MARCIA YUMIKO HASEGAWA

**DINÂMICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES POR
Ehrlichia canis: ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E
RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR**

São Paulo

2005

MARCIA YUMIKO HASEGAWA

**DINÂMICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES POR
Ehrlichia canis: ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E
RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR**

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:

Profa. Dra. Aguemí Kohayagawa

São Paulo

2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T. 1467 FMVZ	Hasegawa, Marcia Yumiko Dinâmica da infecção experimental de cães por <i>Ehrlichia canis</i>: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular / Marcia Yumiko Hasegawa. – São Paulo : M. Y. Hasegawa, 2005. 134 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: Prof. Dr. Aguiem Kohayagawa. 1. Ehrlichia. 2. Neutrófilos. 3. Linfócitos T. 4. Imunologia. 5. Hematologia. 6. Bioquímica clínica. 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 "Alterações em linfócitos T CD4+ e CD8+, IgM e IgG e o perfil eletroforético das proteínas séricas na infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935)", Protocolo nº 151/2002, sob a responsabilidade da Profª Drª Aguemi Kohayagawa, 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 sendo aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Alterations of the CD4+ and CD8+ T lymphocytes, IgM and IgG and the profile of electrophoretic serum protein in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935)" protocol number 151/2002, under the responsibility of Profª Drª Aguemi Kohayagawa, 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 "ad referendum" meeting.)

São Paulo, 25 de junho de 2002

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HASEGAWA, Marcia Yumiko

Título: Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular.

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: _____

“A humanidade tem uma função essencial no universo – nas esferas macro e micro do grande roteiro e sua realização no tempo. Está surgindo em nós a intuição da integridade e imortalidade do indivíduo. A percepção é finita, mas o conhecimento é infinito. O cérebro é temporal; a mente, eterna. Estar alerta e perceptível é temporal e finito. Compreender e saber são eternos.”

[Buckminster Fuller]

À minha família, pela dedicação e ensinamentos,
sempre presentes nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Aguemi Kohayagawa, pela orientação, amizade, sempre sábios conselhos e incentivo para a realização do curso.

À Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, pela co-orientação, amizade, e valiosa orientação no desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Maria Silvia Furquim de Azevedo Morgulis, pela amizade, auxílio na utilização do citômetro de fluxo e realização da análise estatística.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por permitir o acesso ao citômetro de fluxo.

A Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal, pela doação do inóculo de *Ehrlichia canis* para a realização do experimento.

Aos Pós-Graduandos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela amizade e convivência.

Ao Pós-Graduando Marcelo Zanutto, pela amizade e troca de idéias no momento da padronização da técnica de citometria de fluxo.

Ao Pós-Graduando Leonardo Pinto Brandão, pela amizade e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela atenção e convivência.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela atenção e convivência.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (Biblioteca Virgínia Buff D'Apice), pelo atendimento sempre diligente.

Ao Serviço de Pós-Graduação Geral, pelo atendimento sempre diligente.

À Pós-Graduação do Departamento Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo total apoio institucional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Projeto nº 01/14252-4), pelo auxílio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

HASEGAWA, M. Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular.** [Dynamics of experimental *Ehrlichia canis* infection of dogs: clinical and laboratorial aspects and humoral and cellular immune response]. São Paulo, 2005. 134 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Com o objetivo de avaliar a evolução clínica, a persistência da infecção e a resposta imune humoral e celular, sete cães adultos desprovidos de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* foram inoculados com *E. canis* e acompanhados durante vinte semanas. Três cães permaneceram como controle. Exame físico diário e avaliação laboratorial (hemograma, bioquímica sanguínea, fragilidade osmótica eritrocitária, teste de Coombs, teste de redução de tetrazólio nitroazul), reação em cadeia da polimerase (PCR), pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* (IFI) e quantificação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ por citometria de fluxo foram realizados, em diferentes momentos, durante o período de observação. A infecção foi comprovada pela presença de mórulas em linfócitos/monócitos no sangue circulante, soroconversão, com títulos de anticorpos entre 1.280 a 20.480 e a reação positiva ao PCR. Febre, esplenomegalia, linfadenomegalia, trombocitopenia, anemia não regenerativa, aumento das atividades séricas de ALT, AST e FA, foram as principais alterações clínicas e de patologia clínica observadas, com pico máximo entre 21 e 28 dias. Também nesses momentos foram observados o aumento de linfócitos T CD8⁺ e a diminuição dos linfócitos T CD4⁺. O aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, quando estimulados, entre o 28^o e 35^o dia p.i., o aumento de reticulócitos na circulação sanguínea nessa ocasião, a redução dos linfócitos T CD4⁺ e o aumento de linfócitos T CD8⁺ indicaram a resposta do hospedeiro, na tentativa de eliminar a infecção. No auge da infecção entre o 21^o e 49^o dia p.i., houve a inversão da relação CD4:CD8, principalmente o aumento dos linfócitos T CD8⁺. A fragilidade osmótica

