CAMILA SANTOS MANOEL

**Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães
infectados por Ehrlichia canis**

São Paulo
2010

CAMILA SANTOS MANOEL

**Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães
infectados por *Ehrlichia canis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientadora:
Prof^a Dr^a Mitika Kuribayashi Hagiwara

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2307
FMVZ

Manoel, Camila Santos

Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis* / Camila Santos Manoel. -- 2010.

65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara.

1. Cães. Eritiquiose monocítica canina. 2. Hematologia. 3. Prognóstico. 4. Título de anticorpos. I. Título.

*Comissão de Ética no uso de animais***CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo das alterações clínicas, hematológicas, sorológicas e fatores prognósticos da infecção por *E. canis*", protocolado sob o nº 1946/2010, utilizando 100 (cem) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Study of clinical, hematological, serological and prognostic factors of *E. canis* infection of dogs", protocol number 1946/2010, utilizing 100 (hundred) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MANOEL, Camila Santos

Título: Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À professora **Mitika Kuribayashi Hagiwara**, pelo convite, oportunidade, ensinamentos, mas também pela amizade sincera.

Aos amigos de pós-graduação **Bruno Marques Teixeira, Andrea Parra e Cláudia Regina Stricagnolo**, pelo auxílio no projeto, companheirismo e amizade.

Às médicas veterinárias do Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais – HOVET- USP **Denise Simões, Bruna Coelho, Paula Rummy, Vera Fortunato e Khadine Kanayama**, pela amizade e encaminhamento dos casos.

Aos funcionários do HOVET- USP **Carlito, Milton e Gilberto**, pela disponibilidade na coleta do material biológico.

Aos **proprietários** dos animais avaliados, por colaborarem para o projeto cedendo seus animais.

Às funcionárias do Laboratório de Hematologia do HOVET-USP, Maria Luisa Franchini e Maria Helena, pelo apoio técnico e pela amizade

Aos funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice, pelo auxílio e paciência na elaboração da dissertação

Ao meu pai, **Irineu Manoel**, tia **Suzete de Assis Santos**, e irmã, **Daniela Santos Manoel**, por serem minha família querida

Ao meu amor **Glaysen Almeida de Oliveira**, por fazer parte da minha vida.

A todos os meus queridos **amigos**, por estarem sempre presentes nos momentos felizes mas também nas adversidades.

RESUMO

MANOEL, C. S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis***. [Clinical, hematologic and sorological changes in dogs infected by *Ehrlichia canis*]. 2010. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa de ocorrência mundial e transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. As manifestações clínicas são inespecíficas e multissistêmicas. Pode apresentar as fases aguda, assintomática e crônica, as quais podem cursar com alterações hematológicas como trombocitopenia, discreta anemia e leucopenia durante a fase aguda, discreta trombocitopenia na fase assintomática, e pancitopenia nos casos crônicos graves. O estabelecimento de indicadores prognósticos para a doença pode ser de grande valia para o direcionamento do tratamento clínico. O estudo do título de anticorpos em cães infectados poderia auxiliar no diagnóstico da EMC bem como no monitoramento do tratamento. A fim de identificar as principais alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *E. canis*, foram selecionados 82 animais com diagnóstico etiológico de EMC (positivos a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR). Os cães foram subdivididos em grupos de animais assintomáticos (n=12), doentes e sobreviventes (n=51) e doentes e não sobreviventes (n=19). Foi realizado ainda acompanhamento clínico, hematológico e sorológico de 28 animais tratados com medicação preconizada, no período de até 180 dias após o tratamento. Na análise clínica, não houve predisposição sexual ou racial, porém cães maiores de 8 anos de idade apresentaram maior frequência. Os sintomas observados mais frequentemente em todos os cães, exceto nos assintomáticos, foram palidez de mucosas, apatia, hiporexia, letargia e gastroenterite. As alterações hematológicas encontradas no grupo dos cães doentes foram anemia e trombocitopenia, que variaram apenas na intensidade quando da comparação dos animais sobreviventes com os não sobreviventes, porém apenas a anemia e a leucopenia apresentaram-se como fatores prognósticos negativos para a doença. Altos títulos de anticorpos (≥ 2.560) foram observados em grande parte dos animais infectados, porém não puderam ser considerados indicadores de persistência da infecção. Em dois dos 28 animais com monitoramento pós tratamento houve reinfecção, face aos resultados novamente positivos na pesquisa de material genético para *E.canis*, associados à recidiva de alterações hematológicas em um dos dois animais, e abrupto novo aumento do título de anticorpos. Em outros animais, apesar da rápida ascensão do título concomitante à recidiva de alterações hematológicas, não

houve amplificação de DNA erliquial, sugerindo diagnóstico molecular falso negativo. Concluiu-se que alterações clínicas e hematológicas sugestivas da doença foram encontradas nos animais doentes, apenas a anemia e leucopenia podem ser indicadores prognósticos da doença, e que a interpretação do título de anticorpos deve ser feita em consonância com alterações clínicas e hematológicas do cão suspeito.

Palavras chave: Cães. Erliquiose Monocítica Canina. Hematologia. Prognóstico. Título de anticorpos.

ABSTRACT

MANOEL, C. S. **Clinical, hematologic and serological changes in dogs infected by *Ehrlichia canis***. [Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis*]. 2010. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The canine monocytic ehrlichiosis (CME) is an infectious disease occurring worldwide and is transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. The clinical manifestations are nonspecific and multisystemic. It may present acute, asymptomatic and chronic phases, which may be presented with haematological changes such as thrombocytopenia, mild anemia and leukopenia during the acute phase, mild thrombocytopenia in asymptomatic phase, and pancytopenia in severe chronic cases. The establishment of prognostic indicators for the disease may be of great value to guide clinical treatment. The study of antibodies titer in infected dogs could help in the diagnosis of CME and in monitoring treatment. In order to identify the main clinical, hematological and serological changes in dogs infected with *E. canis*, 82 animals were selected with etiologic diagnosis of a CME (positive to Polymerase Chain Reaction - PCR). The dogs were subdivided into groups of asymptomatic animals (n = 12), sick and survivors (n = 51) and sick and non-survivors (n = 19). It was also conducted clinical, hematological and serological monitoring of 28 animals treated with recommended medication for the period until 180 days after treatment. In clinical analysis, there was no racial or sexual predisposition, however dogs older than 8 years of age had a higher frequency. The most frequently reported symptoms in all dogs except the asymptomatic patients were pale mucous membranes, apathy, appetite loss, lethargy and gastroenteritis. Hematological changes found in the group of sick dogs were anemia and thrombocytopenia, which varied only in intensity when comparing the survivors to the nonsurvivors, but only anemia and leukopenia were presented as negative prognostic factors for the disease. High titers of antibodies ($2560 \geq$) were observed in most infected animals, but they could not be considered indicators of persistent infection. In two out of the 28 monitored animals after treatment there was reinfection, compared to positive results back on the research of genetic material to *E. canis*, associated with relapse of hematological changes in one of the two animals, and sudden new increase in antibody titer. In other animals, despite the rapid rise of the concurrent titer of relapse hematological changes, there was no *erliquial* DNA amplification, suggesting molecular diagnostic to be false negative. It was concluded that clinical and hematologic changes suggestive of the disease were found in sick animals, only

anemia and leukopenia may be prognostic indicators of the disease, and that the interpretation of antibody titers should be done in line with clinical and hematologic changes of the suspect dog.

Keywords: Dogs. Canine monocytic ehrlichiosis. Hematology. Prognosis. Antibody titer

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A –	Resenha clínica dos cães (n=82) infectados por <i>E.canis</i> . Sexo, raça, idade, título de anticorpos, número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e plaquetas ($\times 10^6/\mu\text{L}$), e resumo da história clínica e evolução, FMVZ/USP-São Paulo-2009.....	61
APÊNDICE B –	Resenha clínica dos cães (n=28) infectados por <i>E.canis</i> , tratados com dipropionato de imidocarb (5mg/kg/SC, total de 2 aplicações com intervalo quinzenal) e de doxiciclina (5 mg/kg/BID, por 30 dias), que foram acompanhados durante 180 dias, FMVZ/USP-São Paulo-2009	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães (n=82) infectados por <i>E.canis</i> -São Paulo-2009.....	28
Tabela 2 -	Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães (n=12) infectados por <i>E.canis</i> e assintomáticos.- São Paulo-2009	28
Tabela 3 -	Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães doentes (n=70) infectados por <i>E.canis</i> -São Paulo-2009.....	29
Tabela 4 -	Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães doentes com EMC e sobreviventes (S, n=51)- São Paulo-2009.....	33
Tabela 5 -	Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães com EMC não sobreviventes (NS, n=19) infectados por <i>E.canis</i> -São Paulo-2009.....	33
Tabela 6 -	Número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por <i>Ehrlichia canis</i> , nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento-São Paulo-2009.....	36
Tabela 7 -	Concentração de hemoglobina (g/dL), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por <i>Ehrlichia canis</i> , nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento-São Paulo-2009	37
Tabela 8 -	Hematócrito (%), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por <i>Ehrlichia canis</i> , nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento-São Paulo-2009.....	38
Tabela 9 -	Número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por <i>Ehrlichia canis</i> , nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento-São Paulo-2009	39
Tabela 10 -	Número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por <i>Ehrlichia canis</i> , nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento-São Paulo-2009.....	40
Tabela 11 -	Variáveis hematemétricas, título de anticorpos anti <i>E.canis</i> e resultados da PCR para pesquisa de material genético de <i>E.canis</i> -São Paulo-2009.	43
Tabela 12 -	Título de anticorpos de animais PCR (+) para <i>E.canis</i> no momento da apresentação clínica (tempo 0), 30, 90 e 180 dias após o início do tratamento-São Paulo-2009.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Amplificação de material genético (389pb) de <i>E.canis</i> pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos animais estudados. Técnica de Nested PCR. Produtos de amplificação observados em gel de agarose a 2% corado com Syber Safe® e visualizados através de transiluminador. Coluna 1 marcador de peso molecular de 100 pb; 2 – controle positivo; 3 – controle negativo da PCR; 4 – controle negativo da Nested PCR; 5 – amostra negativa; 6 – amostra positiva-São Paulo-2009.....	25
Figura 2 -	Distribuição dos cães (n=82) infectados por <i>E.canis</i> (PCR +), de acordo com a faixa etária-São Paulo-2009	26
Figura 3 -	Distribuição dos cães infectados por <i>E. canis</i> (PCR+), de acordo com a definição racial-São Paulo-2009	26
Figura 4 -	Distribuição dos cães infectados por <i>E. canis</i> (n=82), de acordo com as manifestações clínicas presentes no momento do exame clínico inicial-São Paulo-2009	27
Figura 5 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009.....	29
Figura 6 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil da concentração de hemoglobina (g/dL) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009.....	29
Figura 7 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do hematócrito (%) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009	30
Figura 8 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009	30
Figura 9 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009	30
Figura 10 -	Mórulas de <i>Ehrlichia canis</i> fluorescentes ao conjugado anti IgG canino, cultivadas em células DH82-São Paulo-2009.....	31
Figura 11 -	Distribuição dos cães infectados por <i>E. canis</i> de acordo com o título de anticorpos apresentado no momento da apresentação clínica-São Paulo-2009.....	31
Figura 12 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, n=12); B, cães doentes e sobreviventes (S, n=51); C, cães não sobreviventes (NS, n=19)-São Paulo-2009	34

