LEONARDO PINTO BRANDÃO

**ENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL NO
DESENVOLVIMENTO DA ANEMIA E DAS ALTERAÇÕES
QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS DAS PLAQUETAS NA
ERLIQUIOSE CANINA EXPERIMENTAL**

**SÃO PAULO
2005**

LEONARDO PINTO BRANDÃO

**ENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL NO
DESENVOLVIMENTO DA ANEMIA E DAS ALTERAÇÕES
QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS DAS PLAQUETAS NA
ERLIQUIOSE CANINA EXPERIMENTAL**

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Prof^a. D^{ra}. Mitika Kuribayashi Hagiwara

São Paulo
2005

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

confiável
Claudia
24/06/2005
Maria Claudia Pestana
Supervisora Técnica
Biblioteca Virgíne Buff D'Aquila
FMVZ-USP
CRB 816233 - NF 2470405

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1542
FMVZ

Brandão, Leonardo Pinto

Envolvimento da resposta imune humoral no desenvolvimento da anemia e das alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas na Eriquiose canina experimental / Leonardo Pinto Brandão. – São Paulo : L. P. Brandão, 2005.
76 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2005.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara.

1. *Ehrlichia canis*. 2. Hematologia animal. 3. Bioquímica clínica. 4. Plaquetas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção de anticorpos antiplaquetários e antimegacariocíticos e atividade de agregação plaquetária na infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935)", Protocolo nº 10/2001, sob a responsabilidade da Profª Drª Mitika Kuribayashi Hagiwara, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 30/01/2002.

(We certify that the Research "Antiplatelet and antimegakaryocytic antibodies detection and platelet aggregation activity in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935)" protocol number 10/2001, under the responsibility of Profª Drª Mitika Kuribayashi Hagiwara, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 01/30/2002 meeting.)

São Paulo, 30 de janeiro de 2002

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRANDÃO, Leonardo Pinto

Título: Envolvimento da resposta imune humoral no desenvolvimento da anemia e das alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas na erliquiose canina experimental

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“... Ele dorme dentro da minha alma

E às vezes acorda de noite

E brinca com os meus sonhos.

Vira uns de pernas para o ar,

Põe uns em cima dos outros

E bate as palmas sozinho

Sorrindo para o meu sono.

Quando eu morrer, filhinho,

Seja eu a criança, o mais pequeno.

Pega-me tu ao colo

E leva-me para dentro da tua casa.

Despe o meu ser cansado e humano

E deita-me na tua cama.

E conta-me histórias, caso eu acorde,

Para eu tornar a adormecer.

E dá-me sonhos teus para eu brincar

Até que nasça qualquer dia

Que tu sabes qual é.”

Alberto Caeiro (Fernando Pessoa)

Para meu pai,

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, por mostrar-me o caminho e as ferramentas para chegar ao meu objetivo. Obrigado por seus ensinamentos e visão crítica. Sou lhe eternamente grato.

À minha família, mães, pai e irmãos. Sem vocês minha jornada seria impossível.

Aos meus amigos. Vocês são a extensão da minha vida e uma das provas mais belas da existência de Deus.

À Prof^{ra}. D^{ra}. Aguemi Kohayagawa, pelo apoio, ensinamentos e orientação.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Sílvia Berlanga de Moraes Barros e Lígia Ferreira Gomes do Laboratório de Patologia do Depto. de análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos queridos mestres que me ensinaram o ofício da Medicina Veterinária, em especial à amiga Márcia Mery Kogika, Sílvia Regina Ricci Lucas, Maria Helena Larsson, Carlos Eduardo Larsson e Ricardo Coutinho do Amaral.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

À pós-graduanda Márcia Yumiko Hasegawa por auxiliar-me durante o desenvolvimento do experimento.

Aos amigos da Merial Saúde Animal, recente acolhida nesta nova fase da minha vida.

*À presença de Deus em minha vida, mantendo-me de olhos atentos e alma sempre leve
para perceber sua presença em todas as coisas.*

RESUMO

BRANDÃO, L. P. **Envolvimento da resposta imune humoral no desenvolvimento da anemia e das alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas na erliquiose canina experimental.** [Involvement of humoral immune response on development of anemia and quantitative and qualitative platelets disorders in experimental canine ehrlichiosis]. 2005. 76 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Com o objetivo de avaliar o envolvimento da resposta imune humoral no desenvolvimento da anemia e das alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas na erliquiose canina, sete cães adultos, livres de infecção, foram inoculados com *E. canis* e acompanhados durante 10 semanas. Três cães permaneceram como controles. Os animais foram submetidos a exame físico diário e avaliação laboratorial (hemograma, contagem de plaquetas, mielograma, bioquímica sanguínea, fragilidade osmótica eritrocitária e teste de Coombs), reação em cadeia da polimerase (PCR), pesquisa de anticorpos anti-*E. canis*, antiplaquetários e antimegacariocíticos (IFI), e teste da atividade de agregação plaquetária, em diferentes momentos durante o período de observação. Febre, esplenomegalia, linfadenomegalia, trombocitopenia, anemia não regenerativa, aumento das atividades séricas da ALT, AST e FA foram as principais alterações clínicas e de patologia clínica observadas, com pico máximo entre o 21º e 28º dias pós-infecção. Houve diminuição da capacidade de agregação plaquetária dos animais infectados ($p < 0,05$) nos dias 14, 21, 28 e 35 pós-infecção e aumento do número das células megacariocíticas, principalmente seus precursores (megacarioblastos e pró-megacariócitos) no 14º dia pós-infecção. Não foram detectados anticorpos antiplaquetários ou antimegacariocíticos. O teste de Coombs, bem como a fragilidade osmótica eritrocitária, mantiveram-se inalterados, comprovando não ter ocorrido hemólise imunomediada. Conclui-se que a anemia desenvolvida durante a fase aguda da infecção experimental por *E. canis*, de característica eritroregenerativa, ainda que

tardia, pelo menos nos animais estudados, não teve envolvimento de mecanismo imunológico direcionado contra as hemácias, e ainda, que a causa da trombocitopenia e da hipofunção plaquetária observada durante esta fase da doença não parece estar relacionada ao desenvolvimento de mecanismos imunológicos direcionados contra as plaquetas ou seus precursores.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*. Hematologia. Bioquímica clínica. Plaquetas.

ABSTRACT

BRANDÃO, L. P. **Involvement of humoral immune response on development of anemia and quantitative and qualitative platelets disorders in experimental canine ehrlichiosis.** [Envolvimento da resposta imune humoral no desenvolvimento da anemia e das alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas na erliquiose canina experimental]. 2005. 76 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

In order to determine the involvement of humoral and immune response on development of anemia and quantitative and qualitative platelets disorders in experimental canine ehrlichiosis, seven adult naïve dogs were inoculated with *E. canis* and followed during 10 weeks. Three dogs were remained as control. Daily clinical evaluation and laboratorial exams (hematological, platelet counts, bone marrow evaluation, biochemistry, erythrocyte osmotic fragility and Coombs' test) polymerase chain reaction assay (PCR), anti-*E.canis*, antiplatelet and antimegakaryocyte antibodies detection (IFA) and platelet aggregation studies were evaluated at different moments during all the experimental period. Fever, splenomegaly, lymphadenomegaly, thrombocytopenia, non-regenerative anemia and increase on liver's enzymes serum activity (ALT, AST and ALP) were the main clinical and laboratorial findings observed, with the highest point between days 21 and 28 post-infection. The infected animals showed a decrease in platelet aggregation responses ($p<0.05$) on days 14, 21, 28 and 35 post-infection and increase of megakaryocytic cells, mainly its precursors (megakaryoblasts and promegakaryocytes) on day 14 post-infection. It weren't detected any antiplatelet or antimegakaryocyte antibodies, as well as, there were no variations on erythrocyte osmotic fragility and Coombs' tests results, which confirms the absence of immune-mediated hemolysis. It is concluded that the anemia observed

during the experimental acute phase of the *E. canis* infection, with regenerative pattern, even though late, at least in the studied animals, wasn't related with immune mechanism against the red blood cells, and that, the thrombocytopenia and platelet dysfunction observed during this phase of the disease don't seem to be related with immune mechanisms against platelets or its precursors.

Keywords: *Ehrlichia canis*. Hematology. Clinical Biochemistry. Platelets.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Número de animais infectados (n=7) que apresentaram alterações clínicas, inclusões em células mononucleares circulantes e reação em cadeia da polimerase (PCR) positiva, nos diferentes momentos após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005.....40
- Quadro 2 – Títulos de anticorpos anti-*E. canis*, dos animais do grupo controle (C) e dos animais do grupo infectado (I), antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005.....41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Representação dos valores absolutos e médios ($10^3/\mu\text{L}$) do número de linfócitos dos cães do grupo infectado (I) e controle (C) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005.....46
- Tabela 2 – Representação dos valores médios do número total e da porcentagem de megacariócitos (maduros e precursores) dos cães do grupo controle (C) e infectado (I) antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005.....50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Variação da temperatura corpórea dos cães (n=7) antes e após a infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	40
Gráfico 2 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do número de plaquetas dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	45
Gráfico 3 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do número de leucócitos dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	45
Gráfico 4 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do número de linfócitos dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	46
Gráfico 5 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do número de hemácias dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	47
Gráfico 6 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do hematócrito dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	47
Gráfico 7 – Representação dos valores da média e desvio-padrão da concentração de hemoglobina dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	48
Gráfico 8 – Porcentual de reticulócitos no sangue periférico dos cães (n=7) antes e após a infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	48
Gráfico 9 – Representação dos valores da média e desvio-padrão da porcentagem de agregação plaquetária ao colágeno/epinefrina dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	49
Gráfico 10 – Representação dos valores da média e desvio-padrão da porcentagem de agregação plaquetária ao ADP/epinefrina dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	49
Gráfico 11 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da atividade sérica AST (U/L) antes (T0) e após infecção (T14 a T49) dos cães (n=7) por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	53

Gráfico 12 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da atividade sérica ALT (U/L) antes (T0) e após infecção (T14 a T49) dos cães (n=7) por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	53
Gráfico 13 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da atividade sérica de fosfatase alcalina (U/L) antes (T0) e após infecção (T14 a T49) dos cães (n=7) por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	54
Gráfico 14 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da proteína total (g/dL) antes (T0) e após infecção (T14 a T70) dos cães (n=7) por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	54
Gráfico 15 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) de albumina (g/dL) antes (T0) e após infecção (T14 a T70) dos cães (n=7) por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	55
Gráfico 16 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) de globulina (g/dL) antes (T0) e após infecção (T14 a T70) dos cães (n=7) por <i>E. canis</i> . São Paulo, 2005.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Monócito de cão contendo em seu interior mórula de *E. canis*. Esfregaço de sangue capilar corado pelo método de Rosenfeld. Aumento (1000x). São Paulo, 2005.....42
- Figura 2 – Amplificação do material genético (*E. canis*) pela técnica de nested PCR no 14º dia pós-infecção. Colunas 1, 4, 9 – cães controles (não inoculados); 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 – cães infectados experimentalmente; 11 – cão doador (*E. canis*); 12 – controle negativo; 13 – DNA ladder; 14 – controle positivo. São Paulo, 2005.....42
- Figura 3 – Cão infectado por *E. canis* apresentando opacidade da córnea e uveíte (A), edema de membro e cauda (B) no 49º dia pós-infecção. São Paulo, 2005.....42
- Figura 4 – Megacariócito maduro apresentando morfologia normal (material medular) de um cão no 14º dia pós-infecção por *E. canis* (corado pelo método de Rosenfeld - aumento 1000x). São Paulo, 2005.....50
- Figura 5 – Megacarioblastos (A e B) em material medular de um cão no 14º dia pós-infecção por *E. canis* (corado pelo método de Rosenfeld – aumento 1000x). São Paulo, 2005.....51

LISTA DE ABREVIATURAS

EMC	Erliquiose monocítica canina
p.i.	Pós-infecção
IFI	Imunofluorescência indireta
DMSO	Dimetilsulfóxido
PCR	Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1	CÃES.....	26
2.2	INÓCULO.....	26
2.3	EXAME FÍSICO.....	27
2.4	DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE <i>E. canis</i> (PCR).....	27
2.5	HEMOGRAMA.....	28
2.6	MIELOGRAMA.....	29
2.7	AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	29
2.8	TESTE DE COOMBS.....	31
2.9	FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA (FOE).....	31
2.10	BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA.....	31
2.11	REAÇÃO DE IFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG ANTI- <i>E. Canis</i>	32
2.12	REAÇÃO DE IFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTIPLAQUETARIOS.....	33
2.13	REAÇÃO DE IFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTIMEGACARIOCITICOS.....	35
2.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
3	RESULTADOS.....	38
3.1	ALTERAÇÕES CLÍNICAS.....	38
3.2	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS.....	43
3.3	ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	52
4	DISCUSSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose é uma doença causada por um grupo de microrganismos gram negativos, intracelulares obrigatórios e pleomórficos, pertencentes à Ordem *Rickettsiales*, Famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae (DUMLER et al., 2001; MACHADO, 2004). A erliquiose canina foi diagnosticada pela primeira vez na Argélia em 1935 por Donatien e Lestoquard. Entre 1968 e 1970, aproximadamente 300 cães das forças militares americanas morreram no Vietnã devido a erliquiose monocítica canina (EMC) (HUXSOLL et al., 1970). Desde então, tornou-se reconhecida mundialmente como uma importante doença infecciosa de cães e outros membros da Família Canidae (cães, coiotes, raposas e chacais) (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978). Diferentes espécies de *Ehrlichia* podem infectar cães (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998) e humanos (NEER, 2002), havendo variações quanto à patogenicidade.