eritrocitária manteve-se inalterada, bem como o teste de Coombs, comprovando não ter ocorrido a hemólise imunomediada. Nos cães infectados não foram detectados a presença de anticorpos IgM anti-*E. canis* em nenhum momento de observação. O aumento de reticulócitos na circulação sanguínea a partir do 28º dia p.i. sugere ser temporária a supressão da atividade eritropoética. O baixo número de linfócitos T CD4+, coincidindo com a esplenomegalia e a PCR positiva até a vigésima semana p.i., sugere a relação entre a persistência da infecção, com a localização esplênica de *E. canis* e ativação de um mecanismo de escape pelo microrganismo, representado pelo baixo limiar de ativação de linfócitos T CD4+. Por outro lado, o aumento de linfócitos T CD8+ no auge da infecção coincidindo com a melhora clínica, sugere o envolvimento do mecanismo de citotoxicidade na patogenia da erliquiose canina. O bloqueio parcial da atividade dos linfócitos T CD4+, constitui-se provavelmente em um dos mecanismos de escape da *E. canis*, enquanto a contínua liberação de TNF- α pelas células citotóxicas, como parte do mecanismo do hospedeiro para a eliminação do parasita pode resultar na pancitopenia terminal observado freqüentemente nos cães cronicamente infectados por *E. canis*.

Palavras-chave: *Ehrlichia*. Neutrófilos. Linfócitos T. Imunologia. Hematologia. Bioquímica clínica.

ABSTRACT

HASEGAWA, M. Y. **Dynamics of experimental *Ehrlichia canis* infection of dogs: clinical and laboratorial aspects and humoral and cellular immune response.** [Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular]. São Paulo, 2005. 134 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The clinical evolution, the persistence of infection and humoral and cellular immune response were evaluated on seven adult naïve dogs experimentally inoculated with an *E. canis* strain and followed during 20 weeks. Three dogs were remained as control. Daily clinical evaluation and laboratorial exams (hematological, biochemistry, erythrocyte osmotic fragility, Coombs' test, neutrophils oxidative metabolism by nitroblue tetrazolium reduction test), polymerase chain reaction assay (PCR), anti-*E. canis* antibodies detection by indirect immunofluorescence assay (IFA) and quantification of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by flow cytometry technique were evaluated, at different moments during all the experimental period. The presence of *E. canis* morulae, seroconversion with high antibodies titers (1,280 to 20,480) and positive PCR had confirmed the infection in all the inoculated animals. 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 changes observed, with the highest point between days 21 and 28 post-infection (p.i.). Also at these moments were observed increase of CD8⁺ T lymphocytes and reduction of the CD4⁺ T lymphocytes. The increase in the stimulated neutrophils oxidative metabolism between days 28 and 35 p.i., and the increase of reticulocytes in the same period, allied to the reduction of the CD4⁺ T lymphocytes and the increase of CD8⁺ T lymphocytes, indicated the host's immune response in the attempt to eliminate the infection. On the peak of the infection, from the 21st to the 49th post-infection day, there was an inversion in the CD4:CD8 ratio of

blood lymphocytes, mainly caused by increase of the CD8⁺ T lymphocytes. There was no variation on erythrocyte osmotic fragility and Coombs' test results, which suggested the absence of immune-mediated hemolysis. It wasn't detected any anti-*E. canis* IgM antibodies in the infected group of dogs. The increase of reticulocytes only from the 28th post-infection day suggests a temporary erythropoietic suppression. The low number of CD4⁺ T lymphocytes, coinciding with the splenomegaly and the positive PCR until the twentieth week p.i., suggest that there is a relation between the persistent infection, the splenic localization of *E. canis* and an evasion mechanism, represented for the low threshold of activation of CD4⁺ T lymphocytes. On the other hand, the increase of CD8⁺ T lymphocytes in the peak of infection, coinciding with clinical improvement, suggests the involvement of the cytotoxicity mechanism on canine ehrlichiosis pathogenesis. The partial blockage of CD4⁺ T lymphocytes activity could probably be one of the *E. canis* escape mechanisms, while the continue TNF- α release by host's cytotoxic cells, as a mechanism to eliminate the parasite, could result in terminal pancytopenia commonly observed in dogs chronically infected with *E. canis*.