Figura 13 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil da concentração de hemoglobina (g/dL) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, n=12); B, cães doentes e sobreviventes (S, n=51); C, cães não sobreviventes (NS, n=19)-São Paulo-2009.....	34
Figura 14 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do hematócrito (%) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, n=12); B, cães doentes e sobreviventes (S, n=51); C, cães não sobreviventes (NS, n=19)-São Paulo-2009	34
Figura 15 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, n=12); B, cães doentes e sobreviventes (S, n=51); C, cães não sobreviventes (NS, n=19)-São Paulo-2009	35
Figura 16 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, n=12); B, cães doentes e sobreviventes (S, n=51); C, cães não sobreviventes (NS, n=19)-São Paulo-2009.	35
Figura 17 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos cães infectados por <i>E.canis</i> (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009	41
Figura 18 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil da concentração de hemoglobina (g/dL) dos cães infectados por <i>E.canis</i> (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009.....	41
Figura 19 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do hematócrito (%) dos cães infectados por <i>E.canis</i> (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009	41
Figura 20 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães infectados por <i>E.canis</i> (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009	42
Figura 21 -	Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães infectados por <i>E.canis</i> (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009.	42
Figura 22 -	Gráfico do perfil médio do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos cães que eliminaram a infecção (●) e o número de hemácias dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009.	43
Figura 23 -	Gráfico do perfil médio da concentração de hemoglobina (g/dL) dos cães que eliminaram a infecção (●) e a concentração de hemoglobina dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009..	44
Figura 24 -	Gráfico do perfil médio do hematócrito (%) dos cães que eliminaram a infecção (●) e o hematócrito dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009.....	44

Figura 25 -	Gráfico do perfil médio do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães que eliminaram a infecção (○) e o número de leucócitos dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009.....	45
Figura 26 -	Gráfico do perfil médio do número de plaquetas ($/\mu\text{L}$) dos cães que eliminaram a infecção (○) e o número de plaquetas dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009	45
Figura 27 -	(A). Gráfico do perfil médio do título de anticorpos dos cães que eliminaram a infecção (○). (B) Título de anticorpos dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO GERAL	21
2.1	Objetivos específicos	21
3	MATERIAL E MÉTODO	22
3.1	Animais	22
3.2	Avaliação hematológica	23
3.3	Reação de imunofluorescência indireta para titulação de anti- corpos anti- <i>Ehrlichia canis</i>	23
3.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
3.5	Análise estatística	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Aspectos clínicos dos cães infectados por <i>E.canis</i>	25
4.2	Avaliação hematológica dos cães infectados por <i>E.canis</i>	27
4.3	Título de anticorpos	31
4.4	Avaliação clínica após o tratamento	32
4.5	Avaliação clínica, hematológica e sorológica sequencial dos cães tratados	35
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICES	61

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina (EMC) foi originalmente descrita na Algeria em 1935 por Donatien e Lestoquard. Entre 1968 a 1970, durante a guerra no Vietnã, foi a responsável pela morte de 300 cães militares (HUXSOLL et al., 1970). No Brasil, a erliquiose canina foi inicialmente relatada em 1973 por Costa et al., em Belo Horizonte, Minas Gerais. Atualmente apresenta distribuição mundial, particularmente em áreas tropicais e subtropicais (WEN et al., 1997), e no Brasil já foi identificada em todas as regiões do país (LABRUNA; PEREIRA, 2001). O agente etiológico da EMC é a *Ehrlichia canis*, bactéria intracelular obrigatória, pleomórfica e gram negativa, pertencente à ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae, gênero *Ehrlichia* (DUMLER et al., 2001). O principal vetor e reservatório de *E. canis* é o carrapato marrom *Rhipicephalus sanguineus*, no qual ocorre a transmissão transtadiária estrita (LABRUNA; PEREIRA, 2001). O *R. sanguineus* possui hábitos nidícolas, o intervalo entre gerações é curto e os cães são os únicos hospedeiros de importância primária para a manutenção das populações destes carrapatos. Os caninos, principalmente aqueles em ambiente urbanizado, estão sempre sujeitos a infestações pelo *R. sanguineus* (LABRUNA; PEREIRA, 2001), e portanto são também suscetíveis à EMC.

A infecção por *E.canis* resulta na replicação das erlíquias nas células mononucleares fagocíticas do hospedeiro, onde são formadas as mórulas, ou colônias de bactérias envoltas por uma membrana vacuolar. (COHN, 2003). Pode-se classificar clinicamente a infecção por *E.canis* em fase aguda, assintomática e crônica. Na fase aguda, após um período de incubação de 8 a 20 dias, os cães infectados apresentam sintomas de comprometimento sistêmico, gerais e inespecíficos, tais como depressão, perda de peso, letargia, hiporexia ou anorexia e síndrome febre, além de esplenomegalia e linfonodomegalia (HASEGAWA, 2005; NEER, 2006; CASTRO et al., 2004). Ainda na fase aguda da infecção, que pode ser de 5 a 8 semanas de duração, podem ser observados sintomas de comprometimento ocular (conjuntivite, uveíte, retinopatias), neurológico (convulsões, ataxia) e do sistema músculoesquelético (artralgia, claudicação, mialgias), e tendências à hemorragia. As alterações hematológicas incluem trombocitopenia e discreta anemia e leucopenia (HARRUS et al., 1999; NEER, 2006). Alguns cães sucumbem à fase aguda da doença, porém muitos eliminam a bactéria ou progridem para a fase assintomática (HARRUS et al., 1996a; NEER, 2006). Durante a fase assintomática o animal permanece aparentemente saudável (CODNER; LINDA, 1986), entretanto os organismos persistem alojados nas células mononucleares esplênicas do hospedeiro

(HARRUS et al., 1998). As alterações hematológicas que podem ser encontradas são trombocitopenia e leucopenia discretas. Não se sabe ao certo o período de duração dessa fase, que pode ser longa, talvez duradoura (WANER et al., 1997). E finalmente, nos casos em que a infecção evolui para a fase crônica, ocorre a exacerbação dos sintomas descritos na fase aguda, além de complicações da infecção, incluindo a glomerulonefrite com síndrome nefrótica ou pancitopenia resultando em infecções secundárias, anemia grave ou hemorragias (NEER, 2006; HARRUS et al., 1999). O quadro mórbido associado à infecção por *E. canis* é variável, sendo influenciado pela cepa do agente, estado imunológico do hospedeiro e, até mesmo pela raça do cão acometido (COHN, 2003).

O diagnóstico clínico se baseia no histórico e nas alterações clínicas e hematológicas e é confirmado quando são observadas inclusões intracitoplasmáticas em leucócitos (mórulas) em esfregaços sanguíneos dos cães infectados (HOSKINS, 1991). Do ponto de vista clínico, muitos se baseiam na trombocitopenia como indicador da infecção. Bulla et al. (2004) afirmam que a trombocitopenia se constitui em um bom teste de triagem e que a magnitude da trombocitopenia pode aumentar a confiabilidade no diagnóstico. Por outro lado, para alguns, a erliquiose canina não se constitui na causa principal de trombocitopenia (DAGNONE et al., 2003). Outras causas, infecciosas ou não, devem ser incluídas no diagnóstico diferencial das trombocitopenias.

A confirmação do diagnóstico clínico pela pesquisa de inclusões intracitoplasmáticas é extremamente difícil. Embora as mórulas tenham sido evidenciadas em todos os cães infectados durante a fase aguda, por um curto espaço de tempo e de forma intermitente, (HASEGAWA, 2005) seu encontro nos casos de ocorrência natural é muito raro, sendo observado em menos de 4 % dos casos submetidos à pesquisa (HARRUS; BARK; WANER, 1997). Especialmente nos casos crônicos em que a pancitopenia é a alteração clínica principal, a pesquisa das mórulas deve ser realizada em aspirado citológico de linfonodo ou de medula óssea, e há necessidade de percorrer pelo menos 1.000 campos microscópicos com aumento de 600 vezes para se encontrar uma célula infectada (MYLONAKIS et al., 2003).

O diagnóstico etiológico é estabelecido pelo isolamento e cultivo da bactéria (COHN, 2003) em linhagem celular estabelecida (DH 82). Entretanto, o crescimento da *Ehrlichia canis* em cultivo celular é lento, necessitando-se de cerca 30 a 70 dias para se obter o isolamento primário e a demonstração por técnicas de imunofluorescência da presença do microrganismo nas células cultivadas (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998). Portanto, apesar de se constituir no método diagnóstico por excelência da infecção dos cães por *E. canis*, o longo período de tempo necessário para a obtenção dos resultados não

possibilita seu uso para fins de diagnóstico (HARRUS ; BARK; WANER, 1997; IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA, 1994; HARRUS; WANER, 2010).

A infecção por *E. canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos, que podem ser observados na circulação sanguínea 7 dias (IgM) a 15 dias (IgG) após a infecção (WANER et al., 2001). Inicialmente os títulos de IgG são relativamente baixos (640), mas à medida que a infecção progride, o aumento do título é evidente. Os cães que se recuperam da fase aguda da doença ou aqueles que recebem inadequado tratamento progridem para a fase de infecção inaparente. Nestes, o título de anticorpos se mantém em altos patamares, em geral de 2.560 a 20.480 (HARRUS; BARK; WANER, 1997; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999). Portanto, altos títulos de anticorpos em cães aparentemente normais pode indicar persistência da infecção e estímulo antigênico crônico (PERILLE; MATUS, 1991; WANER et al., 2001). Assim, o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), a despeito de outras técnicas desenvolvidas (Western Blotting, ELISA) continua a ser o teste sorológico por excelência, no diagnóstico da erliquiose canina (CADMAN et al., 1994; WANER; HARRUS, 2000; HARRUS et al., 2002; BÉLANGER et al., 2002; O'CONNOR et al., 2006) e na avaliação da eficiência do tratamento (PERILLE; MATUS, 1991). O teste tem sido utilizado para o acompanhamento dos cães infectados após o tratamento com doxiciclina, tetraciclina, dipropionato de imidocarb ou outros protocolos antimicrobianos (BARTSCH; GREENE, 1996; HARRUS, et al., 1998; PERILLE; MATUS, 1991). Após o tratamento bem sucedido, o título de anticorpos declina, tornando-se indetectável em 6 a 12 meses (NEER, 2006). A imunidade humoral não é, aparentemente, protetora, sendo indicativa de estímulo antigênico prolongado, portanto da presença do agente. Não se sabe ao certo se a alta concentração de IgG contribui para a patogenia da doença (HARRUS; BARK; WANER, 1997).

A pesquisa quantitativa de anticorpos (IFI) tem sido amplamente utilizada para o monitoramento da terapia anti-*E. canis*. Na maioria dos cães, o título de anticorpos declina rapidamente e geralmente se torna negativo 6 a 9 meses após a terapia. A persistência de altos títulos ou a permanência dos títulos em patamares próximos aos iniciais pode indicar a persistência da infecção a despeito dos resultados negativos nos testes moleculares. Portanto, por ser um teste de fácil execução e que pode ser difundido para outros laboratórios de diagnóstico veterinário, deve ser implementado para o monitoramento da resposta ao tratamento instituído e eliminação da infecção, sem a necessidade da realização de testes moleculares. Pode também possibilitar o reconhecimento da reinfecção, que se traduz na rápida ascensão do título de anticorpos.