Após o reconhecimento da infecção humana por *E. chaffeensis* (MAEDA et al., 1987), a EMC passou a receber maior atenção, principalmente em relação ao mecanismo patogênico envolvido, e outras espécies de *Ehrlichia* foram sendo reconhecidas. Baseando-se no seqüenciamento do gene 16S rRNA, são reconhecidos três grupos distintos: grupo *E. canis*/Cowdria (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, *E. ruminantium*); grupo *A. phagocytophila*/Anaplasma (*A. phagocytophila*, *A. platys*, *A. marginale*); grupo *E. sennetsu*/Neorickettsia (*E. sennetsu*, *E. risticii*, *Neorickettsia helminthoeca*) (DUMLER et al., 2001). Por meio do seqüenciamento do gene 16S rRNA observou-se que existe uma homologia de 98,2% entre *E. canis* e *E. chaffeensis* (ANDERSON et al., 1991).

O principal vetor e reservatório de *E. canis* (GROVES et al., 1975) é o *Rhipicephalus sanguineus*, no qual ocorre a transmissão transtadiária restrita (LEWIS JR. et al., 1977). A transmissão deste microrganismo também pode ser feita por meio da transfusão sanguínea (NEER, 1998), podendo ocorrer concomitantemente a infecção por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii*, ou ainda, associada a outras espécies de *Ehrlichia* (BREITSCHWERDT, 2002).

A infecção por *E. canis* caracteriza-se pelas manifestações clínicas inespecíficas na fase aguda (NEER, 1998), inexistência dos sintomas durante a fase assintomática, que pode durar um longo período de tempo (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989) e na fase crônica, pelo desenvolvimento de sintomas de comprometimento sistêmico e ocorrência de pancitopenia (BUHLES JR.; HUXSOLL; HILDEBRANDT, 1975; MYLONAKIS et al., 2004).

Cerca de oito a 20 dias após a transmissão de *E. canis* pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus* (HARRUS; BARK; WANER, 1997), os cães infectados podem apresentar os sintomas da fase aguda da doença, inespecíficos e de intensidade variável, como depressão, letargia, perda de peso, anorexia, febre, linfadenomegalia e esplenomegalia (CASTRO, 1997; HARRUS et al., 1997; WANER et al., 1999). Alterações da hemostasia podem ser observadas, principalmente petéquias e epistaxe, e são principalmente creditadas à trombocitopenia. Opacidade da córnea, uveíte anterior, hifema, lesões coriorretinais focais (ELLET; PLAYTER; PIERCE, 1973; STILES, 2000) e nos casos mais graves, hemorragia sub-retinal e descolamento de retina (HARRUS et al., 1998a) são freqüentemente relatados nesta fase. Outros sintomas incluem êmese, secreção oculonasal serosa ou purulenta, claudicação (THILAGAR; BASHEER; DHANAPALAN, 1990), ataxia e dispnéia (WANER, 1998). Sintomas neurológicos também podem ser observados (BORJESSON, 2000;

BREITSCHWERDT, 2001; MEINKOTH et al., 1989; MEINKOTH et al., 1998). As alterações hematológicas mais freqüentes são trombocitopenia e anemia (HUXSOLL et al., 1970; KUEHN; GAUNT, 1985; SILVA, 2001).

A fase assintomática da infecção por *E. canis* pode durar de meses a anos e é caracterizada pela persistência do agente no organismo do hospedeiro animal (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; WANER et al., 1997). Os sintomas são normalmente brandos e o animal pode aparentar-se clinicamente saudável (WADDLE; LITTMAN, 1988).

A fase crônica da doença instala-se meses a anos após devido à incapacidade do sistema imune do hospedeiro em debelar a infecção durante a fase de quiescência. Fraqueza, depressão, anorexia, perda crônica de peso e emaciação, palidez das mucosas, febre, edema periférico, especialmente dos membros pélvicos, e hemorragias, principalmente epistaxe (HUXSOLL et al., 1970), são observados em cães cronicamente infectados, não diferindo das manifestações clínicas observadas na fase aguda. Nos casos de ocorrência natural são relatados artrite (THILAGAR; BASHEER; DHANAPALAN, 1990), insuficiência renal crônica, pneumonia intersticial, infecções bacterianas e por protozoários (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999). Sintomas neurológicos, incluindo convulsões, podem ser observados (BREITSCHWERDT, 2001; MEINKOTH et al., 1989) e explicados pela extensa infiltração de plasmócitos e formação de manguitos perivasculares nas meninges (CASTRO et al., 2004; GREENE et al., 1985; MEINKOTH et al., 1989). A principal característica desta fase é a hipoplasia da medula óssea (BUHLES JR.; HUXSOLL; HILDEBRANDT, 1975; HARRUS et al., 1999) havendo a diminuição da eritropoiese, mielopoiese e da trombopoiese, e como consequência, anemia não regenerativa, leucopenia e trombocitopenia (ANDEREG; PASSOS, 1999; HUXSOLL et al., 1970). Existem fortes evidências do envolvimento de

mecanismos imunopatogênicos no desenvolvimento da EMC (CASTRO et al., 2004; HARRUS et al., 1999).

Na fase aguda da doença, a trombocitopenia é a alteração hematológica mais frequente (CASTRO, 1997; CASTRO et al., 2004). Pode, no entanto, ser observada em qualquer fase da infecção (BORJESSON, 2000; HARRUS; BARK; WANER, 1997; NEER, 1998) e é de intensidade variável, estando na dependência da fase e da gravidade da doença. Embora haja uma correlação entre a infecção pelo agente e a trombocitopenia (BULLA et al., 2004), a última não se constitui em indicador diagnóstico da infecção por *E. canis*. A trombocitopenia também pode ser observada em infecções causadas por outros agentes infecciosos transmitidos por *R. sanguineus*, como *Babesia canis* (BRANDÃO; HAGIWARA; MIYASHIRO, 2003) ou *A. platys* (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978).

Entre as causas do desenvolvimento da anemia e da trombocitopenia na fase aguda da infecção são citadas a vasculite (REARDON; PIERCE, 1981), a produção de fatores esplênicos (HARRUS et al., 1998c), e a supressão medular (HARRUS et al., 1996c; MYLONAKIS et al., 2004). Também a pancitopenia terminal é creditada à supressão da atividade medular devido à presença do microrganismo (BUHLES JR.; HUXSOLL; HILDEBRANDT, 1975). A resposta imune do hospedeiro pode levar à formação de anticorpos antiplaquetários que parecem ser responsáveis pelo desenvolvimento da trombocitopenia, principalmente na fase aguda da infecção (HARRUS et al., 1999; WANER et al., 2000).

O consumo exacerbado das plaquetas decorrente da vasculite endotelial e do seqüestro esplênico (HARRUS et al., 1998c; NEER, 1998), ou ainda, a destruição ou injúria imunomediada (HARRUS et al., 1996c; JOSHI; JAIN, 1976; WANER et al., 1995) que pode resultar na diminuição de sua meia-vida (PIERCE; MARRS; HIGHTOWER, 1977), parecem

estar envolvidos no desenvolvimento da trombocitopenia na fase aguda da infecção. Na fase crônica da doença, a trombocitopenia é creditada à diminuição da trombopoiese em decorrência da aplasia medular (HARRUS et al., 1999; WOODY; HOSKINS, 1991).

Estudos que demonstraram a redução da meia-vida plaquetária (PIERCE; MARRS; HIGHTOWER, 1977) e a presença de megatrombócitos circulantes (BORJESSON, 2000; WANER et al., 1997), indicaram o consumo plaquetário exacerbado como provável mecanismo responsável pela trombocitopenia na fase aguda da infecção por *E. canis*.

A presença de anticorpos antiplaquetários foi demonstrada em 80% dos soros sanguíneos de seres humanos com erliquiose granulocítica (WOONG; THOMAS, 1998) e em 100% dos cães com infecção aguda por *E. canis* (HARRUS et al., 1996c), ou com púrpura canina idiopática (LEWIS et al., 1995), no entanto, a origem do estímulo antigênico para a produção destes anticorpos antiplaquetários ainda não foi definida.

A presença de anticorpos antiplaquetários em cães infectados por *E. canis* (HARRUS et al., 1996c; WANER et al., 1995), ou ainda, do fator plaquetário 3 (PIERCE; MARRS; HIGHTOWER, 1977) sugerem o envolvimento de mecanismos imunomediados na gênese da trombocitopenia observada nas diferentes fases da doença (WANER et al., 1995) sendo, porém, escassos os estudos que demonstraram a cinética da formação destes anticorpos durante a infecção experimental (HARRUS et al., 1996c; WANER et al., 2000).

A trombocitopenia imunomediada é considerada comum em cães, podendo ocorrer como doença primária ou associada a outras afecções, tais como neoplasias, lúpus eritematoso sistêmico, anemia hemolítica imunomediada, púrpura trombocitopênica idiopática e febre maculosa (GRINDEM et al, 1999; KRISTENSEN et al., 1994a; LEWIS et al., 1995). A prova de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos antiplaquetários tem sido utilizada para o estudo da trombocitopenia imunomediada em seres humanos (GEORGE,

1990; VON DEM BORNE et al., 1978; VON DEM BORNE et al., 1980) e em cães (KRISTENSEN et al., 1994b).

A detecção de anticorpos antimegacariocíticos em cães com trombocitopenia imunomediada (JOSHI; JAIN, 1976; KRISTENSEN et al., 1994a) sugere que a formação de anticorpos não apenas contra as plaquetas, mas também contra seus precursores, possa estar relacionada à gênese deste distúrbio. Alterações morfológicas e quantitativas dos megacariócitos de cães com trombocitopenia imunomediada indicam a importância da análise do material medular para o diagnóstico desta e de outras afecções que causem trombocitopenia (JOSHI; JAIN, 1976).

Além da trombocitopenia, a ocorrência de hipofuncionabilidade plaquetária em cães com erliquiose foi demonstrada por Harrus et al. (1996b) e Lovering, Pierce e Adams (1980), o que pode estar intimamente relacionada à presença de anticorpos direcionados contra as glicoproteínas plaquetárias, resultando em bloqueio de receptores e diminuição da atividade hemostática.