Key words: *Ehrlichia*. Neutrophils. T Lymphocytes. Immunology. Hematology. Clinical Biochemistry.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I.....	15
	INTRODUÇÃO	15
	CAPÍTULO II	21
1	INTRODUÇÃO	21
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1	CÃES.....	26
2.2	INÓCULO.....	26
2.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	27
2.4	DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE <i>E. canis</i> (PCR).....	28
2.5	HEMOGRAMA	28
2.6	TESTE DE COOMBS.....	29
2.7	FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA (FOE)	29
2.8	BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA	29
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3	RESULTADOS.....	31
3.1	ALTERAÇÕES CLÍNICAS	31
3.2	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS	35
3.3	ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS	40
4	DISCUSSÃO	44
	REFERÊNCIAS	50

	CAPÍTULO III.....	58
1	INTRODUÇÃO	58
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1	CÃES.....	61
2.2	INÓCULO.....	61
2.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	62
2.4	DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE <i>E. canis</i> (PCR).....	63
2.5	LEUCOGRAMA.....	63
2.6	TESTE DE REDUÇÃO DO NBT	63
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
3	RESULTADOS.....	65
4	DISCUSSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69
	CAPÍTULO IV	73
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1	CÃES.....	78
2.2	INÓCULO.....	78
2.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	79
2.4	DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE <i>E. canis</i> (PCR).....	80
2.5	CONTAGEM DOS LINFÓCITOS TOTAIS.....	80
2.6	REAÇÃO DE IFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM OU IgG ANTI- <i>E. canis</i>	81
2.7	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS LINFÓCITOS T CD4+ E CD8+	82

2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
3	RESULTADOS	84
3.1	ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS.....	84
3.2	CONTAGEM DE LINFÓCITOS	85
3.3	ANTICORPOS ANTI- <i>E. canis</i>	86
3.4	QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T.....	88
4	DISCUSSÃO	95
	REFERÊNCIAS	101
	LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICE	121

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A erliquiose é uma doença causada por bactérias estritamente intracelulares, gram-negativas, pertencentes à Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae e gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). A erliquiose canina foi diagnosticada pela primeira vez na Argélia em 1935 por Donatien e Lestoquard. Entre 1968 a 1970, aproximadamente 200 a 300 cães militares americanos morreram no Vietnã devido a erliquiose monocítica canina (EMC) (HUXSOLL et al., 1970). Desde então, tornou-se reconhecida mundialmente como uma doença infecciosa importante de cães e outros membros da Família Canidae (cães, coiotes, raposa e chacal) (HARVEY et al., 1979). Outras espécies de *Ehrlichia* podem infectar cães (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998) e humanos (NEER et al., 2002), havendo variações quanto à virulência e 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 sequenciamento do gene 16S rRNA, são reconhecidos três genogrupos distintos: genogrupo da *E. canis* (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, *E. ruminantium*); genogrupo da *Anaplasma phagocytophila* (*A. phagocytophila*, *A. platys*, *A. marginale*); genogrupo do *E. sennetsu* (*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 a *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 trans-estadial, porém não existe a transmissão trans-ovariana (LEWIS JR. et al., 1977). A *E. canis* também pode ser transmitida pela transfusão sanguínea (NEER, 1998), e a infecção pode ocorrer concomitante à 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 com manifestações clínicas inespecíficas na fase aguda (NEER, 1998), assintomática por um longo período de tempo (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989) e na fase crônica, com o desenvolvimento de sintomas de comprometimento sistêmico e pancitopenia (BUHLES; HUXSOLL; HILDEBRANDT, 1975; MYLONAKIS et al., 2004).

A ampla variação do quadro clínico, o longo período de infecção nos portadores crônicos (MYLONAKIS et al., 2004) e a natureza nidícola do *R. sanguineus*, contribuíram para a disseminação da *E. canis*, tornando na atualidade a EMC uma das doenças infecciosas mais diagnosticadas nos países de clima tropical.