O teste ELISA comercialmente disponível, por se tratar de um teste qualitativo, sinaliza apenas infecção presente ou passada, não permitindo avaliar a ascensão ou o declínio dos anticorpos. Em baixos títulos, não existe correlação entre a reação de IFI e a positividade ao teste ELISA – comercial, indicando a maior sensibilidade do primeiro (O'CONNOR et al, 2006; HARRUS et al., 2002).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular (PCR - *polymerase chain reaction*) possibilitou a detecção de material genético de *E. canis*, o que trouxe novas perspectivas de diagnóstico. Fragmentos do gene 16SrRNA são extraídos e amplificados com o uso de iniciadores específicos, sob condições padronizadas de amplificação (WEN et al., 1997). O material amplificado é indicativo da presença de material genético de microorganismos do gênero *Ehrlichia* sp. Uma segunda reação é realizada (Nested PCR), com iniciadores específicos que permitem a identificação da espécie envolvida, no caso específico, *Ehrlichia canis*. Outras técnicas também foram desenvolvidas, com a amplificação de outras regiões do gene 16S rRNA e hibridização e quimiluminescência (MCBRIDE et al., 1996), ou por PCR seguido de sequenciamento do fragmento para a identificação da espécie (AGUIAR et al., 2007).

A PCR é uma técnica altamente sensível, que permite a detecção de mínimas quantidades de DNA, da ordem de 1 fg de DNA genômico, equivalente a 5 organismos de *E. canis*. Já foi detectado DNA erliquial em amostras de sangue periférico, aspirados de baço e medula óssea (HARRUS et al., 2004), soro sanguíneo (MYLONAKIS et al., 2009), como também a partir de tecidos macerados oriundos do cérebro, cerebelo, coração, pulmão, fígado, baço, estômago, intestinos, rins, linfonodos, medula óssea e vesícula biliar (RUNGSIPIPAT et al., 2009).

A técnica tem sido utilizada no diagnóstico da erliquiose canina, na fase aguda da infecção ou na fase crônica, para a confirmação do diagnóstico clínico (HASEGAWA, 2005; MCBRIDE et al., 1996; HARRUS; BARK; WANER, 1997). Na fase aguda da infecção o DNA erliquial obtido de amostra de sangue periférico pode ser detectado a partir do quarto dia após a infecção, e mesmo a PCR realizada utilizando-se soro sanguíneo de animal infectado pode apresentar resultado positivo no diagnóstico molecular, porém o teste de IFI da mesma amostra pode fornecer resultados negativos devido ao período de soroconversão de até 15 dias (MYLONAKIS et al., 2009).

No entanto, após tratamento incompleto ou devido à resistência natural do hospedeiro a infecção residual pode se limitar à localização esplênica (HARRUS et al., 1998b; HARRUS et al., 2004). Nessas condições, a pesquisa do agente deve ser realizada em aspirados do baço,

medula óssea ou linfonodo (HARRUS et al., 2004). Embora se preste para o diagnóstico da infecção, a PCR torna-se menos sensível como indicador da esterilização da infecção após o tratamento. Relatou-se recentemente que a PCR torna-se negativa, a partir de amostra sanguínea periférica, em aproximadamente 9 dias após tratamento (BANETH et al., 2009). Portanto, após a realização do tratamento, a PCR positiva em amostra de sangue periférico indica a persistência da infecção. Resultados negativos podem indicar a esterilização da infecção, como também a persistência de infecção residual no baço ou na medula óssea (HARRUS et al., 2004; HARRUS et al., 1998b).

Quando se baseia na PCR para o monitoramento do tratamento da erliquiose canina, a reação deve ser repetida duas semanas após a suspensão do tratamento. Reação positiva indica persistência da infecção e a necessidade de novo ciclo de tratamento. Se ainda permanecer positiva, deve ser introduzido outro antimicrobiano. Se o resultado for negativo em qualquer um dos momentos, o teste deve ser repetido em dois meses (NEER et al., 2002). Portanto, para se considerar a esterilização da infecção, há necessidade de dois testes sequenciais, com resultados negativos. E ainda, existe a possibilidade de, em raros casos, ocorrer o sequestro do microorganismo no baço (HARRUS et al., 2004). A realização de vários testes moleculares para o diagnóstico e para a avaliação da eficácia do tratamento é extremamente difícil de ser introduzida na prática veterinária, considerando-se o custo desses exames e a disponibilidade de poucos centros de diagnóstico especializados em técnicas moleculares. Outra opção, atualmente, seria o uso da PCR quantitativa – “Real Time PCR” para o monitoramento da terapia, porém este teste também tem custo oneroso, além de ser de difícil acesso ainda à rotina clínica (PELEG et al., 2009; MYLONAKIS et al., 2009; HARRUS; WANER, 2010). IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA (1994) sugeriram a utilização conjunta de IFI e PCR para a otimização do diagnóstico da EMC, já que o isolamento da bactéria e o Western Immunoblotting não apresentam a praticidade das duas técnicas inicialmente citadas.

A doxiciclina se constitui na droga de eleição para o tratamento da erliquiose monocítica canina (NEER et al., 2002) Outros protocolos terapêuticos incluem dipropionato de imidocarb, associado ou não ao primeiro (SAINZ et al., 2000) As tetraciclina de um modo geral, também são empregadas no tratamento da erliquiose canina, com resultados nem sempre satisfatórios. (BREITSCHWERDT et al., 1998) A doxiciclina na dose de 10 mg/kg de peso/dia é recomendada por períodos variáveis de 15 dias (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998) a 28 dias (SAINZ et al., 2000; NEER, 2006). O tratamento por 28 dias é indicado nas infecções agudas ou crônicas, resultando na remissão dos sintomas na maioria dos cães doentes. A normalização das alterações hematológicas constitui-se no critério clínico

utilizado para indicar a resolução do quadro clínico. Entretanto, as alterações hematológicas em alguns casos podem persistir por 3 a 6 meses. Além disso, apesar de seu uso rotineiro e eficaz durante a fase aguda, nos casos de infecção assintomática ou crônica pode ser necessário o uso de doxicilina por tempo prolongado (NEER, 2006) e, ainda assim, haver a persistência da infecção.

O prognóstico para os casos de infecção aguda e assintomática é bom, já nas infecções crônicas é de reservado a mau. Shipov et al. (2008) relacionaram mau prognóstico a animais que apresentam grave leucopenia (leucócitos totais $< 0,93 \times 10^3 / \mu\text{L}$) ou anemia (hematócrito $< 11,5\%$) ou pancitopenia acentuada (leucócitos totais $< 4 \times 10^3 / \mu\text{L}$, hematócrito $< 25\%$, plaquetas $< 50 \times 10^3 / \mu\text{L}$), ou seja, as alterações hematológicas frequentemente encontradas na fase crônica da doença (HARRUS et al., 1997). Além disso, tendências hemorrágicas também foram indicadoras de mau prognóstico. Nos casos mais avançados, principalmente na fase crônica, o tratamento requer hospitalização, cuidados intensivos e gastos onerosos, apesar da pequena chance de recuperação do paciente. O conhecimento dos prognósticos da erliquiose canina, que permitam ao clínico veterinário a adoção de medidas terapêuticas mais adequadas para cada um dos pacientes e a adequada orientação ao proprietário é, portanto, de grande valia na clínica de pequenos, porém ainda não há muitos trabalhos nem casuística numerosa para complementar e apoiar esses resultados.

Nos casos mais avançados, principalmente na fase crônica, o tratamento requer hospitalização, cuidados intensivos e gastos onerosos, apesar da pequena chance de recuperação do paciente (SHIPOV et al., 2008). É útil, portanto, diferenciar, no momento da apresentação inicial, quais os cães que apresentam indicadores prognósticos relacionados à resposta terapêutica satisfatória daqueles que provavelmente não irão responder.

2 OBJETIVO GERAL

As alterações clínicas, hematológicas e sorológicas em cães infectados por *E. canis*, nos quais se confirmou a presença do agente infeccioso por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Ehrlichia canis*, foram compiladas e analisadas a fim de se caracterizar o quadro clínico e hematológico da erliquiose monocítica canina (EMC) e avaliar a possível correlação entre alteração hematológica e o prognóstico da doença.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Avaliação das alterações hematológicas dos cães infectados por *Ehrlichia canis*;
- 2- Estudo das alterações hematológicas como fatores prognósticos da doença;
- 3- Dinâmica do título de anticorpos em cães infectados por *E.canis*, antes e após o tratamento específico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram incluídos no estudo 82 cães em que se estabeleceu o diagnóstico de erliquiose monocítica canina (EMC) e que apresentaram resultados positivos na reação em cadeia da polimerase (nested-PCR) para pesquisa de material genético de *Ehrlichia canis*. Desses cães, 70 haviam sido atendidos no Hospital Veterinário de FMVZ-USP e por apresentarem alterações hematológicas (anemia, trombocitopenia e ou leucopenia), ou histórico de ixodidiose, sintomas inespecíficos como alterações do apetite, perda de peso e palidez das mucosas, ou manifestações sistêmicas, foram incluídos no presente estudo no âmbito do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP. Os demais 12 cães faziam parte dos cães de guarda mantidos no Centro Tecnológico da Marinha – CTM/USP e eram contactantes de três cães em que se estabeleceu o diagnóstico clínico e etiológico de EMC. Todos os cães desse grupo se apresentavam infestados por carrapatos. Como parte do protocolo para o diagnóstico da infecção por *E. canis*, todos os cães foram avaliados quanto aos aspectos físicos procedendo-se também ao exame hematológico, titulação de anticorpos anti- *Ehrlichia canis* e pesquisa de material genético do microrganismo no sangue periférico, no momento da apresentação clínica. Após a confirmação do diagnóstico etiológico pela demonstração de material genético de *Ehrlichia canis* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), todos os cães foram submetidos ao tratamento específico, baseado no uso de dipropionato de imidocarb (5mg/kg/SC, total de 2 aplicações com intervalo quinzenal) e de doxiciclina (5 mg/kg/BID, por 30 dias). Trinta dias após o início do tratamento, todos os cães foram novamente submetidos ao exame clínico, avaliação hematológica, titulação de anticorpos anti- *Ehrlichia canis* e pesquisa de material genético do organismo para se avaliar a eficácia do tratamento e a eliminação da infecção erliquial. Dos cães inicialmente avaliados, não houve o retorno de 19 cães cujos proprietários informaram o desfecho fatal ocorrido em seus animais. Para a análise comparativa das alterações hematológicas entre os cães que apresentavam infecção inaparente, aqueles que se recuperaram e os que não sobreviveram, os cães foram formados três grupos: o grupo dos cães com infecção inaparente (assintomáticos, n=12, o grupo dos cães que sobreviveram e se recuperaram (n=51) e o grupo dos cães doentes, que não sobreviveram a infecção (n= 19). Vinte e oito cães foram acompanhados por um período de seis meses, realizando-se avaliação hematológica, sorológica e molecular aos 30, 90 e 180 dias.

Os valores de referência considerados neste estudo são os citados por Jain (1993), os quais também são utilizados na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: Hemácias: 5,5 a 8,5 $\times 10^6/\mu\text{L}$; Leucócitos: 6,0 a 17,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$; Hematócrito: 37 a 55%; Hemoglobina: 12,0 a 18 g/dL; Plaquetas: 200,0 a 500,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$. Pancitopenia foi definida como Hemácias $<5,5 \times 10^6/\mu\text{L}$, Leucócitos $<5,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, e Plaquetas $<150 \times 10^3/\mu\text{L}$ (HARRUS et al., 1997).