A mensuração da atividade de agregação plaquetária é o melhor meio para determinar a funcionabilidade das plaquetas. A agregação plaquetária pode ser avaliada semiquantitativamente pela diferença na transmissão da luz através do plasma rico em plaquetas após a adição de um agente agregante (HARRUS et al., 1996b), sendo considerado o método mais adequado para pacientes com trombocitopenia por utilizar uma quantidade fixa de plaquetas em solução, não sofrendo interferência do número de plaquetas circulantes (OLSEN et al., 2001; SCHERMERHORN et al., 1994).

A anemia observada na erliquiose canina (BARTSCH; GREENE, 1996) é quase sempre do tipo não regenerativo (CASTRO, 1997; SILVA, 2001). O teste de Coombs positivo (FRANK; BREISTCHWERDT, 1999; WILLARD; TVEDTEN, 2004), como também a

observação de eritrofagocitose na medula óssea de cães infectados por *E. canis* (SILVA, 2001), sugerem a ocorrência de hemólise imunomediada. As variações no leucograma são discretas ou inexistentes na fase aguda (ALMOSNY, 1998; CASTRO, 1997), evoluindo para profunda leucopenia na fase crônica e terminal (BUHLES JR.; HUXSOLL; HILDEBRANDT, 1975).

As proteínas séricas sofrem variações durante a evolução da erliquiose canina e, na maioria das vezes, pode-se observar hiperproteinemia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (HARRUS et al., 1996a), mas nem sempre (ALMOSNY, 1998). Outras alterações bioquímicas, como o aumento das atividades séricas da alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FA), também são encontradas nos casos de infecção natural (KUEHN; GAUNT, 1985) ou experimental (ALMOSNY, 1998) por *E. canis*.

Em situações clínicas, é extremamente difícil, se não impossível, determinar a fase da infecção em que o animal se encontra (WANER, 1998). Os cães podem apresentar-se com qualquer uma das manifestações clínicas ou alterações laboratoriais que compõe a constelação de sintomas resultantes da infecção, como também serem portadores crônicos assintomáticos. A multiplicidade de apresentações clínicas e o caráter insidioso da doença na fase de latência podem dificultar o diagnóstico clínico.

O diagnóstico etiológico da infecção, baseado no encontro de inclusões (mórulas) de *E. canis* em células mononucleares circulantes, embora recomendado por alguns (ELIAS, 1991), é quase sempre frustrante (MYLONAKIS et al., 2003). Os testes sorológicos indicam infecção presente ou passada (RISTIC et al., 1972), havendo, porém algumas restrições ao seu uso para o diagnóstico da infecção (KELLY et al., 1994; NEER, 2002). Existem diversos métodos sorológicos cuja sensibilidade varia de 64,2 a 100% (BELANGER et al., 2002). São, no entanto, utilizados como testes de triagem (STILES, 2000) e em associação com a reação

em cadeia da polimerase (PCR) permitem o diagnóstico etiológico da infecção (IQBAL; RIKIHISA, 1994; WEN et al., 1997). A PCR tem sido considerada o teste laboratorial mais eficaz na indicação da cura completa do hospedeiro e extinção da infecção (CAMPAGNER et al., 2004; HARRUS et al., 1998b).

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de envolvimento da resposta imune humoral no mecanismo patogênico da erliquiose canina, constituiu-se no objetivo desta pesquisa:

- I. Caracterizar a anemia observada na fase aguda da erliquiose canina, avaliando-se a ocorrência de hemólise imunemediada.
- II. A avaliação quantitativa e qualitativa das plaquetas, bem como a presença de anticorpos antiplaquetários e antimegacariocíticos no decorrer da fase aguda da erliquiose canina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CÃES

Dez cães sem raça definida, três machos e sete fêmeas de aproximadamente três anos de idade, foram incluídos no experimento. Todos os cães foram criados e mantidos no Centro de Pesquisa de Doenças de Cães e Gatos, do Departamento de Clínica Médica da FMVZ – USP, livres de ectoparasitas, vermifugados¹ e imunizados contra as principais doenças dos cães². A prevenção da infestação por ectoparasitas foi realizada a cada três semanas pela utilização de fipronil tópico³. A ausência de infecção prévia por *E. canis* foi confirmada por meio da pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* (Dotblot-ELISA⁴ e IFI⁵) e por meio da pesquisa de material genético do parasita em DNA extraído a partir de amostra de sangue periférico (técnica da PCR⁶). Sete animais, escolhidos aleatoriamente (dois machos e cinco fêmeas) constituíram o grupo experimental (I) e os demais animais (um macho e duas fêmeas) permaneceram como controle (Grupo C).

2.2 INÓCULO

A cepa de *E.canis* utilizada foi gentilmente cedida pela Prof^{ra} Dr^a Rosângela Zacarias Machado, do Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal (isolado de um caso

¹ Panacur® cães e gatos (febendazole) – Intervet S.A.

² Fort Dodge Saúde Animal

³ Frontline® top spot – Merial Saúde Animal Ltda.

⁴ Immunocomb® – Biogal Galed Laboratories

⁵ VMRD, Inc. – lâminas (antígenos); conjugados anti-IgM e anti-IgG canino; soros controle positivo e negativo

⁶ Executado no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu

natural de erliquiose canina, em 1993). A amostra de sangue contendo o agente etiológico havia sido criopreservada em DMSO 10 % (Dimetilsulfóxido – Merck®) a -176° C. Após o descongelamento, a amostra foi inoculada em um cão, fêmea, de um ano de idade, que havia sido criado livre de ectoparasitas e sem anticorpos anti-*E. canis* ou anti-*Babesia canis* (IFI). No 16º dia pós-infecção, quando se observou a presença de mórulas de *E. canis* em células mononucleares do sangue periférico, foram colhidos 50 mL de sangue venoso, por venipunctura jugular, que fora acondicionado em frascos contendo EDTA-K₃ a 7,5%⁷ como anticoagulante. Imediatamente após, cada animal do grupo I foi inoculado com 5 mL dessa amostra de sangue.

2.3 EXAME FÍSICO

Antes e após a infecção, os cães do grupo I e o do grupo C foram submetidos a exame físico diário (estado geral, temperatura corpórea, palpação dos linfonodos e do baço, coloração das mucosas e funções vitais) durante quatro semanas e posteriormente, em intervalos semanais, até o 70º dia pós-infecção (p.i.).

2.4 DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE *E. canis* (PCR)

As amostras de sangue para pesquisa de material genético de *E. canis* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram colhidas em frascos contendo EDTA-K₃ a 7,5%⁷, acondicionadas adequadamente e enviadas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade

⁷ Vacutainer® Becton Dickinson, USA

Estadual Paulista – Campus de Botucatu, onde foram processadas, segundo a técnica descrita por Bulla (2003). A análise por meio da prova da PCR foi realizada previamente ao início do experimento (momento zero) e na 2^a, 3^a, 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas pós-infecção em todos os animais estudados.

2.5 HEMOGRAMA

As amostras de sangue destinadas à realização do hemograma e contagem de plaquetas foram colhidas mediante venipunção cefálica ou jugular e acondicionadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA-K₃ a 7,5%⁸, mantidas sob homogeneização constante em temperatura ambiente, e processadas imediatamente em analisador automatizado⁹, previamente ao início do estudo (momento zero) e semanalmente até a décima semana p.i. (70^o dia) em todos os animais. Os esfregaços sangüíneos preparados no momento da colheita e destinados à contagem diferencial de leucócitos, bem como para pesquisa de inclusões de *E. canis* (mórulas), foram corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982) e examinados em microscópio óptico, com objetiva de imersão (1000x).

A contagem de reticulócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos confeccionados após a incubação de 20µL de sangue total com igual volume do corante Novo Azul de Metileno (FERNANDEZ; GRINDEM, 2000) e corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982), por 20 minutos. O resultado foi expresso em porcentual de reticulócitos em relação ao número de hemácias maduras, corrigidas pela fórmula sugerida por Tvedten e Weiss (1999).

$\text{Reticulócitos corrigidos} = \% \text{ reticulócitos} \times \frac{(\text{Ht observado})}{(\text{Ht esperado})}$
--

⁸ Vacutainer® Becton Dickinson, USA

⁹ ABC™VET, ABX'S, França

2.6 MIELOGRAMA

O material medular para realização da análise quantitativa e morfológica dos megacariócitos foi colhido de todos os animais no momento zero e nos dias 14 e 49 p.i..

As amostras de material medular foram obtidas por punção da crista ilíaca com a utilização de agulhas 40x12 mm e seringas plásticas contendo EDTA sódico a 3%, após a sedação dos animais com fentanil e acepromazina. As amostras de material medular foram depositadas em placa plástica para a colheita seletiva do maior número de espículas, com o auxílio de um microcapilar de vidro, e colocadas sobre lâmina de vidro para confecção do esfregaço. O material foi corado com o corante de Rosenfeld (BIRGEL, 1982) para posterior análise quantitativa e morfológica da linhagem megacariocítica.

A análise do material medular foi realizada de acordo com Harvey (2001) e Weiss e Smith (2002). A série megacariocítica foi avaliada quanto ao número total de megacariócitos maduros e seus precursores (magacarioblastos e pró-megacariócitos) em amostras pareadas (três), aumento de 10x, observando-se em 25 campos (JOSHI; JAIN, 1976). Atentou-se ainda a sua morfologia (presença de vacuolizações e granulações) e características maturativas em relação ao núcleo e citoplasma por meio da utilização de microscópio em objetiva de imersão (aumento 1000x).

2.7 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

As amostras sangüíneas destinadas ao estudo da atividade de agregação plaquetária foram colhidas em citrato de sódio a 3,8% (proporção de 9:1 de sangue e citrato), mantidas em temperatura ambiente sob homogeneização constante e processadas num período máximo

de 2 horas após a colheita. O teste de avaliação da atividade de agregação plaquetária foi realizado em todos os animais no momento zero e semanalmente até o 70º dia p.i..

O sangue citratado, colhido dos animais sem que houvesse garroteamento excessivo do membro ou a necessidade da utilização de tranquilizantes, foi centrifugado a 900 x g por 3 minutos a 22°C¹⁰ para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) que foi colhido por meio de pipetas plásticas junto ao creme leucocitário, e a concentração plaquetária determinada por meio do contador automático de células¹¹. As amostras de PRP com concentração plaquetária >200.000 plaquetas/μL foram diluídas a uma concentração de 200.000 plaquetas/μL pelo acréscimo do plasma pobre em plaquetas (PPP) homólogo. Amostras de PRP contendo entre 50.000 a 200.000 plaquetas/μL foram agregadas sem diluição e amostras contendo <50.000 plaquetas/μL não foram submetidas ao teste. O plasma pobre em plaquetas homólogo foi obtido pela centrifugação do plasma restante, após a retirada do PRP, a 2000 x g por 10 minutos a 22°C¹⁰. O teste de agregação plaquetária foi realizado em um agregômetro de duplo canal¹², e os resultados expressos em impressora própria¹³, utilizando-se como agonistas para a prova, colágeno/epinefrina e ADP/epinefrina (HARRUS et al., 1996b). A mensuração da atividade de agregação plaquetária no PRP foi obtida pela comparação da transmissão de luz antes e após a adição dos agentes agregantes, utilizando-se como parâmetros de mínima e máxima agregação o PRP, antes da adição dos agregantes, e o PPP homólogo, respectivamente. A agregação foi considerada completa após um período de 5 minutos.

Para a prova utilizou-se ADP na concentração final de 10 μM e colágeno de tendão de eqüino na concentração final de 10 μg/mL¹⁴. Epinefrina na concentração final de 180 μM foi

¹⁰ Sorvall Legend RT - Kendro Laboratory Products

¹¹ ABC™VET, ABX'S, França

¹² Modelo 490 - Chrono-log Corp

¹³ Modelo 707 - Chrono-log Corp

¹⁴ Helena Laboratories, USA

adicionada aos agregantes utilizados (colágeno e ADP) no intuito de potencializar a agregação plaquetária (HARRUS et al., 1996b).