A despeito do tratamento e aparente recuperação clínica (BARSTCH; GREENE, 1996), a riquetsia pode permanecer no hospedeiro (HARRUS et al., 1998b) que se torna portador crônico, constituindo-se em fonte de infecção. Cães de qualquer faixa etária podem ser infectados (MYLONAKIS et al., 2004), havendo maior suscetibilidade de algumas raças dos cães (HARRUS et al., 1997; NYINDO et al., 1980; RIKIHISA et al., 1994).

Como em todas as infecções por agentes infecciosos intracelulares, a extinção da infecção está intimamente ligada à imunidade celular, não se minimizando a importância da imunidade humoral (GANTA et al., 2004; WINSLOW et al., 2000). Na EMC há persistência da riquetsia no organismo hospedeiro, a despeito do alto título de anticorpos desenvolvidos (HARRUS et al., 1998b), existindo evidências de que, para a adequada destruição intracelular

do agente infeccioso há necessidade da interação entre a resposta humoral e celular do hospedeiro (KAKOMA et al., 1977; WEISER et al., 1991). Aparentemente, a imunidade protetora na EMC depende da persistência do agente após a fase aguda da infecção (WEISER et al., 1991), o que permite o estímulo antigênico periódico e manutenção de altos títulos de anticorpos circulantes (HARRUS et al., 1998b; PERILLE; MATUS, 1991). Reinfecção pode ser observado em cães (NEER, 2002).

As erlíquias se replicam nos fagossomos das células mononucleares fagocíticas do hospedeiro, propagando-se para o baço, fígado e linfonodos (McDADE, 1990), onde evoluem dos corpúsculos elementares para os iniciais até a formação de mórulas (NYINDO et al., 1971), processo que demanda cerca de sete a 12 dias. A replicação nos órgãos linfóides causa linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular do fígado e baço (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989). As células infectadas são transportadas especialmente ao pulmão, rins e meninges, e aderem ao endotélio vascular, induzindo o aparecimento de vasculite e infecção do tecido subendotelial (SIMPSON, 1974).

A ampla variação dos sintomas observados na fase aguda, como febre, prostração, esplenomegalia (CASTRO et al., 2004; HARRUS et al., 1997), sintomas respiratórios (MYLONAKIS et al., 2004), oculares (HARRUS et al., 1998a), neurológicos (BREITSCHWERDT, 2001; MEINKOTH et al., 1989), musculares (BUORO et al., 1990) e diáteses hemorrágicas (NEER, 1998), e as alterações hematológicas como trombocitopenia e anemias (HUXSOLL et al., 1970; SILVA, 2001) estão relacionadas à distribuição das células infectadas por *E. canis* nos órgãos e tecidos do hospedeiro.

Entre as causas do desenvolvimento da anemia e da trombocitopenia na fase aguda são citadas a esplenomegalia e a produção de fatores esplênicos (HARRUS et al., 1998c), a vasculite (REARDON; PIERCE, 1981), a formação de anticorpos anti-plaquetários e a

supressão medular. Também a pancitopenia terminal é creditada à supressão da atividade medular devido à presença do microrganismo.

Ultrapassada a fase aguda da doença, ocorre aparente recuperação clínica, a infecção se torna assintomática (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989), porém o agente pode manter-se no hospedeiro por um longo período (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986). Esta fase é caracterizada pela persistência da trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, leucopenia variável, anemia e ausência dos sinais clínicos. Os cães imunocompetentes podem eliminar o microrganismo durante esta fase (BREITSCHWERDT, 2002)

O relevante papel da imunidade celular no controle da infecção erliquial vem sendo gradativamente elucidada. A inversão da relação CD4:CD8 no sangue periférico (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; HEEB et al., 2003), extenso infiltrado mononuclear no fígado, pulmão e SNC (CASTRO, 1997), aumento dos linfócitos T CD3 na região medular dos linfonodos e polpa branca esplênica, com predomínio de linfócitos T CD8⁺ nas lesões inflamatórias dos mesmos órgãos (CASTRO et al., 2004). A redução da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II em células dos linfonodos e baço de cães com EMC (CASTRO, 2004), e em células DH82 infectadas (HARRUS et al., 2003) pode representar o mecanismo de evasão do parasita (MACHADO, 2004).