3.3 Reação de imunofluorescência indireta para titulação de anti-corpos anti-*Ehrlichia canis*

O título de anticorpos anti *E.canis* foi determinado no soro sanguíneo utilizando-se a RIFI (AGUIAR, 2007). As lâminas, contendo células DH82, nas quais foram cultivadas a *E. canis*, cepa Jaboticabal (acesso no *GeneBank* nº EU439942), previamente preparadas e conservadas a temperatura de -20°C , foram deixadas à temperatura ambiente por trinta minutos. Os soros foram diluídos com solução salina tamponada (pH 7,2), partindo-se da diluição 1:40, e sucessivamente diluídas em razão dois; 10 μL de cada diluição foi colocado em cada um dos orifícios, e as lâminas incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, lavadas em solução fisiológica e adicionadas de 10 μL de conjugado anti-IgG canino – FITC, incubadas a 37°C por trinta minutos, lavadas, secas e cobertas com glicerina tamponada. A leitura foi realizada em microscópio de epiluminação (Olympus BX 60®) com lâmpada de alta pressão, no aumento de 40x. Foram considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência de intensidade na diluição maior que 1:80 (WANER et al., 2001).

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A extração de DNA da amostra de sangue preservado em EDTA sódico, foi realizada utilizando-se kit comercial – GE Healthcare® 0,5 a 1 μg do DNA extraído foi adicionado a 12,5 μL do “mix” Go Taq Green Master Mix® e 0,2 μL dos oligonucleotídeos iniciadores, primers (ECG 5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3') e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGGC-3'). O material amplificado foi submetido a novo ciclo de amplificação (nested-PCR) utilizando-se dos primers HE-E (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT-3') e ECA (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3'). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Syber Safe® e visualizados com iluminação ultravioleta, através de transiluminador. Foram amplificados fragmentos de 478pb

(*Ehrlichia* sp) e de 389pb (*Ehrlichia canis*). A amplificação do material genético foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica da Universidade de São Paulo, segundo a técnica descrita por Bulla (2004).

3.5 Análise Estatística

Para a análise dos resultados, foi utilizado o programa estatístico Sigma Stat 3.0, avaliando-se inicialmente a característica da distribuição das variáveis por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste t de Student foi realizado para a comparação das variáveis número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, número de leucócitos e plaquetas entre os grupos sintomáticos e assintomáticos quando a distribuição foi normal, e o teste de Mann Whitney Rank Sum Test foi utilizado para a análise comparativa das mesmas variáveis entre os grupos dos cães sobreviventes e não sobreviventes e também para a avaliação da relação entre as alterações hematológicas e o prognóstico da doença.

4 RESULTADOS

Os resultados positivos no teste molecular para pesquisa de material genético de *E. canis* (Nested PCR) confirmaram, o diagnóstico clínico de erliquiose monocítica canina formulado no momento da apresentação clínica, indicando a presença de infecção ativa em todos os cães incluídos no estudo. Na figura 1 é apresentado o perfil eletroforético do material amplificado nas condições citadas, com a presença de uma banda de 389 pb.

Figura 1 - Amplificação de material genético (389pb) de *E.canis* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos animais estudados. Técnica de Nested PCR. Produtos de amplificação observados de gel de agarose a 2% corado com Syber Safe® e visualizados através de transiluminador. Coluna 1 – marcador de peso molecular de 100 pb; 2 – controle positivo; 3 – controle negativo da PCR; 4 – controle negativo da Nested PCR; 5 – amostra negativa; 6 – amostra positiva-São Paulo-2009

4.1 Aspectos clínicos dos cães infectados por *E.canis*

Dentre os cães incluídos no estudo, 56% (46/82) eram machos e as fêmeas totalizaram 44% (36/82). A idade média dos animais foi de 7,36 anos, sendo a idade mínima de 8 meses e a máxima de 14,8 anos. 45% (37/82) dos animais tinham mais de 8 anos. Na figura 2 encontra-se apresentada a distribuição dos cães de acordo com a faixa etária.

Figura 2 - Distribuição dos cães (n=82) infectados por *E.canis* (PCR +), de acordo com a faixa etária-São Paulo-2009

Houve maior frequência de animais sem definição racial. Cães das raças Poodle, Rottweiler e Cocker Spaniel também se encontravam presentes, além de outras raças, conforme se vê na figura 3.

Figura 3 - Distribuição dos cães infectados por *E. canis* (PCR+), de acordo com a definição racial-São Paulo-2009

Os cães contactantes em que havia apenas o histórico de ixodidiose não apresentavam nenhuma manifestação clínica, embora estivessem infectados por *E. canis*, com resultados positivos na PCR. As principais manifestações clínicas observadas nos demais animais foram palidez das mucosas, hiporexia ou anorexia e apatia ou letargia. Na figura 4 encontram-se listadas as principais alterações clínicas observadas no exame físico dos animais. Doze cães

eram aparentemente hígidos, sem nenhuma manifestação clínica que indicasse a existência de infecção ativa por *E. canis* (cães pertencentes ao Centro Tecnológico da Marinha com ixodidiose, e contactantes dos casos confirmados com EMC que haviam sido diagnosticados naquele local). O diagnóstico de infecção foi estabelecido pela pesquisa de material genético de *E. canis*. No apêndice A, quadro 1, estão apresentados os dados de resenha clínica de todos os 82 cães infectados por *E.canis*.

Figura 4 - Distribuição dos cães infectados por *E. canis* (n=82), de acordo com as manifestações clínicas presentes no momento do exame clínico inicial-São Paulo-2009

4.2 Avaliação hematológica dos cães infectados por *E.canis*

Houve uma considerável variação nos valores hematológicos analisados. A tabela 1 apresenta os valores mínimos, máximos, a média, mediana e erro padrão da média do número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas dos animais estudados.

Tabela 1 - Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães (n=82) infectados por *E.canis*-São Paulo-2009

Valores	Hemácias (x10⁶/μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (x10³/μL)	Plaquetas (x10³/μL)
Média	5,9	11,9	28,8	8,3	109,0
Mediana	6,3	13,0	29,0	6,0	83,0
Erro padrão da média	1,7	4,2	10,8	7,8	93,4
Valor mínimo	0,6	2,2	5,0	0,2	4,6
Valor máximo	7,9	17,0	52,0	44,1	624,0

Quando se analisam os resultados da hematimetria, leucometria e plaquetometria dos cães contactantes e assintomáticos, porém infectados por *E. canis* (PCR +) e dos doentes, observa-se que os primeiros apresentam os valores mais altos enquanto nos animais doentes, os valores observados foram menores. Tabelas 2 e 3. Houve diferença significativa entre esses dois grupos na análise de todos os valores hematológicos, sendo $p < 0,001$ para número de hemácias, leucócitos, plaquetas e hematócrito, e $p = 0,001$ para hemoglobina (figuras 5, 6, 7, 8 e 9).

Tabela 2 - Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães (n=12) infectados por *E.canis* e assintomáticos-São Paulo-2009

Valores	Hemácias (x10⁶/μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (x10³/μL)	Plaquetas (x10³/μL)
Média	6,7	14,6	42,8	13,0	215,5
Mediana	6,7	14,6	43,0	12,0	207,0
Erro padrão da média	0,8	1,4	4,1	4,5	59,4
Valor mínimo	5,2	12,6	36,1	5,6	134,0
Valor máximo	7,9	17,0	49,1	20,4	347,0

Tabela 3 - Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães doentes (n=70) infectados por *E.canis*-São Paulo-2009

Valores	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Média	3,9	9,3	26,3	7,5	88,8
Mediana	4,6	10,8	28,0	5,7	57,0
Erro padrão da média	1,5	4,4	9,7	7,8	93,4
Valor mínimo	2,2	3,0	5,0	0,2	5,0
Valor máximo	5,5	17,0	52,0	44,1	624,0

p<0,001

Figura 5 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009

p=0,001

Figura 6 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil da concentração de hemoglobina (g/dL) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009

$p < 0,001$

Figura 7 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do hematócrito (%) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009

$p < 0,001$

Figura 8 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009

$p < 0,001$

Figura 9 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (n=12); B, cães doentes. (n=70)-São Paulo-2009

4.3 Título de anticorpos

Em relação ao título de anticorpos, 6 dos 82 animais (7,3%) não apresentavam título de anticorpos no momento inicial da detecção de material genético para *E. canis*, apenas um . único animal apresentou título 80 e 91,5% dos animais (75/82) apresentavam títulos maiores que 2.560. O título mais alto (81.920) foi observado em 14 cães. Na figuras 10 são observadas células DH82 infectadas com *Ehrlichia canis* com intensa fluorescência, indicando a presença de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* no soro testado. Na figura 11 encontra-se apresentada a distribuição dos animais positivos para *E.canis* (n=82) de acordo com o título de anticorpos.

Figura 10 - Mórulas de *Ehrlichia canis* fluorescentes ao conjugado anti IgG canino, cultivadas em células DH82-São Paulo-2009

Figura 11 - Distribuição dos cães infectados por *E. canis* de acordo com o título de anticorpos apresentado no momento da apresentação clínica-São Paulo-2009

4.4 Avaliação clínica após o tratamento

Ao término do tratamento, a pesquisa de material genético de *E.canis* em todos os cães que haviam apresentado infecção inaparente, isto é, não apresentavam manifestações clínicas, porém eram positivos ao teste molecular, se revelou negativa, indicando-se assim a eliminação do agente infeccioso...

Manifestações clínicas similares foram observadas nos cães que sobreviveram e em aqueles que sucumbiram a infecção, tendo sido no entanto, de maior intensidade nos últimos. Entretanto, em relação a trombocitopenia e diátese hemorrágica, foram observadas em maior frequência (15,7%) entre os cães que não sobreviveram e em apenas 3,9% dos casos no grupo dos sobreviventes.

Os valores hematológicos dos cães doentes que não sobreviveram (NS, n=19), obtidos no momento da apresentação clínica, foram cotejados com os valores hematológicos dos cães assintomáticos (A, n=12) e dos cães doentes que sobreviveram e se recuperaram da infecção (S, n= 51). Na tabelas 4 e 5 são apresentados os valores das medianas do número de hemácias, leucócitos e de plaquetas, e valores de hemoglobina e hematócrito dos 51 animais doentes e sobreviventes (S) e dos 19 cães que vieram a óbito (NS), respectivamente. Os cães com erliquiose que apresentaram evolução fatal tinham no momento do exame clínico inicial alterações hematológicas mais intensas comparadas com os cães sobreviventes, assintomáticos (A) ou sintomáticos (S). Assim os cães não sobreviventes (NS) apresentavam menor número de hemácias, leucócitos, plaquetas e valores de hematócrito e hemoglobina ($p<0,001$) quando comparados aos assintomáticos (A); na comparação dos NS com os demais doentes (S), houve diferença significativa apenas na comparação do número de leucócitos ($p<0,001$) e dos valores de hemoglobina ($p=0,044$) e hematócrito ($p<0,001$). Ambos os grupos de animais doentes, sobreviventes (S) e não sobreviventes (NS), apresentaram valores de mediana do número de leucócitos limítrofes de $6,0 \times 10^3/\mu\text{L}$. Pancitopenia foi evidenciada em 84% dos casos com evolução fatal.