2.8 TESTE DE COOMBS

O Teste de Coombs fora executado em quatro momentos, nos dias 14, 28, 42 e 56 p.i, em todos os cães, utilizando-se amostras de sangue colhidas em EDTA-K₃ a 7,5%¹⁵ e reagentes comerciais (Canine Coombs' Reagent – goat origin anti-canine IgG, IgM e C3¹⁶) de acordo com as recomendações expressas pelo fabricante.

2.9 FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA (FOE)

Realizada no dia 0 (zero) e nos dias 14, 21, 28 e 35 p.i. com amostras de sangue colhidas em EDTA-K₃ a 7,5%¹⁵. A técnica de fragilidade osmótica eritrocitária foi executada no período máximo de 12 horas após a colheita do sangue, de acordo com o método de Parpart (JAIN, 1986) que avalia a estabilidade dos eritrócitos em solução de cloreto de sódio em concentrações que variam de 0,85% a 0%.

2.10 BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA

Para a realização das provas bioquímicas utilizou-se parte da amostra sangüínea (5mL) que fora acondicionada em tubos de vidro siliconizados, contendo gel ativador de coágulo¹⁵.

¹⁵ Vacutainer® Becton Dickinson, USA

¹⁶ VMRD, Inc. cat. 392-5

Após a retração do coágulo, os tubos foram centrifugados e o soro obtido foi congelado a -20°C até o momento da realização das provas bioquímicas.

As concentrações séricas de uréia foram determinadas pelo método enzimático (TALKE; SCHUBERT, 1965) utilizando-se reagentes comerciais (DIASYS Diagnostic Systems), e as de creatinina, utilizando-se solução de picrato alcalino, de acordo com a técnica descrita por Lutsgarten e Wenk (1972). A proteína total e a albumina séricas foram determinadas utilizando-se o método de biureto e de verde bromocresol, respectivamente. Para a determinação da concentração total sérica das globulinas procedeu-se à subtração da concentração da proteína total pela albumina. Para a determinação da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e da fosfatase alcalina (FA) foram utilizados kits comerciais (Biosystems® – Reagents & Instruments). Todas as determinações foram efetuadas no analisador bioquímico automático LIASYS® (AMS – Analyser Medical System, Roma, Itália). As determinações da uréia e creatinina séricas, bem como das atividades enzimáticas da ALT, AST e FA foram realizadas previamente ao início do experimento (momento zero) e no 14º, 21º, 28º, 42º e 49º dias p.i.. A determinação da albumina, proteína total e globulinas séricas foi realizada nos mesmos momentos anteriormente descritos e ainda nos dias 56 e 70 p.i..

2.11 REAÇÃO DE IFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG ANTI-*E. Canis*

A técnica de reação de imunofluorescência indireta utilizada foi a descrita por Ristic et al. (1972). As Lâminas¹⁷, depois de retiradas do freezer, foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Os soros testados foram diluídos em solução salina tamponada (pH

¹⁷ VMRD, Inc. – lâminas (antígenos); conjugados anti-IgM e anti-IgG canino; soros controle positivo e negativo

7,2), inicialmente a 1:40, seguindo-se por diluições sucessivas em razão dois, e então, foram pipetados 10µL em cada um dos poços das lâminas. Igual volume de soro controle positivo e soro controle negativo foi utilizado nos poços reservados para este fim. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas em estufa a 37°C durante 30 minutos, após o qual foram imersas em solução de lavagem pH 9,0 por 10 minutos e secadas ao ar livre. Cada um dos poços foi acrescido de 10µL do conjugado anti-IgM ou anti-IgG de cão, repetindo-se a incubação e lavagem. Após secas ao ar, as lâminas foram cobertas com glicerina tamponada (glicerol + solução de lavagem – 1:1) e lamínula de cristal. A leitura foi realizada em microscópio de epiluminação com lâmpada de alta pressão¹⁸ (aumento de 40x). Foram considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência de intensidade na diluição > 1:80, segundo Waner et al. (2001). A detecção de anticorpos anti-*E. canis* foi realizada previamente ao início do experimento (momento zero) e nos dias 7, 14, 21, 28, 42, 56 e 70 p.i..

2.12 REAÇÃO DE IFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTIPLAQUETÁRIOS

Todos os animais estudados foram testados previamente ao início do experimento (momento zero) e semanalmente até a 9ª semana p.i.. Utilizou-se a técnica descrita por Jain et al. (1991) com pequenas modificações. A solução de plaquetas utilizadas na prova foi obtida de um cão doador, livre de anticorpos anti-*E. canis* e negativo à detecção de material genético do parasita por meio da prova da PCR.

Deste animal foram colhidos 20 mL de sangue total em citrato de sódio a 3,8% (proporção de 9:1 de sangue e citrato) que foram centrifugados (150 x g por 3 minutos a

¹⁸ Olympus BX60 – Olympus Optical Co. Ltda – Tokyo-Japan.

22°C¹⁹) para a obtenção do PRP que fora diluído, caso necessário, em PPP homólogo, obtido da forma anteriormente descrita, com o objetivo de se obter uma concentração plaquetária de 400.000 plaquetas/ μ L²⁰. Após a determinação da concentração plaquetária, o PRP foi acondicionado em tubos plástico tipo “Falcon”²¹ e centrifugado por três vezes, a 150 x g por 10 minutos em temperatura de 22°C²², utilizando-se solução salina tamponada com 3mM de EDTA sódico (pH 6,8) para ressuspensão. Após a terceira lavagem, utilizou-se uma solução salina tamponada acrescida de paraformaldeído a 1% para ressuspensão das plaquetas que permaneceram em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos antes da confecção dos esfregaços em lâminas de vidro. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente até a completa secagem e fixadas em solução de acetona: metanol (95 mL de acetona: 25 mL de metanol) durante 20 minutos, embrulhadas individualmente em papel higiênico e papel alumínio, e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento de uso.

No momento da realização da provas, as lâminas foram retiradas do freezer e deixadas estabilizar por 20 minutos em temperatura ambiente, tendo recebido pequenos círculos confeccionados com estilete com ponta de diamante. Dentro dos círculos foram acrescidos 20 μ L de soro canino na diluição 1:10 e 1:20, diluídos com solução salina tamponada (pH 7,2). As lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C e lavadas por imersão em solução salina tamponada (pH: 7,2) por 5 minutos, em duas ocasiões, e finalmente em água destilada. Após a secagem em temperatura ambiente, foram acrescidos 20 μ L de conjugado de globulina de coelho antigamaglobulina canina, na diluição 1:160 em solução salina tamponada (pH: 7,2), e repetidos os procedimentos de incubação e lavagem. Após a

¹⁹ Sorvall Legend RT - Kendro Laboratory Products

²⁰ ABCTMVET, ABX'S, França

²¹ Becton Dickinson, USA

²² Sorvall Legend RT - Kendro Laboratory Products

completa secagem as lâminas foram cobertas com glicerina tamponada estéril (pH: 8,7) e lamínula de cristal.

A leitura foi realizada em microscópio de epiluminação com lâmpada de alta pressão²³. Cada lâmina contou com um controle negativo (soro do animal doador de plaquetas) e um controle positivo (anticorpo anti-receptor GPIIbIIIa plaquetário, marcado com fluoresceína, produzido em galinhas, concedido pelo Departamento de Fisiopatologia do Instituto Butantan).

2.13 REAÇÃO DE IFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTIMEGACARIOCÍTICOS

Realizada em todos os animais previamente ao início do experimento (momento zero) e nos dias 14 e 49 p.i., a reação de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpos antimegacariocíticos foi baseada na técnica descrita por Joshi e Jain (1976), com pequenas modificações:

- Lâminas com esfregaços de material medular obtido por punção da crista ilíaca do mesmo animal doador de plaquetas, colhido em EDTA a 3%, foram fixadas em solução de acetona: metanol (95 mL de acetona: 25 mL de metanol) por 20 minutos e deixadas secar sob ventilação constante em temperatura ambiente. As lâminas foram cuidadosamente embrulhadas em papel higiênico e papel alumínio e refrigeradas (-20°C) até o momento do uso, quando eram retiradas e deixadas estabilizar em temperatura ambiente por 20 minutos.

²³ Olympus BX60 – Olympus Optical Co. Ltda – Tokyo-Japan.

- Foram demarcadas pequenas áreas, com o uso de um estilete com ponta de diamante, onde foram colocadas as amostras de soro canino nas diluições 1:10 e 1:20 em solução salina tamponada estéril (pH: 7,2). Deu-se preferência às áreas em que se observara maior concentração de espículas medulares. As lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C.

- Após incubação, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada (pH 7,2) por 5 minutos, em duas ocasiões, e em água destilada por mais 5 minutos, tendo sido deixadas em repouso até a completa secagem.

- Após a secagem, as lâminas foram acrescidas de conjugado antigamaglobulina canina (obtido de coelho) na diluição 1:320 em solução salina tamponada estéril (pH: 7,2). As lâminas foram colocadas novamente em câmara úmida por 30 minutos e os procedimentos de lavagem foram repetidos.

Após as lavagens, as lâminas foram deixadas secar sob ventilação constante, em temperatura ambiente, cobertas com uma gota de glicerina tamponada (pH 8,7) e lamínula de cristal. A leitura realizada em microscópio de epiluminação com lâmpada de alta pressão¹⁴. Cada lâmina contou com um controle negativo (soro do animal doador de plaquetas) e um controle positivo (anticorpo anti-receptor GPIIbIIIa plaquetário, marcado com fluoresceína, produzido em galinhas, concedido pelo Departamento de Fisiopatologia do Instituto Butantan).

¹⁴ Olympus BX60 – Olympus Optical Co. Ltda – Tokyo-Japan.

2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com a finalidade de verificar se os dados obtidos apresentavam distribuição normal, foi aplicado o teste de Kolmogorov – Smirnov, utilizando-se o programa estatístico SAS[®] (Statistical Analysis Software, version 8.2, SAS Institute, Cary, NC), segundo os preceitos de Sampaio (1998).

Para a análise dos valores hematológicos (número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, número de plaquetas, leucócitos e linfócitos), da atividade de agregação plaquetária e do mielograma utilizou-se o modelo linear para análises de medidas repetidas no tempo (WANG; GOONEWARDENE, 2004) utilizando-se o procedimento PROC MIXED com estrutura de covariância de ante-dependência [ANTE (1)] e o comando LSMEANS/PDIFF para verificar as diferenças entre os tratamentos nos diferentes momentos (SAS[®], Statistical Analysis Software, version 8.2, SAS Institute, Cary, NC). Este procedimento avalia efeitos aleatórios no momento estatístico, e pode computar estimativas eficientes de efeitos fixos e erros padrão válidos das estimativas (LITTELL; HENRY; AMMERMAN, 1998). O nível de significância adotado foi de 5 % ($p < 0,05$).

Os valores das atividades séricas da ALT, AST, e FA, bem como das concentrações séricas de uréia, creatinina, albumina, proteína total e globulinas, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, não paramétricas (teste de Friedman) e detectada a diferença entre momentos, procedeu-se à comparação entre múltiplos pares (teste de Tukey), utilizando-se o programa estatístico Sigma Stat v.3.2. O nível de significância adotado foi de 5 % ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 ALTERAÇÕES CLÍNICAS

Febre, esplenomegalia, linfadenomegalia, perda de peso, anorexia e prostração foram os principais sintomas observados em todos os cães inoculados (Quadro 1). Febre oscilando entre 39.8°C a 41.5°C foi observada a partir do sétimo dia p.i., coincidindo com o encontro de mórulas em monócitos e linfócitos nos esfregaços de sangue periférico. O período febril foi de aproximadamente duas semanas de duração. Apenas um dos cães apresentou febre por um período mais prolongado, até o 42º dia p.i. como pode ser observado no gráfico 1. Picos febris intermitentes foram observados em dois animais nos dias 28 e 35 p.i., e no cão 7 foi observada febre de 41.5°C no 49º dia p.i., dia que precedeu sua morte.