Modelos experimentais em camundongos, utilizando-se uma cepa de *Ehrlichia* isolada do carrapato *Ixodes ovatus* (IOE), há o desenvolvimento de quadro clínico agudo, que se assemelha à infecção humana por *E. chaffeensis* (ISMAIL et al., 2004). Por outro lado à infecção por *E. muris* resulta no desenvolvimento de infecção benigna (KAWAHARA et al., 1999). Nestes experimentos foi demonstrado o aumento de linfócitos T CD8⁺ e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (ISMAIL et al., 2004) e menor produção de interferon gama (IFN- γ), evidenciando-se dessa forma o mecanismo imunopatogênico envolvido no desenvolvimento da doença.

A resposta humoral na fase precoce da infecção por *E. chaffeensis* (WINSLOW et al., 2000) bem como a ativação das células T CD4+, resultam na imunidade do hospedeiro a *E. chaffeensis* (GANTA et al., 2004). A defesa do hospedeiro se baseia nos mecanismos efetores celulares dependentes de células T CD4+, incluindo a produção de óxido nítrico pelos macrófagos ativados pelos IFN- γ e pela inflamação granulomatosa. Portanto, a eliminação completa da *Ehrlichia* requer a presença de células T CD4+ funcionais, e a resposta imune protetora é dependente da secreção de IFN- γ e da resposta celular do tipo Th1 (GANTA et al., 2002). Também na EMC a resposta imune celular na fase aguda parece estar dirigida para um padrão Th1, com aparente imunodepressão dos mecanismos regulatórios associados à resposta Th2 (CASTRO, 2004; MACHADO, 2004).

A fagocitose e atividade microbicida são os mecanismos pelos quais os neutrófilos agem contra os microrganismos em defesa do hospedeiro (EICKHOFF et al., 2004). Bahner e Nathan (1967) utilizaram o teste de redução de tetrazólio nitroazul (NBT) como um teste de triagem para avaliar os efeitos da atividade oxidativa dos neutrófilos e foi utilizado extensivamente para o diagnóstico da doença granulomatosa em humanos (PARK et al., 1969). Nas infecções bacterianas, aparentemente não há alteração da fagocitose ocorrendo, entretanto a diminuição da capacidade de eliminar o microrganismo pela redução da atividade oxidativa dos neutrófilos, que pode ser avaliada por meio da técnica de redução de NBT após a estimulação (BREITSCHWERDT et al., 1987). Na EMC o comprometimento do sistema imune na fase aguda da infecção pode tornar o cão mais suscetível a infecções secundárias (NEER, 1998), e isto pode ocorrer pela diminuição da atividade funcional dos neutrófilos periféricos.

Apesar da magnitude dos conhecimentos gerados pelas recentes pesquisas quanto ao mecanismo imunopatogênico envolvido na EMC, ainda existem muitos aspectos que necessitam ser esclarecidos.

Com o intuito de avaliar a dinâmica da infecção por *E. canis*, sem a interferência de outros agentes infecciosos que, em condições naturais podem ser também transmitidos pelo *R. sanguineus*, cães criados e mantidos em condições controladas, foram infectados por *E. canis*, e acompanhados durante a instalação e declínio da fase aguda da infecção.

Em especial, foram avaliados:

- I. As alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas e a possibilidade do envolvimento da hemólise imunomediada no desenvolvimento da anemia.
- II. A resposta oxidativa dos neutrófilos, “in natura” ou quando estimulados.
- III. A dinâmica da resposta imune humoral e celular, comparada a dos cães.

CAPÍTULO II

ASPECTOS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA ERLIQUIOSE CANINA EXPERIMENTAL

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina (EMC), doença multissistêmica causada por *Ehrlichia canis*, é acompanhada de alterações hematológicas, principalmente trombocitopenia e anemia na fase aguda e pancitopenia, no estágio terminal da doença. Outras espécies de *Ehrlichia*, como a *E. phagocytophila* ou *E. platys*, atualmente classificadas como *Anaplasma phagocytophila* e *Anaplasma platys*, respectivamente (DUMLER et al., 2001), também podem infectar o cão, causando doença nem sempre distinguível da infecção causada por *E. canis* (NEER, 1998). Embora a *E. canis* seja considerada a espécie mais patogênica para o cão (WANER et al., 1995), a infecção é muitas vezes branda (RIKIHISA et al., 1994) ou mesmo assintomática. Existem algumas raças mais suscetíveis, como o Pastor alemão (HARRUS et al., 1997; NYINDO et al., 1980; RIKIHISA et al., 1994). O curso da infecção é longo, podendo o agente persistir por anos no hospedeiro infectado, mesmo após o tratamento e a aparente recuperação do cão. Clinicamente a infecção se caracteriza por apresentar uma fase aguda, de duas a seis semanas de duração (WANER et al., 1999) após a qual há uma melhora gradativa do paciente, com a extinção da infecção. Em muitos casos há a persistência do agente infeccioso nos cães infectados, os quais se tornam portadores crônicos, assintomáticos, por um longo período de tempo, de meses a anos (HARRUS; BARK;