Tabela 4 - Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães doentes com EMC e sobreviventes (S, n=51)-São Paulo-2009

Valores	Hemácias (x10⁶/μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (x10³/μL)	Plaquetas (x10³/μL)
Média	5,1	11,5	29,1	8,9	94,7
Mediana	5,1	11,0	29,0	6,0	64,0
Erro padrão da média	0,6	2,9	8,7	8,4	99,7
Valor mínimo	4,7	8,0	8,0	0,4	4,6
Valor máximo	5,5	17,0	52,0	44,1	624,0

Tabela 5 - Média, mediana, erro padrão da média e valores mínimos e máximos dos valores hematológicos de cães com EMC não sobreviventes (NS, n=19) infectados por *E.canis*-São Paulo-2009

Valores	Hemácias (x10⁶/μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (x10³/μL)	Plaquetas (x10³/μL)
Média	3,1	6,8	20,4	3,8	86,0
Mediana	2,5	4,3	22,0	2,5	70,0
Erro padrão da média	1,3	4,6	10,0	4,0	7,0
Valor mínimo	2,2	3,0	5,0	0,2	7,0
Valor máximo	4,6	14,0	42,0	15,3	283,0

As figuras 12, 13, 14, 15 e 16 ilustram as diferenças de mediana entre os 3 grupos, assintomáticos (S), doentes sobreviventes (S) e não sobreviventes (NS), em relação ao número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, e número de leucócitos e plaquetas.

Figura 12 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, $n=12$); B, cães doentes e sobreviventes (S, $n=51$); C, cães não sobreviventes (NS, $n=19$)-São Paulo-2009

Figura 13 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil da concentração de hemoglobina (g/dL) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, $n=12$); B, cães doentes e sobreviventes (S, $n=51$); C, cães não sobreviventes (NS, $n=19$)-São Paulo-2009

Figura 14 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do hematócrito (%) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, $n=12$); B, cães doentes e sobreviventes (S, $n=51$); C, cães não sobreviventes (NS, $n=19$)-São Paulo-2009

Figura 15 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, n=12); B, cães doentes e sobreviventes (S, n=51); C, cães não sobreviventes (NS, n=19)-São Paulo-2009

Figura 16 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães com EMC. A. cães assintomáticos (A, n=12); B, cães doentes e sobreviventes (S, n=51); C, cães não sobreviventes (NS, n=19)-São Paulo-2009

4.5 Avaliação clínica, hematológica e sorológica sequencial dos cães tratados

Dos 28 cães em que se procedeu a avaliação clínica sequencial aos 30, 90 e 180 dias após o tratamento, vinte e seis (93%) apresentaram resolução da infecção, com a eliminação do agente infeccioso, conforme se observou pela PCR, que forneceu resultados negativos em todos os momentos avaliados. Entretanto, dois dos cães (2/28, 7%), apresentaram aumento do título de anticorpos 180 dias após o término do tratamento.

Nas tabelas 6, 7, 8, 9 e 10 são apresentados os valores do número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, número de leucócitos e de plaquetas dos cães que eliminaram totalmente a infecção, observados no momento 0, 30, 90 e 180 dias, assim como a mediana e os valores mínimos, máximo e erro padrão da média.

Tabela 6 - Número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por *Ehrlichia canis*, nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento- São Paulo-2009

Animal	Número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)			
	0	30 dias	90 dias	180 dias
1	5,6	7,0	7,3	8,8
2	7,4	7,2	8,0	6,2
3	6,4	6,8	6,5	6,3
4	7,5	6,8	6,8	7,8
5	6,7	8,3	6,7	6,6
6	5,2	6,3	6,3	6,8
7	7,5	8,1	7,2	7,4
8	6,3	6,2	6,7	5,7
9	6,9	6,9	7,6	6,7
10	7,9	7,3	7,6	7,6
11	2,8	6,1	6,3	7,7
12	5,5	7,0	7,2	8,1
13	3,5	5,2	5,2	5,1
14	5,1	5,5	5,2	5,4
15	4,0	4,8	5,5	5,9
16	7,7	4,7	5,3	5,1
17	5,7	7,4	6,4	9,1
18	5,7	6,9	6,8	6,4
19	2,8	6,8	6,7	7,1
20	5,3	6,1	7,2	5,1
21	7,1	7,3	8,4	8,5
22	3,7	5,3	6,4	6,1
23	2,8	4,1	4,7	6,4
24	5,8	6,6	7,2	6,1
25	5,5	5,7	7,3	6,9
26	4,5	5,9	5,8	6,0
Média	5,4	6,4	6,6	6,7
Mediana	5,6	6,7	6,7	6,5
Erro padrão	0,3	0,2	0,2	0,2
Mínimo	2,8	4,1	4,7	5,1
Máximo	7,9	8,3	8,4	9,1

Tabela 7 - Concentração de hemoglobina (g/dL), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por *Ehrlichia canis*, nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento- São Paulo-2009

Animal	Concentração de hemoglobina (g/dL)			
	0	30 dias	90 dias	180 dias
1	12,8	14,5	14,4	17,3
2	16,9	15,8	16,2	17,1
3	14,5	14,5	13,7	13,0
4	17,0	14,7	14,7	17,9
5	14,4	16,6	14,0	15,2
6	12,6	14,7	13,9	15,3
7	15,2	15,9	15,6	16,6
8	13,8	12,8	13,1	12,3
9	14,9	14,7	15,6	14,4
10	14,6	14,0	16,3	14,7
11	7,2	14,9	14,0	18,4
12	12,6	14,7	16,3	18,8
13	7,5	11,9	14,5	13,0
14	11,5	12,9	13,0	12,4
15	8,3	11,3	12,4	7,3
16	9,0	11,2	12,4	11,5
17	11,7	15,9	13,5	17,2
18	13,2	16,7	15,6	14,4
19	6,8	13,0	12,2	15,2
20	11,7	12,5	13,1	12,2
21	14,2	12,6	13,0	13,2
22	8,0	12,0	13,3	12,5
23	5,2	7,2	7,3	13,6
24	12,5	14,4	15,0	14,0
25	12,0	12,5	12,7	13,1
26	10,5	10,5	11,3	13,9
Média	11,9	13,6	13,7	14,4
Mediana	12,6	14,2	13,8	14,2
Erro padrão	0,6	0,4	0,3	0,5
Mínimo	5,2	7,2	7,3	7,3
Máximo	17,0	16,7	16,3	18,8

Tabela 8 - Hematócrito (%), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por *Ehrlichia canis*, nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento- São Paulo-2009

Animal	Hematócrito (%)			
	0	30 dias	90 dias	180 dias
1	36	43	44	56
2	49	45	48	45
3	40	42	40	41
4	48	45	45	54
5	42	49	44	45
6	38	43	42	49
7	45	48	49	49
8	41	38	39	37
9	45	42	46	45
10	44	45	49	48
11	23	42	40	55
12	39	45	48	56
13	24	35	40	41
14	34	38	42	54
15	24	36	35	37
16	28	30	35	36
17	35	47	41	47
18	38	48	45	47
19	20	44	45	49
20	34	39	42	33
21	43	48	54	55
22	25	39	40	42
23	17	26	30	43
24	38	43	47	41
25	34	37	44	42
26	31	37	42	40
Média	35,2	41,3	42,9	45,7
Mediana	37,0	42,5	43,0	45,0
Erro padrão	1,7	1,1	1,0	1,3
Mínimo	17,0	26,0	30,0	33,0
Máximo	49,0	49,0	54,0	56,0

Tabela 9 - Número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por *Ehrlichia canis*, nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o Tratamento- São Paulo-2009

Animal	Número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			
	0	30 dias	90 dias	180 dias
1	10,7	6,8	6,7	6,7
2	8,7	13,0	10,1	9,9
3	14,0	11,0	8,0	12,0
4	20,2	14,1	14,1	6,0
5	13,5	14,2	8,5	8,0
6	10,6	12,8	9,8	10,5
7	10,6	14,8	18,0	9,6
8	20,4	15,3	20,7	12,6
9	13,3	13,6	17,0	19,1
10	17,7	12,0	6,7	7,4
11	9,9	27,7	15,6	12,2
12	5,3	4,6	5,4	5,6
13	35,7	14,3	11,2	10,2
14	5,1	5,4	7,0	7,4
15	3,9	9,3	8,4	7,6
16	4,7	6,8	10,7	8,1
17	1,6	3,7	1,9	5,1
18	5,5	10,6	8,8	16,5
19	6,2	7,3	8,1	8,4
20	6,4	7,2	9,9	4,7
21	3,5	5,7	6,3	7,2
22	4,9	7,6	8,3	8,8
23	5,1	6,1	7,1	7,2
24	6,0	9,1	10,8	7,3
25	3,8	4,0	4,6	4,1
26	5,6	5,7	5,7	8,3
Média	9,8	10,1	9,6	8,9
Mediana	6,3	9,2	8,5	8,0
Erro padrão	1,5	1,0	0,9	0,7
Mínimo	1,6	3,7	1,9	4,1
Máximo	35,7	27,7	20,7	19,1

Tabela 10 - Número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), média, mediana, erro padrão da média, valores mínimos e máximos dos cães infectados (n=26) por *Ehrlichia canis*, nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após o tratamento-São Paulo-2009

Animal	Número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			
	0	30 dias	90 dias	180 dias
1	209	191	250	191
2	174	170	196	227
3	280	214	229	325
4	191	305	305	320
5	206	207	371	333
6	347	158	189	277
7	134	213	265	303
8	207	215	173	338
9	250	176	209	251
10	153	222	261	272
11	78	374	340	274
12	4,6	193	208	287
13	104	663	510	440
14	101	256	278	315
15	112	515	493	336
16	53	205	231	170
17	40	125	30	46
18	53	253	204	195
19	155	404	248	240
20	95	287	312	327
21	37	537	392	400
22	48	482	412	387
23	64	196	220	149
24	156	204	310	171
25	168	202	191	203
26	118	411	487	620
Média	136	284	281	285
Mediana	126	214	256	282
Erro padrão	16,2	27,0	21,8	21,7
Mínimo	4,6	125	30	46
Máximo	347	663	510	620

Os valores da mediana, 1º e 3º quartil do número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, número de leucócitos e de plaquetas nos diferentes momentos estão apresentados nas figuras 17, 18, 19, 20 e 21.

Figura 17 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos cães infectados por *E.canis* (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009

Figura 18 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil da concentração de hemoglobina (g/dL) dos cães infectados por *E.canis* (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009

Figura 19 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do hematócrito (%) dos cães infectados por *E.canis* (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009

Figura 20 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães infectados por *E.canis* (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009

Figura 21 - Box plot representativo da mediana, primeiro e terceiro quartil do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães infectados por *E.canis* (n=26) nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento-São Paulo-2009

Neste grupo de 26 animais houve um incremento de todas as variáveis estudadas: número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito e número de plaquetas ($p < 0,001$), com exceção do número de leucócitos, em todos os momentos de avaliação a partir de 30, 90 e 180 dias após tratamento.