Não se observou nos animais infectados a soroconversão para IgM em nenhum momento, mas para IgG a soroconversão foi observada a partir do 14º dia p.i., embora os títulos de anticorpos mensurados pela técnica de IFI ainda fossem relativamente baixos (40) naquele momento. Títulos máximos para cada um dos cães infectados foram observados entre o 56º e 70º dia p.i. (Quadro 2). Todos os animais não infectados permaneceram soronegativos.

As mórulas de *E. canis* no sangue periférico (Figura 1) foram observadas de forma intermitente em todos os cães infectados a partir do 7º dia p.i., e durante aproximadamente 21 dias. A parasitemia foi observada mais tardiamente em um cão, no 28º dia p.i. e então no 42º dia p.i., coincidindo com o período febril. A pesquisa de material genético de *E. canis* pela PCR foi positiva em todos os cães infectados a partir do 14º dia p.i. (Figura 2).

Mucosas congestas foram os sintomas iniciais observados em cinco cães, coincidindo com o surgimento da febre. A secreção ocular também foi observada já no 7º dia p.i., porém a

persistência desse sintoma ocorreu apenas no cão 7, no qual houve posteriormente o desenvolvimento de uveíte. Também esse cão foi o único em que se observou episódio de epistaxe e de edema de membros pélvicos e da cauda (Figura 3). Apesar do tratamento instituído, o óbito do animal ocorreu em menos de 24 horas. Uveíte, hifema e descolamento de retina foram observados na décima semana p.i. no cão em que o período de latência da infecção havia sido mais longo e a fase aguda da doença havia se instalado mais tardiamente. A palidez das mucosas foi observada a partir da terceira semana de infecção e se prolongou até a nona semana p.i..

A partir da quinta semana de infecção, houve melhora das condições clínicas da maioria dos cães, com a redução gradual da hiperplasia dos linfonodos e o desaparecimento das mórulas de *E. canis* da circulação sanguínea, indicando os primórdios da resolução da fase aguda da infecção.

A esplenomegalia e a reação positiva da PCR permaneceram por mais tempo, até o final do período de observação de dez semanas. Assim, apesar da melhora clínica, houve a persistência da infecção.

Alterações Clínicas	Dias p.i.										
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Febre	0	7	7	4	2	2	1	1	0	0	0
Esplenomegalia	0	6	7	7	7	7	7	7	6	6	6
Linfadenomegalia	0	3	5	7	6	5	0	0	0	0	0
Prostração	0	5	1	2	1	1	1	1	0	0	0
Mucosas congestas	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mucosas hipocoradas	0	0	0	5	7	7	7	7	5	1	0
Secreção ocular	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Uveíte	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Epistaxe	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Edema de membro	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mórulas	0	2	5	4	3	0	1	0	0	0	0
PCR	0	*	7	7	7	*	7	*	4	*	5

* – não realizado

Quadro 1 – Número de animais infectados (n=7) que apresentaram alterações clínicas, inclusões em células mononucleares circulantes e reação em cadeia da polimerase (PCR) positiva, nos diferentes momentos após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

Gráfico 1 – Variação da temperatura corpórea dos cães (n=7) antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

Quadro 2 – Títulos de anticorpos anti-*E. canis*, dos animais do grupo controle (C) e dos animais do grupo infectado (I), antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

CÃO	Títulos de anticorpos							
	Dias							
	0	7	14	21	28	42	56	70
I1	0	0	40	80	160	640	2560	1280
I2	0	0	40	160	320	2560	20480	10240
I3	0	0	40	160	320	640	10240	5120
I4	0	0	40	160	320	640	5120	10240
I5	0	0	40	160	320	5120	10240	20480
I6	0	0	40	160	320	640	5120	10240
I7	0	0	40	160	320	5120	**	**
C1	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	0	0	0	0	0	0	0	0
C3	0	0	0	0	0	0	0	0

** não realizado (óbito)

I (animal grupo infectado)

C (animal grupo controle)

Figura 1 – Monócito de cão contendo em seu interior mórula de *E. canis*. Esfregaço de sangue capilar corado pelo método de Rosenfeld. (1000x). São Paulo, 2005

Figura 2 – Amplificação do material genético (*E. canis*), pela técnica de nested PCR, no 14º dia pós-infecção. Colunas 1, 4, 9 – cães controles (não inoculados); 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 – cães infectados experimentalmente; 11 – cão doador (*E. canis*); 12 – controle negativo; 13 – DNA ladder; 14 – controle positivo. São Paulo, 2005

(A)

(B)

Figura 3 – Cão infectado por *E. canis* apresentando opacidade da córnea e uveíte (A), edema dos membros posteriores e cauda (B) no 49º dia pós-infecção. São Paulo, 2005

3.2 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Trombocitopenia intensa (< 100.000 plaquetas / μL) foi observada a partir do 14º dia p.i., e se manteve até o 28º dia p.i., a partir do qual o número de plaquetas da maioria dos animais infectados retornou gradualmente aos valores basais, com exceção do animal em que ocorreu o desfecho fatal, no qual a trombocitopenia manteve-se inalterada, alcançando os menores valores na terceira semana p.i., (23×10^3 plaquetas / μL), ocasião em que ocorreu epistaxe. No gráfico 2 estão representados a média e o desvio-padrão do número de plaquetas dos cães dos grupos infectado e controle durante as dez semanas de observação.

Houve variação quantitativa dos leucócitos totais, devido principalmente à linfopenia. A leucopenia foi confirmada estatisticamente apenas no 7º e 70º dia p.i. ($p < 0,05$), entretanto, alguns animais apresentaram diminuição considerável do número de leucócitos circulantes entre esse período, e no caso do animal em que ocorreu o óbito, a queda gradual do número de leucócitos foi um sinal de mau prognóstico (Gráfico 3). Houve também uma ampla variação no número absoluto de linfócitos entre os cães do grupo I em diferentes momentos. A linfopenia foi estatisticamente significativa no 7º, 14º e 63º dia p.i. ($p < 0,05$). No Gráfico 4 e na tabela 1 estão representados os valores da média e desvio-padrão e os valores absolutos e médios do número de linfócitos, respectivamente.

A queda gradual do número de hemácias, hematócrito e da concentração de hemoglobina foi observada já a partir do sétimo dia p.i., com diferença estatística significativa entre os dias 14º e 63º para os valores de hemácias e concentração de hemoglobina, e até o 56º dia p.i. em relação ao hematócrito ($p < 0,05$). A diminuição da massa eritrocitária atingiu valores mínimos entre o 21º e 28º dia p.i., período a partir do qual a palidez das mucosas foi

cl clinicamente evidenciada, retornando gradativamente aos patamares iniciais (Gráficos 5, 6 e 7 – He, Ht e Hb). A resposta eritropoiética medular foi comprovada pelo aumento dos reticulócitos na circulação sangüínea a partir do 28º dia até o 49º dia p.i. (Gráfico 8).

Em nenhum dos momentos avaliados houve alteração na FOE ou reação positiva ao teste de Coombs dos animais estudados (grupos infectado e controle).

A mensuração da atividade da agregação plaquetária evidenciou diminuição estatística significativa ($p < 0,05$) nos animais do grupo infectado ao colágeno/epinefrina e ao ADP/epinefrina nos dias 14, 21, 28 e 35 p.i. (Gráficos 9 e 10).

Não foram observadas alterações morfológicas dos megacariócitos dos animais de ambos os grupos em nenhum momento do estudo (Figura 4). A avaliação do material medular demonstrou aumento significativo do número total de células da linhagem megacariocítica no grupo de animais infectados no 14º dia p.i., mesmo momento em que nesse grupo de animais detectou-se aumento significativo da quantidade de células precursoras da linhagem megacariocítica (megacarioblastos e pró-megacariócitos) e diminuição dos megacariócitos maduros ($p < 0,05$), como pode ser observado na tabela 2 e figura 5.

Não foram detectados anticorpos antiplaquetários ou antimegacariocíticos nos animais em nenhum momento do estudo.

* $p < 0,05$

Gráfico 2 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do número de plaquetas dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

* $p < 0,05$

Gráfico 3 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do número de leucócitos dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

* $p < 0,05$

Gráfico 4 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do número de linfócitos dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

Tabela 1 – Representação dos valores absolutos e médios ($10^3/\mu\text{L}$) do número de linfócitos dos cães do grupo controle (C) e infectado (I) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

CÃO	Dias										
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I 1	2,9	0,6	0,5	1,3	2,9	1,6	2	1,4	2,5	2,6	2,3
I 2	1,6	0,9	1	1,7	2,1	0,7	0,5	1,2	1	1	1
I 3	1,9	1	0,5	1,2	1,1	0,5	0,5	0,4	0,3	0,8	0,4
I 4	0,8	1	1,4	3,2	4	1	1,4	1	0,4	0,5	0,3
I 5	1,7	0,7	2,1	2,7	6,3	4,9	2,6	0,6	1,8	1,3	2,4
I 6	1,5	1,2	0,3	0,5	0,7	0,9	1,6	2,6	0,8	0,6	0,7
I 7	1,8	1,3	0,6	1,8	0,5	0,8	0,2	0,2	*	*	*
média	1,7	1 ^a	0,9 ^a	1,8	2,5	1,5	1,2	0,7	1,1	1,1 ^a	1,2
C 1	2,0	2,1	2,5	1,5	2,6	2,8	2	1,9	1,8	3,1	2,7
C 2	1,4	3,6	2,9	1,9	2,5	1,5	1,5	1,8	2,1	2,2	2,7
C 3	1,8	2,6	1,8	2,9	2,5	1,9	2,2	2,2	2,4	2	1,9
média	1,7	2,8 ^b	2,4 ^b	2,1	2,5	2,1	1,9	2	2,1	2,5 ^b	2,4

* não realizado

a $\neq$ b ($p < 0,05$)

$p < 0,05$

Gráfico 5 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do número de hemácias dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

Gráfico 6 – Representação dos valores da média e desvio-padrão do hematócrito dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

Gráfico 7 – Representação dos valores da média e desvio-padrão da concentração de hemoglobina dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

Gráfico 8 – Porcentual de reticulócitos no sangue periférico dos cães (n=7) antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

* $p < 0,05$

Gráfico 9 – Representação dos valores da média e desvio-padrão da porcentagem de agregação plaquetária ao colágeno/epinefrina dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

Gráfico 10 – Representação dos valores da média e desvio-padrão da porcentagem de agregação plaquetária ao ADP/epinefrina dos cães do grupo controle (●) e infectado (□) antes e após infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005.

Tabela 2 – Representação dos valores médios do número total e da porcentagem de megacariócitos (maduros e precursores) dos cães do grupo controle (C) e infectado (I) antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

Cães	Dias pós-infecção								
	0			14			49		
	T	M	P	T	M	P	T	M	P
I	40	82,8%	17,2%	79 ^a	56,2% ^a	43,8% ^a	44	79,6%	20,4%
C	37	82,2%	17,8%	42 ^b	82,2% ^b	17,8% ^b	47	80,8%	19,2%

T – número total; M – maduros; P – precursores; C - animais do grupo controle; I – animais do grupo infectado.

a ≠ b (p<0,05)

Figura 4 – Megacariócito maduro apresentando morfologia normal (material medular) de um cão no 14º dia pós-infecção por *E. canis* (corado pelo método de Rosenfeld - aumento 1000x). São Paulo, 2005

Figura 5 – Megacarioblastos (A e B) em material medular de um cão no 14º dia pós-infecção por *E. canis* (corado pelo método de Rosenfeld – aumento 1000x). São Paulo, 2005

3.3 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS

As alterações mais evidentes foram observadas em relação à atividade sérica das enzimas indicativas de lesão hepática e colestase. A alteração mais precocemente observada foi em relação ao aumento da atividade sérica da enzima AST no 14º dia p.i. ($p < 0,05$), tendo persistido até o 28º dia p.i. ($p < 0,05$), período após o qual houve retorno aos seus níveis basais (Gráfico 11). Em relação à ALT (Gráfico 12), o aumento de sua atividade sérica ocorreu de forma evidente ($p < 0,05$) a partir do dia 21 p.i. (T₂₁), com pico no dia 28 p.i. (T₂₈) e retorno gradativo aos valores basais, com exceção de um animal, no 42º dia p.i. (T₄₂). O perfil de aumento da atividade sérica da FA (Gráfico 13) também foi semelhante ao da ALT, sendo o aumento significativo a partir do 21º dia p.i. (T₂₁), tendo persistido até o 42º dia p.i. (T₄₂).