WANER, 1997; WANER et al., 1997). Finalmente, os cães infectados podem desenvolver pancitopenia e outras complicações, que caracterizam a fase crônica da EMC.

Cerca de oito a 20 dias após a transmissão da *E. canis* pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus* (HARRUS; BARK; WANER, 1997), os cães infectados podem apresentar os sintomas clínicos da fase aguda, inespecíficos e de variável intensidade como depressão, letargia, perda de peso, anorexia, febre, linfadenomegalia, esplenomegalia (CASTRO, 1997; HARRUS et al., 1997; WANER et al., 1999). Alterações da hemostasia podem ser observadas, principalmente petéquias e epistaxe, causada pela 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 a trombocitopenia e anemia (HUXSOLL et al., 1970; KUEHN; GAUNT, 1985; SILVA, 2001).

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

A fase crônica da infecção instala-se meses a anos após, devido à incapacidade do sistema imune do hospedeiro em debelar a infecção durante a fase de quiescência da infecção. Fraqueza, depressão, anorexia, perda crônica de peso e emaciação, palidez das mucosas, febre, edema periférico, especialmente dos membros pélvicos, 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, 1999; HARRUS et al., 1999) havendo a diminuição da eritropoese, mielopoese e da trombopoese, e como consequência, leucopenia, trombocitopenia e anemia não regenerativa (ANDEREG; PASSOS, 1999; HUXSOLL et al., 1970). Existem fortes evidências do envolvimento de mecanismo imunopatogênico no desenvolvimento da EMC (BURGHEN et al., 1971; 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 infecção. Embora haja uma correlação entre a infecção erliquial 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 a *Babesia canis* (BRANDÃO; HAGIWARA; MIYASHIRO, 2003) ou *A. platys* (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978).

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; TURNWALD, 1999) como também a 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). Nem sempre essas alterações são observadas (ALMOSNY, 1998). Outras alterações bioquímicas, como as atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) também são encontradas nos casos de infecção natural (KUEHN; GAUNT, 1985) ou experimental (ALMOSNY, 1998).

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 apresentação clínica e o caráter insidioso da doença na fase de latência da infecção dificultam o diagnóstico clínico da doença.

O diagnóstico etiológico da infecção, baseado no encontro de inclusões (mórulas) de *E. canis* em células mononucleares circulantes, embora recomendado por uns (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). 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 propósito de acompanhar a evolução da infecção por *E. canis* na fase aguda da doença até a completa recuperação clínica, cães “naïve” adultos, sem raça definida, foram experimentalmente infectados e os aspectos clínicos e de patologia clínica, principalmente os aspectos hematológicos foram estudados durante dez semanas após a infecção. Em especial, procurou-se avaliar a ocorrência de hemólise imunomediada como um dos mecanismos envolvidos na patogenia da EMC.

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, imunizados contra as principais doenças de cães¹ e vermifugados². A prevenção da infestação por ectoparasitas foi realizada a cada três semanas, com a utilização de fipronil tópico³. A ausência de infecção prévia por *E. canis* foi confirmada por meio de 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 de PCR⁶). Sete animais, escolhidos aleatoriamente (dois machos e cinco fêmeas) constituíram o grupo experimental (I) e os demais três 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^a. 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 de erliquiose canina, em 1993). A amostra de sangue contendo o agente etiológico havia sido

---

¹ Fort Dodge Saúde Animal

² Panacur® cães e gatos (febendazole) – Intervet S.A.

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

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 16° 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, acondicionado em frasco contendo EDTA sódico como anticoagulante. Imediatamente após, cada animal do grupo I foi inoculado com 5 mL dessa amostra de sangue.