Os valores hematológicos, bem como o título de anticorpos dos dois cães que apresentaram reinfecção (cães nº 27 e 28), nos momentos 0, 30, 90 e 180 dias estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Variáveis hematimétricas, título de anticorpos anti *E.canis* e resultados da PCR para pesquisa de material genético de *E.canis*-São Paulo-2009

	Cão 1 – nº 27				Cão 2 – nº 28			
	0	30	90	180	0	30	90	180
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,5	7,4	7,7	7,2	5,2	5,8	6,2	5,2
Hemoglobina (g/dL)	14,6	16,0	15,6	15,3	10,1	14,0	14,3	11,2
Hematócrito (%)	43,0	47,0	47,0	49,0	32,0	37,0	35,0	35,0
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5,6	9,5	11,7	8,9	5,5	7,3	6,9	8,1
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	276,0	238,0	224,0	273,0	258,0	280,8	202,0	79,0
Título de anticorpos	2.560	640	<80	2.560	20.480	<80	640	40.960
PCR	+	-	-	+	+	-	-	+

O perfil médio do número de hemácias dos cães que eliminaram a infecção, no decorrer do período de observação, e os valores dos cães números 27 e 28 que se reinfectaram estão apresentados na figura 22.

Figura 22 - Gráfico do perfil médio do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos cães que eliminaram a infecção (●) e o número de hemácias dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009

O mesmo padrão de variação foi observado em relação à concentração de hemoglobina e nos valores do hematócrito, como se observa nas figuras 23 e 24.

Figura 23 - Gráfico do perfil médio da concentração de hemoglobina (g/dL) dos cães que eliminaram a infecção (●) e a concentração de hemoglobina dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009

Figura 24 - Gráfico do perfil médio do hematócrito (%) dos cães que eliminaram a infecção (●) e o hematócrito dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009

Na figura 25 encontra-se a representação gráfica das medianas dos leucócitos dos cães de 1 a 26, comparando-se com os valores individuais dos cães números 27 e 28.

Figura 25 - Gráfico do perfil médio do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães que eliminaram a infecção (○) e o número de leucócitos dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009

Na figura 26 encontra-se apresentada a representação gráfica da mediana e dos valores individuais de plaquetas dos cães de números 27 e 28, nos mesmos momentos.

Figura 26. Gráfico do perfil médio do número de plaquetas ($/\mu\text{L}$) dos cães que eliminaram a infecção (○) e o número de plaquetas dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009

O perfil médio do título de anticorpos de todos os 28 animais, ao longo de todos os momentos de avaliação (A), e o perfil comparativo com os cães número 27 e 28 (B) estão apresentados na figura 27.

Figura 27 - (A). Gráfico do perfil médio do título de anticorpos dos cães que eliminaram a infecção (○). (B) Título de anticorpos dos cães de número 27 (▲) e 28 (■) ao longo dos momentos de avaliação-São Paulo-2009

Na tabela 12 estão apresentados os valores individuais do título de anticorpos dos 28 animais em que foi feito acompanhamento sorológico nos períodos 0, 30, 90 e 180 dias após tratamento.

Tabela 12 - Título de anticorpos de animais PCR (+) para *E.canis* no momento da apresentação clínica (tempo 0), 30, 90 e 180 dias após o início do tratamento-São Paulo-2009

Animal	0	30 dias	90 dias	180 dias
1	81.920	5.120	5.120	10.240
2	10.240	20.480	10.240	640
3	10.240	2.560	640	<80
4	<80	5.120	5.120	2.560
5	81.920	20.480	2.560	2.560
6	20.480	2.560	1.280	2.560
7	5.120	<80	1.280	1.280
8	80	<80	1.280	1.280
9	<80	80	5.120	640
10	10.240	10.240	5.120	2.560
11	<80	<80	<80	<80
12	<80	10.240	10.240	<80
13	10.240	40.960	10.240	10.240
14	40.960	10.240	640	<80
15	81.920	81.920	10.240	10.240
16	81.920	10.240	2.560	2.560
17	10.240	1.280	640	640
18	2.560	1.280	320	<80
19	10.240	2.560	640	320
20	40.960	10.240	<80	81.920
21	2.560	2.560	<80	<80
22	40.960	2.560	640	<80
23	81.920	81.920	5.120	40.960
24	5.120	5.120	640	10.240
25	40.960	40.960	40.960	2.560
26	5.120	1.280	1.280	1.280
27	2.560	640	<80	2.560
28	20.480	<80	640	40.960

Houve diferença significativa ($p<0,001$) na comparação do título de anticorpos entre os grupos dos animais assintomáticos com os doentes e também dos assintomáticos com os não sobreviventes. Não houve diferença significativa entre os animais doentes e os doentes que não sobreviveram ($p=0,644$).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo não foi observada predisposição sexual em relação à infecção por *E.canis*, o que corrobora com dados de literatura (NEER, 2006; HARRUS et al., 1997). Contrariando dados de estudo em Israel (HARRUS et al., 1997), a faixa etária mais elevada (acima de oito anos, em média) dos animais infectados por *E. canis* neste trabalho pode ser explicada pelo fato de que a maioria dos cães incluídos no estudo não apresentava manifestações clínicas da fase aguda (sintomas como convulsões, oftalmopatias, dores articulares, vasculite, polidipsia, poliúria) citadas na literatura (MACHADO, 2004; NEER, 2006; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999) indicando tratar-se de casos de infecção crônica. Na EMC, a infecção pode persistir por um longo período de tempo, com os cães infectados permanecendo sem alterações clínicas durante um prolongado período, considerado a fase assintomática da doença, ou manifestar sintomas vagos de comprometimento sistêmico, como perda de peso, hiporexia, e alterações hematológicas discretas. Nesses casos, é impossível prever o momento em que ocorreu a infecção do animal. O diagnóstico clínico é estabelecido mais tardiamente, na fase crônica.

Não há aparente predisposição racial em cães infectados pela EMC, no entanto cães da raça Pastor Alemão são considerados mais suscetíveis à infecção, e Beagles e os cães sem raça definida, mais resistentes. (HARRUS et al., 1997; NYINDO et al., 1980). Pode-se justificar, neste trabalho, a maior frequência de animais sem raça definida, Poodles e Rottweilers devido à maior prevalência dessas raças no atendimento da rotina clínica, assim como a inclusão de cães do canil do Centro Tecnológico da Marinha, dos quais a grande maioria era da raça Rottweiler.

Manifestações clínicas inespecíficas como palidez de mucosas, hiporexia a anorexia, apatia, letargia e gastroenterite, frequentemente relacionadas a EMC (NEER et al., 2002; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999) na fase crônica da infecção foram observadas em todos os animais, com exceção daqueles que eram contactantes e estavam infectados, porém não apresentavam manifestações clínicas de qualquer natureza. A palidez de mucosas pode ser explicada pela anemia secundária aos sangramentos espontâneos que podem ocorrer devido trombocitopenia (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; HARRUS et al., 1997) e tromboastenia (HARRUS et al., 1996c) mas também devido à anorexia, anemia de doença crônica (WANER; HARRUS, 2000) e supressão da atividade eritropoiética pela IL-1 e TNF- α (HUXSOLL et al., 1970; WANER; HARRUS, 2000). Os sintomas inespecíficos como

hiporexia, apatia e letargia são os mais comumente encontrados na fase aguda como também na fase crônica da doença (COHN, 2003; HARRUS; BARK; WANER, 1997; NEER, 2006) na dependência da cepa infectante (NEER, 2006).

Diáteses hemorrágicas ocorrem em consequência da vasculite (HARRUS et al., 1996c) e distúrbios na hemostasia primária (HARRUS et al., 1996b), e constituem-se em indicadores de mau prognóstico (SHIPOV et al., 2008; HARRUS et al., 1997). Entre os cães que apresentaram evolução fatal, 3 cães haviam apresentado trombocitopenia e alterações da hemostasia (15,7 %) enquanto no grupo dos sobreviventes apenas 2 de 51 cães, ou 3,9% dos casos, apresentaram essas mesmas alterações, ou seja, o grupo de animais que veio a óbito apresentou maior frequência de hemorragias em relação ao grupos dos doentes e sobreviventes.

Sintomas oculares podem estar presentes em todas as fases da EMC, e envolvem quase todas as estruturas do olho (MARTIN, 1999; ORÍÁ; PEREIRA; LAUS, 2004; LEIVA; NARANJO; PEÑA, 2005; HARRUS et al., 1998a). Neste estudo as oftalmopatias foram observadas em 10% dos casos, à semelhança dos dados citados na literatura, de 10 a 15% (MARTIN, 1999).

Distúrbios neurológicos, no caso as convulsões, podem ser atribuídos a infiltrados de células inflamatórias ou de plasmócitos nas meninges, respectivamente nas fases aguda ou crônica, como também a hemorragia do parênquima cerebral ou cordão espinal (WOODY; HOSKINS, 1991), em casos de trombocitopenia intensa. Essa manifestação clínica foi observada apenas em um reduzido número de cães.

A alta frequência de trombocitopenia e anemia, embora de discreta a moderada intensidade observada neste estudo assemelhou-se a dados relatados por outros pesquisadores (HARRUS; BARK; WANER, 1997; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; NEER, 2006). A trombocitopenia se dá pela inflamação do endotélio vascular com o resultante consumo de plaquetas (HARRUS et al., 1999), destruição imunomediada das plaquetas ou sequestro esplênico (SMITH et al., 1975; HARRUS et al., 1996b), interferência na adesividade e migração plaquetária secundária à hipergamaglobulinemia (PERRILE; MATUS, 1991), ou ainda pela presença, no soro sanguíneo de animais agudamente infectados, de fatores que inibem a agregação plaquetária (HARRUS et al., 1996c). A anemia e a trombocitopenia podem ser observadas tanto na fase aguda quanto na crônica da infecção por *E. canis*, e quando presentes em cães com sintomas clínicos vagos como perda de peso, hiporexia, menor disposição física, alterações oftálmicas ou neurológicas, esplenomegalia, sugerem a necessidade da realização de testes específicos para o diagnóstico da EMC.

O estágio terminal da EMC, principalmente da fase crônica, é considerado a pancitopenia, incompatível com a vida do animal (MYLONAKIS et al., 2004; AROCH; HARRUS, 2001). Embora a leucopenia seja observada frequentemente nos estágios terminais da infecção, raramente é citada na fase aguda da infecção (HASEGAWA, 2005) ou considerada alteração hematológica relevante para o diagnóstico clínico de erliquiose. Grande parcela dos cães incluídos neste trabalho apresentou leucopenia ou valores de leucócitos situados no limite inferior do intervalo de referência utilizado, como também havia sido observado por Harrus et al (1999).

Shipov et al., (2008) relacionaram mau prognóstico na EMC para animais que apresentam grave leucopenia (leucócitos totais $<0,93 \times 10^3 / \mu\text{L}$) ou anemia (hematócrito $<11,5\%$) ou pancitopenia acentuada (leucócitos totais $<4,0 \times 10^3 / \mu\text{L}$, hematócrito $<25\%$, plaquetas $<50 \times 10^3 / \mu\text{L}$), alterações hematológicas frequentemente encontradas na fase crônica da doença (HARRUS; BARK; WANER, 1997; WANER, 2008). A leucopenia e anemia constituíram-se em fatores relevantes para o prognóstico quando se realizou a comparação dos valores hematológicos observados entre os animais sobreviventes e não sobreviventes. Em relação a trombocitopenia, que na maioria dos cães foi apenas de discreta intensidade, quando associada a bicitopenia ou pancitopenia, constitui-se em importante fator prognóstico da doença. A pancitopenia, observada de forma mais acentuada e em maior frequência no grupo dos que apresentaram evolução fatal, ainda pode sugerir que se tratava de cães que estavam na fase crônica da doença, visto que esta é considerada a alteração hematológica típica desta fase (MYLONAKIS et al., 2004; SHIPOV et al., 2008).