Em relação às proteínas séricas totais, ocorreram variações, porém sem significância (Gráfico 14), o mesmo tendo ocorrido com as variáveis uréia e creatinina sanguíneas. Houve discreta diminuição da albumina no 21º e 28º dia p.i. ($p < 0,05$) como pode ser evidenciado no Gráfico 15, inversamente ao que ocorreu com as globulinas, que se encontravam aumentadas nessa ocasião (Gráfico 16).

Gráfico 11 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da atividade sérica AST (U/L) antes (T0) e após infecção (T14 a T49) dos cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

Gráfico 12 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da atividade sérica ALT (U/L) antes (T0) e após infecção (T14 a T49) dos cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

p<0,05 T21>T0 T28>T0 T42>T0

Gráfico 13 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da atividade sérica de fosfatase alcalina (U/L) antes (T0) e após infecção (T14 a T49) dos cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

p<0,05 T42>T21 T70>T21

Gráfico 14 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da proteína total (g/dL) antes (T0) e após infecção (T14 a T70) dos cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

Gráfico 15 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) de albumina (g/dL) antes (T0) e após infecção (T14 a T70) dos cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

Gráfico 16 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) de globulina (g/dL) antes (T0) e após infecção (T14 a T70) dos cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

4 DISCUSSÃO

A evolução clínica dos cães infectados por *E. canis*, nas quatro semanas iniciais, foi semelhante à observada por Castro (1997), que havia utilizado cães da raça Pastor alemão, considerada a raça mais suscetível à infecção (HARRUS et al., 1997; NYINDO et al., 1980; RIKIHISA et al., 1994). Apesar de se tratar de cães sem raça definida, de um modo geral considerados mais resistentes (ALMOSNY, 1998; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999), todos os animais foram efetivamente infectados com a mesma cepa utilizada por Castro (1997) e desenvolveram além de febre, prostração, dores musculares, hiperplasia linfóide, esplenomegalia, sintomas de comprometimento ocular, anemia e trombocitopenia, sintomas esses relatados em cães com infecção natural (COWELL et al., 1998; HARRUS et al., 1997; WADDLE; LITTMAN, 1988) ou experimentalmente infectados (CASTRO, 1997; RIKIHISA et al., 1994). A faixa etária mais elevada, adultos de três anos, não se constituiu em fator limitante da infecção e desenvolvimento da doença. Aparentemente, não há predisposição etária na infecção natural por *E. canis*, sendo a erliquiose diagnosticada em cães adultos, de qualquer faixa etária (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; WADDLE; LITTMAN, 1988). Confirmou-se assim a patogenicidade e a virulência da cepa nativa, que havia sido originariamente obtida de um caso clínico (MACHADO, 2004).

O acompanhamento dos cães por um período maior de tempo permitiu observar a evolução da infecção, cujo pico ocorreu ao redor da terceira a quarta semana, como havia sido observado por Castro (1997). As manifestações clínicas gerais relatadas em cães naturalmente infectados (BUORO et al., 1990; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999), como febre, prostração, dores musculares (BUORO et al., 1990), claudicação (THILAGAR; BASHEER;

DHANAPALAN, 1990) e esplenomegalia (HARRUS et al., 1997) foram observados em todos os cães do grupo I e variaram em intensidade e duração. Sintomas de comprometimento ocular como os relatados por Ellet, Playter e Pirece (1973), Harrus et al. (1998a) e Oriá (2001), também foram observados em diferentes momentos, confirmando-se o caráter polissistêmico da infecção.

Apesar das variações individuais na resposta ao agente infeccioso em relação ao período de incubação ou à resposta orgânica, a infecção transcorreu de forma homogênea, com pico da infecção ao redor da terceira semana como é citado por Castro et al. (2004) e Rikihisa et al. (1994). Concomitantemente, no auge da infecção e das manifestações clínicas, foram observadas alterações hematológicas e bioquímicas. Extensos infiltrados mononucleares em órgãos viscerais (CASTRO, 1997; ELLET; PLAYTER; PIERCE, 1973; HILDEBRANDT et al., 1973; ORÍÁ, 2001; SILVA, 2001), nos olhos (ELLET; PLAYTER; PIERCE, 1973; ORÍÁ, 2001) e na medula óssea (SILVA, 2001) evidenciaram a presença das células infectadas nesses locais e a conseqüente reação inflamatória imunomediada. No confronto entre os microrganismos invasores intracelulares e o hospedeiro, a resolução da infecção envolve necessariamente a imunidade mediada por células (SCHAIBLE; COLLINS; KAUFMANN, 1999). Linfócitos T citotóxicos estão aumentados na EMC (CASTRO, 1997; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999). A liberação de TNF- α pelos macrófagos e linfócitos resultam em hepatotoxicidade (BRADHAM et al., 1998), o que justifica a elevação da atividade sérica das enzimas citosólicas hepáticas (ALT e AST), como também na aparente supressão temporária da atividade eritropoiética medular dos animais estudados, como havia sido observado por Hara et al. (2004).

O prognóstico da doença está na dependência da capacidade do sistema imune em controlar a infecção, equilibrando a produção de TNF- α e de IFN- γ ; a excessiva produção de

TNF- α e a menor produção de IFN- γ pode resultar no desenvolvimento de choque séptico nas infecções erliquiais (ISMAIL et al., 2004), como ocorreu com o único caso de evolução fatal. A hipoalbuminemia observada pode ser consequência do processo inflamatório agudo, já que a síntese hepática da albumina, conhecida como proteína negativa de fase aguda (JAIN, 1986), pode estar diminuída em detrimento das proteínas de fase aguda.

A resposta humoral observada já a partir do 14º dia p.i. assemelhou-se à relatada por outros pesquisadores (GAUNT et al., 1996; KEYSARY et al., 1996; WANER et al., 1996). O aumento crescente do título de anticorpos, atingindo o pico ao redor de 56 a 70 dias também encontra respaldo nas observações de Harrus et al. (1997), que citam a presença de altos títulos de anticorpos humorais em cães naturalmente infectados por *E. canis*, o que concorda com Bartsch e Greene (1996); Perille e Matus (1991), e é indicativo da persistência do estímulo antigênico. Contrariando a expectativa, não foram detectados anticorpos circulantes do tipo IgM em nenhum dos momentos avaliados. Títulos baixos (40) foram observados na reação de IFI por Weisiger, Ristic e Huxsoll (1975) a partir do sétimo dia p.i., persistindo até a vigésima semana p.i., enquanto McBride et al. (2003) observaram títulos mínimos de IgM no ensaio imunoenzimático (ELISA) somente no 28º dia em quatro dos 15 cães infectados experimentalmente por *E. canis*. A produção de IgM pode ser uma resposta muito precoce, tênue e de curta duração, não tendo sido detectada pela reação de IFI nos momentos estudados.

Outrossim, pode haver uma variação individual (McBRIDE et al, 2003), ou ainda, a localização intracelular de *E. canis* pode não resultar em estímulo imunogênico eficiente para a indução de resposta humoral representada por IgM. Somente após a intensa replicação do microrganismo, com a constante produção de antígenos e, conseqüentemente, um estímulo antigênico contínuo, é que houve a formação de anticorpos humorais, o que justifica também

o desenvolvimento tardio do título máximo de anticorpos IgG ao redor do 56º dia p.i. nos cães infectados.

A intermitência com que foram observadas as inclusões nas células mononucleares, e a curta duração do período da parasitemia, explicam a baixa frequência da observação de mórulas nos linfócitos e monócitos circulantes (MACIEIRA et al., 2004) e conseqüentemente, da pouca sensibilidade da citologia como método diagnóstico da infecção (MYLONAKIS et al., 2003).

Apesar da completa recuperação clínica, houve persistência da esplenomegalia, o que foi interpretado como um sintoma indicativo da manutenção da infecção, como citam Harrus et al. (1998b). A pesquisa de material genético de *E. canis* pela PCR permitiu confirmar essa hipótese.

O baço tem papel fundamental na patogênese da EMC (HARRUS et al., 1998c) e se constitui no órgão que alberga o parasita durante a fase assintomática da infecção e o último órgão a acomodar *E. canis* antes de sua eliminação do organismo hospedeiro (HARRUS et al., 1998b). Ainda, de acordo com esses autores, existe a possibilidade de que o parasita se “esconda” nos macrófagos do baço, o que se constitui no mecanismo de escape do microrganismo em relação ao sistema imune de defesa do hospedeiro (HARRUS et al., 2003). O microrganismo sobrevive nas células infectadas, a despeito da resposta humoral (HARRUS et al., 1999). Nessas condições, a amplificação de DNA extraído do sangue periférico, pode fornecer resultados falsos negativos. Assim, apesar do resultado negativo da PCR em dois cães na 8ª semana p.i. e de um cão na décima semana p.i., a esplenomegalia ainda evidente sugeriu a possibilidade da persistência da infecção, o que foi comprovado pela reação positiva da PCR em alguns momentos nas semanas subseqüentes ao estudo.

Testes de auto-aglutinação e de antiglobulina positivas, e a hipergamaglobulinemia (HARRUS et al., 2001; WOODY; HOSKINS, 1991) que persiste por todos os estágios da doença, dão suporte à teoria de que a doença possa ter um componente imunomediado. Da mesma forma, também pode ocorrer o envolvimento de mecanismo imune no desenvolvimento da anemia e da trombocitopenia. Entretanto, a fragilidade osmótica eritrocitária que se manteve inalterada em todos os cães infectados, no decorrer da fase aguda da infecção, bem como o resultado negativo do teste de Coombs em todos os momentos estudados, indicaram que, pelo menos nesses animais, não parece ter havido hemólise imunomediada que pudesse ter contribuído para o desenvolvimento da anemia. Nos raros casos de erliquiose citados na literatura em que o teste de Coombs foi positivo, outras doenças concomitantes estavam envolvidas (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999), o que pode ter contribuído para os resultados positivos do teste.

A instalação progressiva da anemia, sem que houvesse inicialmente o aumento dos reticulócitos circulantes, e o retorno gradual do número de hemácias aos patamares iniciais, sugere a existência de um mecanismo de supressão temporária da atividade eritropoiética medular, como citado por Buhles Jr., Huxsoll e Hildebrandt (1975). Essa atividade foi restaurada ao mesmo tempo em que ocorreu a recuperação clínica dos cães. Assim, os reticulócitos passaram a ser encontrados em maior número a partir da quarta semana pós-infecção, coincidindo com a melhora clínica. De acordo com Harrus et al. (1998c), a esplenomegalia é uma constante na EMC e é considerada indicativa da produção de um fator esplênico que seria o responsável pela supressão medular. Entretanto, a resolução da anemia, apesar da persistência da esplenomegalia, sugere o envolvimento de outros fatores em sua gênese.

As bactérias intracelulares são dependentes de ferro para sua sobrevivência e replicação, dessa forma competindo com a célula do hospedeiro pelo estoque de ferro (SCHAIBLE; COLLINS; KAUFMANN, 1999). O hospedeiro, por seu turno, procura indisponibilizar o ferro promovendo sua ligação à ferritina, o que resulta também na diminuição da sua disponibilidade para a síntese de hemoglobina, desenvolvendo-se dessa forma a anemia do processo inflamatório, comum em cães (GUIMARÃES, 1998; WANER; HARRUS, 2000). A anemia das doenças inflamatórias caracteriza-se por seu caráter não regenerativo e pode se instalar rapidamente, com diminuição do hematócrito e da concentração de hemoglobina em três a 10 dias (FELDMAN; KANEKO; FARVER, 1981), como ocorreu com os cães infectados por *E. canis* neste estudo em que a queda do hematócrito já fora observada a partir do sétimo dia p.i..

