intern Med**, v. 13, p. 194–201, 1999.

FREIRE, I. M. A.; VARGES, R.; LILENBAUM, W. Níveis séricos de uréia e creatinina em cães com leptospirose aguda determinada por amostras do sorogrupo Icterohaemorrhagiae Blood urea nitrogen and creatinine levels in dogs with acute leptospirosis determined by. **Ciencia Rural**, v. Jul, p. 1172–1175, 2008.

GAUNT, S. D. et al. Experimental infection and co-infection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis : hematologic , serologic and molecular findings. p. 1–10, 2010.

GROVES, M. G. et al. Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks

(*Rhipicephalus sanguineus*). **Am J Vet Res.**, v. 36, n. 7, p. 937–940, 1975.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. p. 83–100, 2006.

HARRUS, S. et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 66, n. 3–4, p. 241–249, 1996a.

HARRUS, S. et al. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, n. 1–2, p. 13–20, 1996b.

HARRUS, S. et al. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **The Veterinary Record**, 1996c.

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

HARRUS, S. et al. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 78, p. 155–160, 1998a.

HARRUS, S. et al. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 73–76, 1998b.

HARRUS, S. et al. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: Evaluation of a 6-week course. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2140–2142, 1998c.

HARRUS, S. et al. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2745–2749, 1999.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the

diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. v. 86, p. 361–368, 2002.

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

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292–296, 2011.

HASEGAWA, M. Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: Aspectos clínicos, laboratoriais, e resposta imune humoral e celular.** [s.l.] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2005.

HUXOLL;, D. L. et al. Laboratory studies of tropical canine pancytopenia. **Experimental Parasitology**, v. 59, p. 53–59, 1972.

HUXSOLL, D. L. Canine Erlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia): A Review. **Veterinary Parasitology**, v. 2, p. 49–60, 1976.

IQBAL Z, CHAICHANASIRIWITHAYA W, R. Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J Clin Microbiol**, v. 32, p. 1658–1662, 1994.

KOCH. Systematische Übersicht uber die Ordnung der Zecken. **Arch. Naturgesch**, v. 10, p. 217–239, 1844.

KRAWCZAK, F. DA S. et al. Serological survey on *Ehrlichia* sp . among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. v. 2961, p. 415–417, 2012.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. DE C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 6, n. 30, p. 24–30, 2001.

LAKKAWAR, A. W. et al. Pathology of canine monocytic ehrlichiosis in a german

shepherd dog. **Slov Vet Res**, v. 40, n. 2, p. 119–128, 2003.

LEONARD, J. A. . et al. Ancient DNA Evidence for Old World Origin of New World Dogs. **Science**, v. 298, n. 5598, p. 1613–1616, 2002.

LEWIS JR., G. E. . et al. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res**, v. 38, p. 1953–1955, 1977.

MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical , hematological , serological and molecular aspects. p. 766–770, 2008.

MAGGI, R. G. et al. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. p. 1–9, 2014.

MCDADE, J. E. Ehrlichiosis: A Disease of Animals and Humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 4, p. 609–617, 1990.

MORAES-FILHO, J. et al. Acta Tropica Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011.

MORAES-FILHO, J. **Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil , Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis* , the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Plos One**, v. 9, p. 1–16, 2015.

MYLONAKIS, M. E. et al. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 40, p. 174–184, 2004.

MYLONAKIS, M. E.; SIARKOU, V.; LEONTIDES, L.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; KONTOS, V. I.; KOUTINAS, A. F. Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**, v. 138, p. 390-393, 2009.

MYLONAKIS, M. E.; THEODOROU, K. N. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An update on diagnosis and treatment. **Acta Veterinaria-Beograd**, v. 67, n. 3, p. 299–317, 2017.

NEER, T. M. et al. ACVIM Consensus Statement. p. 309–315, 2002.

NYINDO, M. . et al. Cell-mediated and humoral immune response of german shepherd dogs and beagles to experimental infection with Ehrlichia canis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 14, p. 250–254, 1980.

PARMAR, C. et al. Comparative diagnostic methods for canine ehrlichiosis. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 37, p. 282–290, 2013.

PAT-NAH, H. et al. Molecular Diagnosis of Ehrlichia canis in Dogs and Ticks Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in Yucatan , Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, p. 101–104, 2015.

PEGRAM, R. G. et al. Clarification of the Rhipicephalus sanguineus group (Acari , Ixodoidea , Ixodidae). II . R . sanguineus (Latreille , 1806) and related species. **Systematic Parasitology**, v. 44, p. 27–44, 1987.

PERRILE, A. L.; MATUS, R. E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, p. 195-198, 1991.

PETNEY, T. et al. The taxonomic status of Rhipicephalus sanguineus. **Vet Parasitol**, v. 208, p. 2–8, 2015.

POPOV, V. L. et al. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus

Ehrlichia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 235–251, 1998.

POPOV, V. L. et al. Ultrastructural Evidence of the Ehrlichial Developmental Cycle in Naturally Infected *Ixodes persulcatus* Ticks in the Course of Coinfection with Rickettsia, Borrelia, and a Flavivirus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 699–716, 2007.

PRINCE, J. E.; SAYER, P. D.; DOLAN, T. T. Improved clinical approach to the diagnosis. **Trop. Anim. Hith. Prod.**, v. 19, p. 1–8, 1987.

RIBEIRO, V. L. et al. Espécies de prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 285–289, 1997.

RIKIHISA, Y.; JOHNSON, G.; BURGER, C. J. Reduced immune responsiveness and lymphoid depletion in mice infected with Ehrlichia risticii. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 9, p. 2215–2222, 1987.

ROMERO, L. E. et al. First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Costa Rica , Central America. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 1, p. 95–97, 2011.

SAINZ, Á. et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. p. 1–20, 2015.

SANTARÉM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas de diagnóstico de Ehrlichia canis.** [s.l.] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, 2003.

SANTOS, L. G. F. DOS; et al. Molecular detection of Ehrlichia canis in dogs from the Pantanal of Mato Grosso State , Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 2961, n. 2011, p. 114–118, 2013.

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

SILVA, M. C. et al. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, n. 5, p. 215–220, 2007.

SOUSA;, K. C. M. DE et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul , Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 2961, n. 4, p. 525–531, 2013.

STILES, J. Canine rickettsial infections. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 30, n. 5, p. 1135–49, 2000.

STROTTMANN, D. M. et al. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo , Rio Grande do Sul , Brasil Diagnosis and serological study of canine parvovirus infection in dogs from Passo Fundo , Rio Grande do Sul , Brazil. **Ciencia Rural**, v. 38, n. mar-abr, p. 400–405, 2008.

SWANSON, J. F. Ocular Manifestations of Systemic Recent Developments. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 849–867, 1990.

TIZARD, I. Innate immunity: inflammation. In: SAUNDERS, W. B. (Ed.). . **Veterinary immunology: an introduction**. 6th. ed. Philadelphia: Elsevier, 2000. p. 36–46.

UENO, T. E. H. et al. Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu , Estado de São Paulo , Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 2961, n. 17, p. 57–61, 2009.

UZÊDA, R. S. et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 2961, n. 2, p. 89–93, 2010.

VARGAS-HERNÁNDEZ, G. et al. Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 254–260, 2012.

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

WANER, T.; HARRUS, S.; BOGIN, E. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 307–317, 1997.

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*. v. 95, p. 1–15, 2001.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; RUSSELL, G.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with Doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

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