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

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, linfonodos, palpação do baço, coloração das mucosas e funções vitais), durante quatro semanas e posteriormente, em intervalos semanais até o 70° dia pós-infecção (p.i.).

As amostras de sangue destinadas à realização do hemograma, contagem de plaquetas e detecção do material genético de *E. canis* (técnica de PCR) foram colhidas mediante venipunção cefálica ou jugular e acondicionadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA-K₃ a 7,5%⁷. As amostras de sangue destinadas ao exame hematológico foram refrigeradas a 4°C até o momento da realização da prova, no máximo por seis horas. Parte da amostra sangüínea (5mL) foi acondicionada em tubos de vidro siliconizados, contendo gel ativador de coágulo⁷. 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 e sorológicas. A pesquisa de inclusões (mórulas) de *E. canis* foi realizada em amostras de

---

⁷ Vacutainer® Becton Dickinson, USA

sangue venoso e de sangue capilar obtidas do pavilhão auricular até a décima semana p.i. (70º dia).

Os esfregaços de sangue foram preparados a fresco, imediatamente após a colheita, secos ao ar livre e corados com o corante de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

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 sódico a 7,5 %, acondicionadas adequadamente e enviadas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, onde foram processadas, segundo a técnica descrita por Bulla (2003).

2.5 HEMOGRAMA

A contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas, a determinação do volume globular (hematócrito) e da concentração de hemoglobina foram realizadas em analisador automatizado⁸. Os esfregaços sangüíneos preparados no momento da colheita e destinados à contagem diferencial de leucócitos foram corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982) e examinados em microscópio óptico, com objetiva de imersão (100x). A contagem de reticulócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos confeccionados após a incubação de 20µL de sangue total com igual volume de corante Novo Azul de Metileno (FERNANDEZ; GRINDEM, 2000) e corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982), por 20 minutos. O

---

⁸ ABC^{TM}VET, ABX®S, França

resultado foi expresso em porcentual de reticulócitos em relação ao número de hemácias maduras, corrigidas pela fórmula sugerida por Tvedten e Weiss (1999).

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

2.6 TESTE DE COOMBS

Executado em quatro momentos, nos dias 14, 28, 42 e 56 p.i, em todos os cães, inoculados e controles. Foram utilizados reagentes comerciais (Canine Coombs' Reagent – goat origin anti-canine IgG, IgM e C3⁹) de acordo com as recomendações expressas pelo produtor.

2.7 FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA (FOE)

Realizada no dia 0 (zero) e nos dias 14, 21, 28 e 35 p.i.. 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 mensura a estabilidade dos eritrócitos em solução de cloreto de sódio em concentrações que variam de 0,85 a 0%.

2.8 BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA

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 albumina sérica foram determinadas

---

⁹ VMRD, Inc. cat. 392-5

utilizando-se o método de biureto e de verde bromocresol, respectivamente. Para a determinação da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamyltransferase (GGT) foram utilizados kits comerciais (Biosystems® – Reagents & Instruments). Todas as determinações foram efetuadas no analisador bioquímico automático LIASYS® (AMS – Analyser Medical System, Roma, Itália).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com a finalidade de verificar se os dados obtidos nos cães de ambos os grupos 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). Os valores de hemoglobina, hematócrito e hemácias, bem como as atividades séricas de ALT, AST e FA 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 utilizado 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 clínicos observados em todos os cães inoculados (Quadro 1). Febre oscilando entre 39.8°C a 41.7°C, foi observada a partir do nono dia pós-infecção (p.i.), precedendo 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 na Figura 1. Pico febril foi observado esporadicamente em um ou outro cão e no cão 7, foi observada febre de 41.5°C precedendo o óbito do animal.

As mórulas de *E. canis* no sangue periférico (Figura 2) foram observadas em todos os cães infectados, a partir do 12º dia p.i., de forma intermitente e durante aproximadamente 12 dias. A parasitemia foi observada mais tardiamente em um cão, no 28º dia p.i. e persistiu até o 42º dia, 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 3).

Mucosas congestas foram os sintomas iniciais observados em cinco cães, coincidindo com o surgimento da febre. A secreção ocular também foi observada já no 12º dia p.i., porém a persistência desse sintoma ocorreu no cão 7 apenas, no qual houve posteriormente o desenvolvimento de uveíte. Também nesse cão é que se observou o único episódio de epistaxe e de edema de membros pélvicos e da cauda (Figura 4). 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 infecção havia se instalado mais tardiamente. A

palidez das mucosas foi observada a partir da terceira semana de infecção e se prolongou até a oitava semana p.i..