Citocinas liberadas durante o processo inflamatório, como IL-1 e TNF- α , podem suprimir a atividade eritropoiética (WANER; HARRUS, 2000). Nos processos inflamatórios agudos, há um aumento da concentração sérica da ferritina (SMITH, 1989), também observada por Guimarães (1998), já a partir de dois dias após a aplicação intramuscular do adjuvante de Freund, indicando a maior demanda orgânica por ferritina, a qual, é considerada uma das proteínas de fase aguda (proteínas que são rapidamente sintetizadas no fígado como resposta orgânica ao processo inflamatório agudo).

Na erliquiose canina, embora não haja informações sobre as alterações nas concentrações séricas de ferritina, outras proteínas de fase aguda encontram-se aumentadas (RIKIHISA et al., 1994; SHIMADA et al., 2002) o mesmo podendo ocorrer com a ferritina. Uma vez sobrepujada a fase aguda, a síntese dessas proteínas retorna ao patamar basal, inclusive a da ferritina, cuja demanda diminui, já que há o controle do organismo hospedeiro sobre o agente infeccioso invasor, possibilitando dessa forma o retorno gradual da

eritropoiese. A supressão da atividade eritropoiética pode justificar a anemia periférica que ocorre a despeito da aparente normalidade celular da medula óssea de cães infectados por *E. canis* (SILVA, 2001).

Havendo a supressão temporária da eritropoiese, a hemólise imunomediada, que porventura possa ocorrer (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; SILVA, 2001) não seria reconhecida pelo seu usual caráter regenerativo (JAIN, 1986). Somente os testes imunológicos ou o teste da FOE permitiriam reconhecer a ocorrência de hemólise imunomediada (JAIN, 1986) e assim, o resultado negativo observado permitiu concluir que não houve a contribuição da hemólise imunomediada no desenvolvimento da anemia.

A persistência de *E. canis* pode manter ativada, embora em patamares mais baixos, os mecanismos de defesa do hospedeiro, inclusive o da indisponibilização do ferro para a multiplicação do parasita, o que ao longo do tempo pode resultar na gradual diminuição não apenas da eritropoiese. Da mesma forma, toda a atividade hematopoiética medular pode ser comprometida sob o efeito do TNF- α (HARA et al., 2004), resultando assim na pancitopenia terminal.

A recuperação gradativa e espontânea dos valores plaquetários em curto espaço de tempo, com nadir observado entre o 14º e 28º dia p.i. coincidindo com o acme da infecção, sugere que outros mecanismos não imunológicos estejam relacionados na gênese da trombocitopenia, como é citado por Grindem et al. (1999), Waner et al. (1995) e Waner et al. (1999) e fora posteriormente confirmado pela ausência de anticorpos antiplaquetários detectáveis nos animais estudados.

Estudos anteriores que demonstraram a presença de anticorpos antiplaquetários em cães experimentalmente infectados por *E. canis* (HARRUS et al., 1996c; WANER et al., 1995; WANER et al. 2000) não explicaram o súbito desaparecimento destes logo após a

resolução da fase aguda da doença, o que pode indicar a existência de outros mecanismos associados ao desenvolvimento da trombocitopenia nesta fase da infecção, como fora sugerido por Harrus et al. (1996c); questionando-se deste modo o papel dos anticorpos antiplaquetários como causadores da trombocitopenia, ou ainda, da hipofuncionabilidade plaquetária na erliquiose canina.

É provável que devido ao caráter inflamatório e agudo da infecção tenha ocorrido consumo plaquetário exacerbado, decorrente da vasculite endotelial ou do consumo esplênico, que resultou em trombocitopenia pontual grave em um dos animais, em que se observou epistaxe, uveíte, edema periférico e óbito. Do mesmo modo, Frank e Breitschwerdt (1999) sugeriram que deva haver outros mecanismos relacionados ao desenvolvimento da trombocitopenia e da hipoagregação plaquetária, além da formação de anticorpos antiplaquetários, o que parece ser evidente no experimento de Harrus et al. (1996b) em que a hipofunção plaquetária se manteve mesmo após o desaparecimento dos anticorpos antiplaquetários.

A hipoagregação plaquetária observada durante o período inicial do experimento fora relatada por diversos pesquisadores (HARRUS et al., 1996b; LOVERING; PIERCE; ADAMS, 1980) e parece estar relacionada a mecanismos ainda não bem definidos, como a ação de anticorpos antiplaquetários ou algum fator plasmático inibitório da agregação plaquetária (LOVERING; PIERCE; ADAMS, 1980), à exaustão plaquetária por ativação reversível das plaquetas circulantes (VARELA et al., 1997), produção de um fator que interferiria com a liberação do fator 3 plaquetário (LOVERING; PIERCE; ADAMS, 1980), ou ainda, à ação de paraproteínas que recobririam a superfície plaquetária, causando sua hipofuncionabilidade (KUEHN; GAUNT, 1985).

Não se pode concluir que a causa da hipofunção plaquetária em animais infectados por *E. canis* seja ocasionada por um fator isolado, mas sim uma resultante de fatores decorrentes da resposta imunológica desencadeada pelo parasita, resultando em estimulação antigênica que pode ocasionar a formação de proteínas inespecíficas produzidas durante a fase aguda da infecção que, de modo direto ou não, poderiam ocasionar no recobrimento das plaquetas e bloqueio de seus receptores, como fora sugerido por Varela et al. (1997). Do mesmo modo, Reardon e Pierce (1981) já haviam demonstrado que não há correlação entre a hipergamaglobulinemia e a detecção de anticorpos específicos contra *E. canis*, sugerindo que a resposta imune exagerada observada na infecção aguda possa contribuir para o desenvolvimento de distúrbios imunemediados.

Vários experimentos demonstraram a capacidade reduzida do ADP em agir como agente agregante das plaquetas de cães (BARR, et al., 1992; THOMAS; ROGERS, 1999), o que foi confirmado neste estudo pela necessidade da adição de epinefrina a este agente com a finalidade de induzir uma segunda fase da agregação (irreversível), como fora demonstrado por Harrus et al. (1996b). Os resultados obtidos neste experimento coincidem com os achados de Greisler et al. (1990) que utilizaram PRP e reportaram que apenas 26% dos cães apresentaram capacidade de agregação ao ADP (concentração final de 20 μ M).

A razão pela qual a epinefrina potencializa a agregação plaquetária pode ser explicada por sua ação sinérgica junto a outros agentes agonistas, estimulando a agregação plaquetária por ação direta nos receptores α -2 adrenérgicos, como já fora demonstrado por Harrus et al. (1996b) que também adicionaram epinefrina ao ADP para desencadear uma onda de agregação secundária. Por outro lado, Gaunt, Baker e Babin (1990) e Schermerhorn et al. (1994) demonstraram que o colágeno é capaz de induzir a agregação plaquetária de forma

constante e reprodutível, tanto pelo método da turbidometria quanto da impedância, utilizando-se concentrações variando de 1 a 15µg/mL.

A ausência da detecção de anticorpos antimegacariocíticos demonstrou também não ter havido o envolvimento de mecanismos imunológicos direcionados contra os precursores plaquetários, como já fora suspeitado em virtude da inexistência de alterações morfológicas dos megacariócitos (vacuolizações, diminuição ou ausência de granularidade citoplasmática e cariólise) pela análise do material medular (mielograma), como fora observado por Joshi e Jain (1976) em cães portadores de anticorpos antiplaquetários e antimegacariocíticos.

Os achados do mielograma corroboram com os estudos de Reardon e Pierce (1981) que demonstraram hipercelularidade da linhagem megacariocítica, com aumento do número de seus precursores (megacarioblastos e pró-megacariócitos), durante a fase aguda da erliquiose canina, provavelmente em decorrência da hiperplasia da linhagem megacariocítica em resposta à maior demanda de plaquetas na circulação periférica. Este achado explica a presença de macroplaquetas circulantes comumente observadas na circulação periférica de animais durante a fase aguda da erliquiose canina, como fora relatado por Borjesson (2000); Harrus, Bark e Waner (1997) e Waner et al. (1997).

Conclui-se que a anemia desenvolvida durante a fase aguda da infecção experimental por *E. canis*, de característica eritroregenerativa, ainda que tardia, pelo menos nos animais estudados, não teve envolvimento de mecanismo imunológico direcionado contra as hemácias, e ainda, que a causa da trombocitopenia e da hipofunção plaquetária observada durante esta fase da doença não parece estar relacionada ao desenvolvimento de mecanismos imunológicos direcionados contra as plaquetas ou seus precursores.

REFERÊNCIAS*

- ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935). **Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. 1998. 197 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 1998.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina – revisão. **Clínica Veterinária**, n. 19. p.31-38, 1999.
- ANDERSON, B. E.; DAWSON, J. E.; JONES, D. C.; WILSON, K. H. *Ehrlichia chaffensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2838-2842, 1991.
- BARR, S. C.; LUDDERS, J. W.; LOONEY, A. L.; GLEED, R. D.; ERB, H. N. Platelet aggregation in dogs after sedation with acepromazina and atropine and during subsequent general anesthesia and surgery. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 11, p.2067-2070, 1992.
- BARTSCH, R. C.; GREENE, R. T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 4, 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* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3506-3508, 2002.
- BIRGEL, E. H. Hematologia Clínica Veterinária. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1982, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 50.
- BORJESSON, D. Ehrlichiosis: new perspectives on pathogenesis and diagnosis. In: ANNUAL VETERINARY MEDICAL FORUM, 18., 2000, Seattle. **Proceedings...** Seattle: American College of Veterinary Internal Medicine, 2000. p. 574-578.
- BRADHAM, C. A.; PLUMPE, J.; MANNS, M. P.; BRENNER, D. A.; TRAUNTWEIN, C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. G387-G392, 1998.
- BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA, M. K.; MIYASHIRO, S. I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 4, p. 253-265, 2003.

* Conforme as diretrizes para apresentação de dissertação e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4.ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84p.

BREITSCHWERDT, E. B. Ehrlichiosis: a new zoonosis? **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, n. 1(A), p. 10-14, 2002.

BREITSCHWERDT, E. B. Neurologic manifestations of tick-transmitted infectious diseases. In: ANNUAL VETERINARY MEDICAL FORUM, 19., 2001, Denver. **Proceedings...** Denver: American College of Veterinary Internal Medicine, 2001. p. 399-401.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsoni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998.

BUHLES JR., W. C.; HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K. Tropical canine pancytopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 85, n. 4, p. 511-521, 1975.

BULLA, C. **Contagem de plaquetas como um teste de triagem para o diagnóstico da infecção por *Ehrlichia canis***. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAÚJO 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, n. 1, p. 141-146, 2004.

BUORO, I. B. J.; KANUI, T. I.; ATWELL, R. B.; NJENGA, K. M.; GATHUMBI, P. K. Polymyositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, p. 624-627, 1990.

CAMPAGNER, F.; DINIZ, P. P. V. P.; ARAÚJO JR., J. P.; SCHWARTZ, D. S. Nested PCR on the diagnosis and therapeutic evaluation of canine ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 354, 2004. Suplemento 1. Resumo.

CASTRO, M. B. **Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães por *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935) ou MOSHKOVSKI 1945**. 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

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

COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; CLINKENBEARD, K. D.; MEINKOTH, J. H. Ehrlichiosis and polyarthrititis in three dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 8, p. 1093-1095, 1998.

DUMLER, J. S.; BARBET, 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 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

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

ELLET, E. W.; PLAYTER, R. F.; PIERCE, K. R. Retinal lesions associated with induced canine ehrlichiosis: a preliminary report. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 9, p. 214-218, 1973.

FELDMAN, B. F.; KANEKO, J. J.; FARVER, T. B. Anemia of inflammatory disease in the dog: clinical characterization. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 7, p. 1109-1113, 1981.