Os altos títulos de anticorpos encontrados neste trabalho não são citados na literatura, em que são referidos títulos máximos entre 2.560 (BARTSCH; GREENE, 1996), 5.120 (AGUIRRE et al., 2008), chegando no máximo em 20.480 (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999). A média do título de todos os animais infectados (26.400) foi superior ao valor máximo descrito por outros autores. Diversidade de cepas e de protocolos da reação de IFI ou critérios para o ponto final da reação (BARTSCH; GREENE, 1996) podem influir no título final. A grande maioria dos cães infectados por *E. canis* apresentava títulos altos de anticorpos, sugerindo a possibilidade de inferir que os títulos maiores ou iguais a 2.560 são altamente sugestivos de infecção atual ou persistente, se o animal não tiver sido previamente tratado. Altos títulos de anticorpos podem estar relacionados a cronicidade da doença e tipo de resposta aberrante ao antígeno (WANER et al., 2001), e são originados pelo estímulo antigênico prolongado causado pela infecção persistente, resultando na produção de imunoglobulinas pelos plasmócitos (PERRILE; MATUS, 1991). Contudo, é importante

também se considerar a possibilidade de que em alguns animais infectados mais recentemente, pode não ter havido tempo hábil para soroconversão, e portanto esses cães podem apresentar resultado negativo a RIFI (WANER et al., 1996; WANER et al., 2001; NEER et al., 2002). Neste caso, o diagnóstico deve ser baseado na associação das alterações hematológicas com os resultados da PCR (WEN et al., 1997; MYLONAKIS et al., 2009). Testes sorológicos pareados podem indicar a soroconversão ou a ascensão dos títulos (HARRUS et al., 2002; NEER et al., 2002).

A soroconversão ou a ascensão dos títulos de anticorpos anti *E.canis* é considerada indicativa de infecção presente (PERRILE; MATUS, 1991), assim como a queda do título de anticorpos em animais tratados é indicativa de eliminação da infecção (WANER et al., 2001; PERRILE; MATUS, 1991; IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA, 1994; HARRUS et al., 1998). Sabe-se ainda que o tempo para o declínio dos níveis de anticorpos é diretamente proporcional ao título de anticorpos inicial (BARTSCH; GREENE, 1996; NEER et al., 2002). Neste estudo os cães números 7 e 8 apresentaram, 90 dias após o tratamento, abrupta e acentuada elevação do título de anticorpos de até 5 vezes em relação ao período de monitoramento anterior, a despeito de resultados negativos no teste molecular. Segundo Harrus et al., (2004), a detecção de material genético da *E.canis*, realizada a partir de amostras de sangue periférico, é inferior em relação à pesquisa da bactéria no baço e medula óssea. Isso pode levar a resultados enganosos em casos de infecções crônicas nas quais a PCR de amostra de sangue periférico revela-se negativa (COHN, 2003). Também não pode ser descartado resultado falso negativo devido erro inerente da técnica. Por outro lado, como o “padrão ouro” para se determinar a eliminação da infecção por *E.canis* nos cães ainda não foi estabelecido, o DNA erliquial detectado a partir de aspirados esplênicos pode persistir de microrganismos mortos, não representando propriamente infecção ativa (BARSTCH; GREENE, 1996; NEER et al., 2002). E ainda, confrontando-se os valores hematológicos com os sorológicos dos mesmos animais, a única alteração hematológica observada durante todo o período após o tratamento foi discreta trombocitopenia aos 90 dias, no caso do animal número 8. Além disso, como o número de plaquetas retornou para os valores de referência aos 180 dias após tratamento, o cão não apresentou mais nenhum sintoma clínico da doença, e a PCR manteve-se negativa durante todo o período de avaliação, é mais provável que tenha ocorrido eliminação da infecção mesmo com a permanência de título de anticorpos positivo (WEN et al., 1997; NEER et al., 2002).

No caso dos cães números 20 e 24, houve um aumento repentino e muito acentuado (maior que 10 vezes) do título no período de 180 dias após o tratamento, apesar do resultado

negativo na PCR para pesquisa de material genético para *E.canis*. A associação com alterações hematológicas como leucopenia e anemia (cão número 20), e trombocitopenia (cão número 24) no mesmo momento de avaliação sugere resultados de PCR falsamente negativos nestes casos.

A infecção por *E.canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998b; WANER et al., 2001; COHN, 2003). Caso interessante refere-se ao cão número 11, o qual nunca apresentou soroconversão. Provavelmente a primeira PCR pode ter sido mais um resultado falso positivo, apesar da anemia e trombocitopenia presentes no momento da apresentação clínica.

Cães podem se reinfetar por *E.canis* após tratamento prévio e efetivo contra a EMC, e a recuperação não confere imunidade permanente (BARTSCH; GREENE, 1996; BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998). Neste estudo os animais números 27 e 28 apresentaram aumento súbito do título de anticorpos nos momentos 180 e 90 dias, respectivamente, porém mostraram-se novamente positivos a PCR aos 180 dias após tratamento, fato que confirma a reinfecção (BARTSCH; GREENE, 1996; WANER et al., 2001). Em ambientes com grande infestação por carrapatos, a reinfecção pode ser provável.

A persistência de títulos de anticorpos positivos para *E.canis* pode indicar infecção não debelada, reinfecção, ou simplesmente pode ser indicativa de infecção passada (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; WANER et al., 2001). Neste trabalho não foi possível afirmar que altos títulos de anticorpos isolados são indicadores da persistência da infecção, pois mesmo ao final do estudo havia animais que ainda apresentavam altos títulos em decorrência da queda gradual do nível de anticorpos no momento inicial da apresentação clínica.

A presença de sintomas clínicos e alterações hematológicas associados a resultados positivos de RIFI (WANER et al., 2001) e PCR (NEER et al., 2002) constitui-se no padrão diagnóstico mais fidedigno para o estabelecimento da EMC.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente estudo concluiu-se que:

- Anemia, leucopenia e trombocitopenia podem ser observadas isoladamente ou associadas em cães doentes, infectados por *E. canis*, como também podem estar ausentes nos cães com infecção inaparente.
- A infecção dos cães por *E. canis* pode ser inaparente e nesses casos, somente os testes moleculares (PCR) e altos títulos de anticorpos permitem estabelecer o diagnóstico da infecção.
- Alterações hematológicas mais intensas estão associadas ao prognóstico negativo da doença
- A recidiva das alterações hematológicas e o aumento do título de anticorpos em animais tratados podem ser indicativos de reinfecção ou de reagudização da infecção.
- A reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui-se em ferramenta essencial para o diagnóstico etiológico da infecção dos cães por *E. canis*, podendo, no entanto, apresentar resultados positivos ou negativos falsos.
- O diagnóstico da infecção dos cães por *E. canis* deve ser baseado nos aspectos clínicos sugestivos da doença, alterações hematológicas (anemia, leucopenia e ou trombocitopenia), título de anticorpos anti- *Ehrlichia canis*, e confirmado pela presença de material genético do organismo no sangue circulante.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. S.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural Santa Maria**, v. 37, n. 3, p.796-802, 2007.
- AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Comparison between Different Polymerase Chain Reaction Methods for the Diagnosis of *Ehrlichia canis* Infection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 118-120, 2008.
- AROCH, I.; HARRUS, S. The use of recombinant human granulocyte colony stimulating factor and recombinant human erythropoietin in the treatment of severe pancytopenia due to canine monocytic ehrlichiosis. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 56, n. 2, p. 65-69, 2001.
- BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 321-325, 2009.
- 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.
- BELANGER, M.; SORENSON, H. L.; FRANCE, M. K.; BOWIE, M. V.; BARBET, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; ALLEMAN, A. R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.9, p. 3506-3508, 2002.
- 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 and chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 362-368, 1998.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO JR, J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146, 2004.
- CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A.; ZHOU, R.; MASON, P. R. Comparison of the dot blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Record**, v. 135, p. 362, 1994.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic canine ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-76, 2004.

CODNER, E. C.; LINDA, L. F-S. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 1, p. 47-50, 1986.

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

COSTA, J. D.; SILVA, M.; BATISTA JR, J. A.; GUIMARÃES, M. P. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**, v. 25, p.199-200, 1973.

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

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, R. Existence en Algérie d'une rickettsia du chien. **Bulletin Societe Pathologie Exototique**, v. 28, p. 418-419, 1935.

DUMLER, J. S.; BERKET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonymus of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 2145-2164, 2001.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. Retrospective study of Ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 194-201, 1999.

HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 66, p. 241-249, 1996a.

HARRUS, S.; WANER, T.; DOUGLAS, J. WEISS.; KEYSARY, A.; BARK, H. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, p. 13-20, 1996b.

HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A.; ZWANG, E.; BARK, H. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Record**, v. 139, p. 290-293, 1996c.

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

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E.; WANER, T. 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.; OFRI, R.; AIZENBERG, I.; WANER, T. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 78, n. 2, p. 155-160, 1998a.

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

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 361-368, 2002.

HARRUS, S.; 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. 55, p. 1-5, 2010.

HASEGAWA, H.Y. Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular. 2005. 134 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**, v. 16, n. 3, p. 13-21, 1991.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALKER, J. S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001.

LEIVA, M.; NARANJO, C.; PEÑA, M. T. Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 6, p. 387-393, 2005.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004.

MARTIN, C. L. Ocular manifestations of systemic disease. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. cap. 37, p. 1408-1409.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R.; GAUNT, D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 441-447, 1996.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C. D.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V. S.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v. 91, p.197-204, 2003.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. V.; BILLINIS, C. D.; LEONITIDES, L. S.; KONTOS, V. S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal of American Animal Hospital Association**, 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.

NEER, M. T.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. Consensus statement on ehrlichial disease os small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 309-315, 2002.

NEER, T. M. Ehrlichiosis: Canine monocytic and granulocytic ehrlichioses. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006, p. 139-147.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, C. A.; STEPHENSON, E. H. Cell- mediated and humoral responses of German Shepherd dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 250-254, 1980.

O'CONNOR, T. P.; HANSCOM, J. L.; HEGARTY, B. C.; GROAT, R. G. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 206-210, 2006.

ORIÁ, A. P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J. L. Uveitis in dogs with *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1289-1295, 2004.

PELEG, O.; BANETH, G.; EVAL, O.; INBAR, J.; HARRUS, S. Use of Chimeric DNA-RNA primers in quantitative PCR for detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6393-6398, 2009.

PERILLE, 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.

RUNGSIPAT, A.; ODA, M.; KUMPOOSIRI, N.; WANGNAITHAM, S.; POOSONTHONTHAM, R.; KOMKAEW, W.; SUKSAWAT, F.; RYOJI, Y. Clinicopathological study of experimentally induced canine monocytic ehrlichiosis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 18, p. 13-22, 2009.

SAINZ, A. M. A.; TESOURO, I.; AMUSATEGUI, F.; RODRIGUEZ, F.; MAZZACHELLI, F.; RODRIGUEZ, M. Prospective comparative study of the treatment protocols using Doxycycline or Imidocarb Dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 134-139, 2000.

SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER, L.; WANER, T.; HARRUS, S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 131-138, 2008.

SMITH, R. D.; MIODRAG, R.; HUXSOLL, D. L.; BAYLOR, R. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 6, p. 1216-1221, 1975.

WANER, T. Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 63. n. 1, p. 683-686, 2008

WANER, T.; HARRUS, S. Anemia of inflammatory disease. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Scham's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Pippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 205-209.