FERNANDEZ, F. R.; GRINDEM, C. B. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 110-116.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

GAUNT, S. D.; BAKER, D. C.; BABIN, S. S. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n.2, p.290-293, 1990.

GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. E.; BERRY, C. M.; BRENNAN, B. Isolation of *Ehrlichia canis* from dogs following subcutaneous inoculation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1429-1432, 1996.

GEORGE, J. N. Platelet immunoglobulin G: Its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. **Blood**, v. 76, p.859-870, 1990.

GREENE, C. E.; BURGDORFER, W.; CAVAGNOLO, R.; PHILIP, R. N.; PEACOCK, M. G. Rocky mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 186, n. 5, p. 465-472, 1985.

GREISLER, H. P.; MCGURRIN, J. F.; KLOSAK, J. K.; TALTARSALL, C. W.; ELLINGER, J.; HENDERSON, S. C.; CABUSAO, E. A. The validity of canine platelet aggregometry in predicting vascular graft patency. **Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 31, p. 712-718, 1990.

GRINDEM, C. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; PERKINS, P. C.; CULLINS, L. D.; THOMAS, T. J.; HEGARTY, B. C. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine rocky mountain spotted fever and ehrlichiosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 1, p. 56-61, 1999.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

GUIMARÃES, J. E. **Avaliação da ferritina sérica e de outros parâmetros relativos ao metabolismo do ferro, na anemia do processo inflamatório de cães induzido por adjuvante de Freund**. 1998. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HARA, T.; ANDO, K.; TSURUMI, H.; MORIWAKI, H. Excessive production of tumor necrosis factor-alpha by bone marrow T lymphocytes is essential in causing bone marrow failure in patients with aplastic anemia. **European Journal of Haematology**, v. 73, n. 1, p. 10-16, 2004.

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.; DAY, M. J.; WANER, T.; BARK, H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 343-349, 2001.

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, n. 14, 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, 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.; AVIDAS, Y.; BOGIN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 66, n. 3/4, p. 241-249, 1996a.

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.; WANER, T.; ELDOR, A.; ZWANG, E.; BARK, H. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **The Veterinary Record**, v. 139, n. 12, p. 290-293, 1996b.

HARRUS, S.; WANER, T.; FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; FISHMAN Z.; BARK, H.; HARMELIN, A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 3/4, p. 239-243, 2003.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 15-27, 1998c.

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

HARVEY, J.W. **Atlas of veterinary hematology – blood and bone marrow of domestic animals**. 1. ed. Philadelphia:W.B. Saunders, 2001. 228 p.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia - like agent in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

HILDEBRANDT, P. K.; HUXSOLL, D. L.; WALKER, J. S.; NIMS, R. M.; TAYLOR, R.; ANDREWS, M. Pathology of canine ehrlichiosis (Tropical canine pancytopenia). **American Journal Veterinary Research**, v. 34, n. 10, p. 1309-1320, 1973.

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.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 281-287, 1994.

ISMAIL, N.; SOONG, L.; McBRIDE, J. W.; VALBUENA, G.; OLANO, J. P.; FENG, H. M.; WALKER, D. H. Overproduction of TNF-alpha by CD8+ type 1 cells and down-regulation of IFN-gamma production by CD4+ Th1 cells contribute to toxic shock-like syndrome in an animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1786-1800, 2004.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221 p.

JAIN, N. C.; DHAWEDKAR, R. G.; VEGAD, J. L.; KONO, C. S. Detection of antiplatelet antibody: comparison of platelet immunofluorescence, agglutination, and immunoinjury tests using rabbit antiequine platelet serum. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 20, n. 1, p. 23-23, 1991.

JOSHI, B. C.; JAIN, N. C. Detection of antiplatelet antibody in serum and megakaryocytes of dogs with autoimmune thrombocytopenia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 6, p. 681-685, 1976.

KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A.; MAHAN, S. M.; SEMU, S.; PETER, T.; MASON, P. R. BROUQUI, P. RAOULT, D. Serological evidence for antigenic relationships between *Ehrlichia canis* and *Cowdria ruminantium*. **Research in Veterinary Science**, v. 56, n. 2, p. 170-174, 1994.

KEYSARY, A.; WANER, T.; ROSNER, M.; WARNER, C. K.; DAWSON, J. E.; ZASS, R.; BIGGIE, K. L.; HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 331-340, 1996

KRISTENSEN, A. T.; WEISS, D. J.; KLAUSNER, J. S.; LABER, J.; CHRISTIE, D.J. Comparison of microscopic and flow cytometric detection of platelet antibody in dogs suspected of having immune-mediated thrombocytopenia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 8, p. 1111-1114, 1994b.

KRISTENSEN, A. T.; WEISS, D. J.; KLAUSNER, J. S.; LABER, J.; CHRISTIE, D. J. Detection of antiplatelet antibody with a platelet immunofluorescence assay. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, n. 1, p. 36-39, 1994a.

KUEHN, N. F.; GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 4, p. 355-358, 1985.

LEWIS, D. C.; MEYERS, K. M.; CALLAN, B.; BÜCHELER, J.; GIGER, U. Detection of platelet-bound and serum platelet-bindable antibodies for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 1, p. 47-52, 1995.

LEWIS JR., G. E.; RISTIC, M.; SMITH, R. D.; LINCOLN, T.; STEPHENSON, E. H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 12, p. 1953-1955, 1977.

LITTELL, R. C.; HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 4, p. 1216-1231, 1998.

LOVERING, S. L.; PIERCE, K. R.; ADAMS, L. G. Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 8, p. 1266-1271, 1980.

LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004. Suplemento 1.

MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; FREIRE, I. M. A.; CERQUEIRA, A. M. F.; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. O.; ALMOSNY, N. R. F. Comparação entre dois métodos de diagnóstico de infecções por *Ehrlichia* spp em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 355, 2004. Suplemento 1. Resumo.

MAEDA, K.; MARKOWITZ, N.; HAWLEY, R. C.; RISTIC, M.; COX, D.; McDADE, J. E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **The New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 4, p. 853-856, 1987.

McBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; BOUDREAUX, C; GUEDRY, T.; WALKER, D.H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2516-2524, 2003.

MEINKOTH, J. H.; EWING, S. A.; COWELL, R. L.; DAWSON, J. E.; WARNER, C. K.; MATHEW, J. S.; BOWLES, M.; THIESSEN, A. E.; PANCIERA, R. J.; FOX, C. Morphologic and molecular evidence of a dual species ehrlichial infection in a dog presenting with inflammatory central nervous system disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 5, p. 389-393, 1998.

MEINKOTH, J. H.; HOOVER, J. P.; COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; LINK, J. Ehrlichiosis in a dog with seizures and nonregenerative anemia. **Journal of American Medical Association**, v. 195, n. 12, p. 1754-1755, 1989.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 2/3, p. 197-204, 2003.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; BILLINS, C. D.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V. S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 3, p. 174-184, 2004.

NEER, T. M. Ehrlichiosis: Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998, p. 139-147.

NEER, T. M. *Ehrlichia canis*: a clinical approach to diagnosis and treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, n. 1(A), p. 15-18, 2002.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, C. A.; STEPHENSON, E. H. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 250-254, 1980.

OLSEN, L. H.; KRISTENSEN, A. T.; HÄGGSTROM, J.; JENSEN, A. L.; KLITGAARD, B.; HANSSON, H.; PEDERSEN, H. D. Increased platelet aggregation response in Cavalier King Charles Spaniels with mitral valve prolapse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 209-216, 2001.

ORIÁ, A. P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (reação de imunofluorescência indireta e dot-blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis***. 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

PERILLE, A. L.; MATUS, R. E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 3, p. 195-198, 1991.

PIERCE, K. R.; MARRS, G. E.; HIGHTOWER, D. Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 11, p. 1821-1825, 1977.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis. **Veterinary Pathology**, v. 18, p. 48-61, 1981.

RIKIHISA, Y.; YAMAMOTO, S.; KWAK, I.; IQBAL, Z.; KOCIBA, G.; MOTT, J.; CHICHANASIRIWITHAYA, W. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 912-917, 1994.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; WEISIGER, R. M.; HILDEBRANDT, P. K.; NYINDO, M. B. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 1972.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SCHAIBLE, U. E.; COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. E. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. **Advances in Immunology**, v. 71, p. 267-377, 1999.

SCHERMERHORN, T.; BARR, S.C.; STOFFREGEN, D. A.; KOREN-ROTH, Y. Whole-blood platelet aggregation, buccal mucosa bleeding time, and serum cephalotin concentration in dogs receiving a presurgical antibiotic protocol. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 1602-1607, 1994.

SHIMADA, T.; ISHIDA, Y.; SHIMIZU, M.; NOMURA, M.; KAWATO, K.; IGUCHI, K.; JINBO, T. Monitoring C-reactive protein in beagles dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Research Communications**, v. 26, n. 3, p. 171-177, 2002.

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

SMITH, J. E. Iron metabolism and its diseases. In: KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1989, p. 256-273.

STILES, J. Canine rickettsial infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1135-1149, 2000.

SWANGO, L. J.; BANKEMPER, K. W.; KONG, L. I. Bacterial, rickettsial, protozoal, and miscellaneous infections. In: ETTINGER, S. J. **Textbook of veterinary internal medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p. 265-297.

TALKE, H.; SCHUBERT, G. E. Enzymatische harnstoffbestimmung in blut und serum in optischen test nach warburb. **Klinische Wochenschrift**, v. 43, p. 174-175, 1965.

THILAGAR, S.; BASHEER, A. M.; DHANAPALAN, P. An unusual case of ehrlichiosis associated with polyarthritis in a dog. **Indian Veterinary Journal**, v. 67, p. 267-268, 1990.

THOMAS, J. S.; ROGERS, K. S. Platelet aggregation and adenosine triphosphate secretion in dogs with untreated multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 319-322, 1999.

TVEDTEN, H.; WEISS, D. Erythrocyte disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. p. 31-51.

VARELA, F.; FONT, X.; VALLADARES, J. E.; ALBEROLA, J. Thrombocytopathia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 5, p. 309-311, 1997.

VON DEM BORNE, A. E. G.; HELMERHORST, F. M.; VAN LEEUWEN, E. F.; PEGELS, H. G.; VON RIESZ, E.; ENGELFRIET, C. P. Autoimmune thrombocytopenia: Detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test. **British Journal of Haematology**, v. 45, p. 319-327, 1980.

VON DEM BORNE, A. E. G.; VERHEUGT, F. W. A.; OOSTERHOF, F.; VON RIESZ, E.; DE LA RIVIERE, A. B.; ENGELFRIET, C.P. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. **British Journal of Haematology**, v. 39, p. 195-207, 1978.

WADDLE, J. R.; LITTMAN, M. P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 24, n. 6, p. 615-620, 1988.

WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis. In: ANNUAL VETERINARY MEDICAL FORUM, 16., 1998, San Diego. **Proceedings...** San Diego: American College of Veterinary Internal Medicine, 1998. p. 622-625.

WANER, T.; HARRUS, S. Anemia of inflammatory disease. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott 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, n. 3/4, 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 especial emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D. J.; BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, n. 1/2, p. 177-182, 1995.

WANER, T.; KEYSARY, A.; BARK, H.; SHARABANI, E.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis – an overview. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 54, n. 4, p. 103-107, 1999.

WANER, T.; LEYKIN, I.; SHINITSKY, M.; SHARABANI, E.; BUCH, H.; KEYSARY, A.; BARK, H.; HARRUS, S. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, p. 145-150, 2000.

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, n. 3/4, p. 331-335, 1996.

WANG, Z.; GOONEWARDENE, L. A. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1-11, 2004.

WEISIGER, R. M.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 5, p. 689-694, 1975.

WEISS, D. J.; SMITH, S. A. Collection and assessment of canine bone marrow. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, n. 9, p. 670-678, 2002.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; 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.

WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2004. 432 p.

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

WOONG, S. J.; THOMAS, J. A. Cytoplasmic, nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.1959-1963, 1998.