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

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. 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**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

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.

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, p. 75-98, 1991.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Quadro 1- Resenha clínica dos cães (n=82) infectados por *E.canis*. Sexo, raça, idade, título de anticorpos, número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e plaquetas ($\times 10^6/\mu\text{L}$), e resumo da história clínica e evolução, FMVZ/USP-São Paulo-2009

Animal	Prontuário	Sexo	Raça	Idade (anos)	RIFI (título)	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Clínica	Evolução
1	Aysha	F	Rottweiler	5,0	81.920	5,6	12,8	36,1	10,7	209	II	R
2	General	M	Rottweiler	5,0	10.240	7,4	16,9	49,1	8,7	174	II	R
3	Infante	M	Rottweiler	5,0	10.240	6,4	14,5	40	14,6	280	II	R
4	Jully	F	Rottweiler	5,0	<80	7,6	17,0	48,9	20,2	191	II	R
5	Milena	F	Rottweiler	5,0	81.920	6,7	14,4	42,5	13,5	206	II	R
6	Nero	M	Rottweiler	5,0	20.480	5,2	12,6	38,8	10,6	347	II	R
7	Pantaneiro	M	Rottweiler	5,0	5.120	7,6	15,2	45,6	10,6	134	II	R
8	Posseidon	M	Rottweiler	5,0	80	6,3	13,8	41	20,4	207	II	R
9	Quinto	M	Rottweiler	5,0	<80	6,9	14,9	45,2	13,3	250	II	R
10	Zeus	M	Rottweiler	5,0	<80	7,9	14,6	44,6	17,7	153	II	R
11	190999	M	Schnauzer	2,4	<80	2,8	7,2	23	9,9	26	DS	R
12	173599	M	Dachshund	11,6	<80	5,5	12,6	39	5,3	108	DS	R
13	186273	F	Pinscher	4,6	10.240	3,5	7,5	24	35,7	50	DS	R
14	168416	F	SRD	11,9	40.960	5,1	11,5	34	5,1	151	DS	R
15	189818	F	SRD	10,8	81.920	4,0	8,3	24	3,9	99	DS	R
16	178227	M	Poodle	10,3	81.920	3,7	9,0	28	4,7	38	DS	R
17	Pedrita	F	Poodle	10,0	10.240	5,7	11,7	35	1,6	26	DS	R
18	191862	M	Basset Hound	9,4	2.560	5,2	10,1	32	5,5	146	DS	R
19	191888	F	SRD	9,1	10.240	5,7	13,2	38	5,5	75	DS	R
20	198616	M	SRD	11,8	40.960	2,8	6,8	20	6,2	29	DS	R
21	183689	F	SRD	8,7	2.560	7,1	14,2	43	3,5	37	DS	R
22	198736	F	Poodle	8,8	40.960	3,7	8,0	25	4,9	48	DS	R
23	200039	M	SRD	14,0	81.920	2,8	5,2	17	5,1	64	DS	R
24	198130	M	Lhasa Apso	11,8	5.120	5,8	12,5	38	6,0	156	DS	R
25	198944	M	Boxer	5,9	40.960	5,5	12,0	34	3,8	168	DS	R
26	168744	M	Boxer	5,9	5.120	4,5	10,5	31	5,6	7	DS	R
27	Brenda	F	Rottweiler	5,0	2.560	6,6	14,6	43,4	5,6	276	II	R

Animal	Prontuário	Sexo	Raça	Idade (anos)	RIFI (título)	Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hemaócritro (%)	Leucócitos (x10 ³ /μL)	Plaquetas (x10 ³ /μL)	Clínica	Evolução
28	191252	M	Cocker Spaniel	11,9	20.480	5,2	10,1	32	5,5	146	DS	R
29	Dakota	F	Pastor Mallinois	5,0	5.120	6,2	13,5	38,4	10,1	224	II	R
30	147900	F	Terrier Brasileiro	5,3	2.560	7,8	17,0	52	5,6	132	DS	R
31	150903	F	Schnauzer	11,5	81.920	4,9	9,3	29	27,7	283	DS	R
32	190156	F	Poodle	14,4	81.920	5,3	11,8	35	6,5	70	DS	R
33	162718	F	SRD	7,8	81.920	5,2	11,8	35	7,6	112	DS	R
34	196421	M	Labrador	5,6	81.920	4,7	10,8	30	6,1	18	DS	R
38	119496	M	Labrador	11,1	40.960	5,5	12,5	38	5,8	209	DS	R
39	197423	M	Poodle	6,0	81.920	2,8	8,1	27	11,9	98	DS	R
40	197970	F	Poodle	5,9	40.960	4,4	9,9	29	4,6	14	DS	R
41	137647	M	Cocker Spaniel	11,1	81.920	2,1	5,5	16	5,8	37	DS	R
42	198610	M	SRD	6,1	10.240	4,5	1,1	33	12,4	37	DS	R
43	198425	M	SRD	10,4	5.120	4,1	8,6	27	10,2	19	DS	R
44	199319	M	Daschund	4,6	2.560	4,3	9,0	29	21,3	624	DS	R
45	199722	M	Labrador	5,3	2.560	4,9	10,1	31	8,2	15	DS	R
46	Tobias	M	SRD	5,0	10.240	5,5	11,1	37	18,4	304	DS	R
47	199929	F	Fila Brasileiro	4,1	2.560	3,5	7,2	22	6,8	46	DS	R
48	200020	F	Pit Bull Terrier	6,8	40.960	5,7	11,4	38	22,8	108	DS	R
49	199914	M	Scottish Terrier	12,0	20.480	5,5	13,0	39	5,8	170	DS	R
50	200350	F	Cocker Spaniel	11,5	10.240	3,9	7,6	25	7,8	36	DS	R
51	200633	F	Poodle	4,0	10.240	2,8	6,7	21	0,8	49	DS	R
52	200593	F	O.E. Sheepdog	2,8	2.560	5,2	12,5	36	6,0	49	DS	R
53	200548	F	SRD	0,8	20.480	1,2	2,7	8	4,9	38	DS	R
54	200780	F	Chow Chow	5,0	10.240	4,6	10,2	28	4,7	64	DS	R
55	200695	M	Chow Chow	0,9	10.240	1,4	2,8	10	0,4	14	DS	R
56	201062	M	Bull Terrier	5,3	81.920	4,1	9,8	29	7,8	49	DS	R
57	192558	M	SRD	9,8	10.240	5,8	12,6	37	5,1	24	DS	R
58	201092	M	Labrador	7,0	10.240	3,1	7,1	22	0,6	5	DS	R
59	202164	F	Akita	6,9	40.960	3,6	6,2	18	6,1	75	DS	R
60	168634	F	Cocker Spaniel	1,4	2.560	3,0	6,6	19	19,9	83	DS	R
61	114205	F	SRD	2,8	10.240	2,7	6,9	14	44,1	117	DS	R
62	94156	F	Akita	1,9	10.240	3,6	6,8	20	4,1	31	DS	R
63	190316	M	Poodle	10,6	10.240	6,1	14,0	14	5,6	180	DS	O
64	194637	M	Boxer	8,1	5.120	4,6	11,0	30	6,1	132	DS	O

Animal	Prontuário	Sexo	Raça	Idade (anos)	RIFI (título)	Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (x10 ³ /μL)	Plaquetas (x10 ³ /μL)	Clínica	Evolução
65	196565	F	SRD	7,8	81.920	2,2	4,4	24	5,7	26	DS	O
66	194206	F	Rottweiler	8,1	20.480	2,5	4,3	14	2,5	108	DS	O
67	197819	M	SRD	2,7	40.960	3,3	7,2	20	0,5	50	DS	O
68	197866	M	SRD	8,0	5.120	1,5	3,0	9	15,3	151	DS	O
69	183968	F	Cocker Spaniel	7,9	10.240	3,4	7,3	22	3,5	99	DS	O
70	187721	M	Poodle	9,8	20.480	4,6	11,2	32	0,5	283	DS	O
71	187990	F	SRD	5,9	40.960	3,4	7,6	24	5,4	38	DS	O
72	189829	M	Poodle	10,6	20.480	1,7	4,3	13	0,9	26	DS	O
73	190990	M	SRD	9,7	40.960	4,6	10,4	30	7,4	146	DS	O
74	192074	M	Labrador	6,0	20.480	1,2	2,3	8	0,8	75	DS	O
75	192161	M	SRD	3,0	40.960	1,6	3,4	13	0,5	29	DS	O
76	199856	M	Poodle	8,0	20.480	0,6	2,2	5	0,2	70	DS	O
77	200138	F	Pinscher	10,0	5.120	1,8	4,0	11	0,3	7	DS	O
78	200502	M	Basset Hound	10,0	81.920	4,0	8,4	26	10,6	112	DS	O
79	199658	F	Pastor Alemão	3,9	10.240	4,1	9,1	28	3,5	18	DS	O
80	201785	F	SRD	10,8	10.240	4,2	10,7	26	1,5	35	DS	O
81	202559	F	SRD	2,0	2.560	1,2	3,3	10	0,6	50	DS	O
82	188469	M	SRD	12,7	0	5,4	13,4	38	12,3	180	DS	O

Legenda: II- infecção inaparente; DS- doente sintomático; R- recuperação; O- óbito

APÊNDICE B. Quadro 2 - Resenha clínica dos cães (n=28) infectados por *E.canis*, tratados com dipropionato de imidocarb (5mg/kg/SC, total de 2 aplicações com intervalo quinzenal) e de doxiciclina (5 mg/kg/BID, por 30 dias), que foram acompanhados durante 180 dias, FMVZ/USP-São Paulo-2009

Animal	Raça	Sexo	Idade (anos)	Manifestação clínica
1	Rottweiler	F	5	Assintomático – histórico de ixodidiose
2	Rottweiler	M	6	Assintomático – histórico de ixodidiose
3	Rottweiler	M	5	Assintomático – histórico de ixodidiose
4	Rottweiler	F	5	Assintomático – histórico de ixodidiose
5	Rottweiler	F	7	Assintomático – histórico de ixodidiose
6	Rottweiler	M	6	Assintomático – histórico de ixodidiose
7	Rottweiler	M	5,5	Assintomático – histórico de ixodidiose
8	Rottweiler	M	6,5	Assintomático – histórico de ixodidiose
9	Rottweiler	M	7	Assintomático – histórico de ixodidiose
10	Rottweiler	M	6	Assintomático – histórico de ixodidiose
11	Schnauzer	M	3	Anorexia e apatia
12	Dachshund	M	11	Alteração hematológica
13	Pinscher	F	5	Hiporexia, êmese, convulsão
14	SRD	F	12	Alteração hematológica
15	SRD	F	10	Alteração hematológica
16	Poodle	M	10	Hiporexia e diarreia
17	Poodle	F	10	Hiporexia e apatia
18	Basset Hound	M	10	Hiporexia e apatia
19	SRD	F	9	Emagrecimento progressivo e anorexia
20	SRD	M	12	Convulsão
21	SRD	F	9	Apatia, letargia e hiporexia
22	Poodle	F	9	Febre, apatia, fezes amolecidas
23	SRD	M	14	Emagrecimento progressivo
24	Lhasa Apso	M	12	Alteração hematológica
25	Boxer	M	6	Glaucoma
26	Pinscher	M	15	Alteração hematológica
27	Rottweiler	F	5	Assintomático – histórico de ixodidiose
28	Cocker Spaniel	M	12	Hiporexia e apatia