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

A esplenomegalia e a reação positiva a 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										
	9	12	14	21	28	35	42	49	*56	63	70
Febre	6	7	7	3	1	1	1	1	0	0	0
Esplenomegalia	4	6	7	7	7	7	7	7	6	6	6
Linfadenomegalia	0	3	5	7	6	5	0	0	0	0	0
Prostração	1	5	1	2	1	1	0	0	0	0	0
Mucosas congestas	5	0	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	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mórulas	0	2	5	4	3	0	1	0	...	...	...
PCR	0	...	7	7	7	...	7	...	4	...	5

* óbito do cão 7 no 50º dia pós-infecção

... – 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

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

Figura 2 – Monócito de cão contendo em seu interior mórula de *E. canis*. Esfregaço de sangue capilar corado pelo método de Rosenfeld. Aumento (100x). São Paulo, 2005

Figura 3 – Amplificação de 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

Figura 4 – Cão infectado com *E. canis* apresentando opacidade da córnea (A), edema de membro e cauda (B) no 49º dia pós-infecção. São Paulo, 2005

3.2 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Trombocitopenia evidente (< 100.000 plaquetas / μL) foi observada a partir do 12º dia p.i., e se manteve até o 28º dia p.i., a partir do qual retornou gradualmente aos valores basais. Apenas no animal em que ocorreu o desfecho fatal houve a persistência da trombocitopenia, alcançando os menores valores na terceira semana p.i., (23×10^3 plaquetas / μL), ocasião em que ocorreu epistaxe. Na Figura 5 está apresentado a mediana, a média, o primeiro e o terceiro quartis do número de plaquetas nos cães infectados, durante as dez semanas de observação.

Houve variação quantitativa dos leucócitos totais, devido principalmente à linfopenia. A leucopenia não foi confirmada estatisticamente, entretanto, alguns animais apresentaram diminuição considerável do número de leucócitos circulantes, e no caso do animal em que se observou o óbito, a queda gradual do número de leucócitos foi um sinal de mau prognóstico. Houve também uma ampla variação no número absoluto de linfócitos entre os cães do grupo I, em diferentes momentos. A linfopenia foi significativa apenas na segunda semana p.i.. Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os valores individuais do número de leucócitos totais e do número absoluto 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. (T7), tendo atingido valores mínimos entre o 21º e 28º dia ($p < 0,05$), período em que a palidez das mucosas foi clinicamente evidenciada e retornando gradativamente aos patamares iniciais (Figuras 6, 7 e 8 – He, Ht e Hb). A resposta eritropoética medular foi comprovada pelo aumento dos reticulócitos na circulação sangüínea a partir do 28º dia até o 49º dia p.i. (Figura 9).

Em nenhum dos momentos avaliados, houve alteração na FOE dos cães infectados ou reação positiva ao teste de Coombs.

$p < 0,05$

$T_0 > T_{14}; T_{21}; T_{28}$

$T_7 > T_{14}$

$T_{56} > T_{14}$

$T_{70} > T_{14}$

Figura 5 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) do número de plaquetas $\times 10^3 / \mu\text{L}$ antes (T0) e após infecção (T7 a T70) de cães (n=6) por *E. canis*. São Paulo, 2005

Tabela 1 – Valores absolutos de leucócitos/ μL dos cães antes e após infecção por *E. canis* (I) e dos cães do grupo controle (C). São Paulo, 2005

CÃO	Número total de leucócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$									
	Dias									
	0	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I 1	8,1	4,2	9,2	9,7	10,3	6,9	6,2	6,5	7,9	7,1
I 2	8,5	4,3	6,9	7,4	6,6	4,1	4,1	5,9	3,7	3,9
I 3	7,4	5,1	7,2	7,3	8,0	7,4	7,6	6,0	4,6	7,1
I 4	12,2	5,3	9,1	11,5	10,4	8,6	7,0	6,0	4,7	5,8
I 5	6,4	3,7	8,0	9,0	13,3	12,2	7,7	5,2	5,2	4,3
I 6	7,3	3,7	5,1	6,5	6,3	6,6	5,6	9,5	4,5	4,4
I 7	8,1	4,7	6,7	6,3	3,9	7,1	3,5	0,4	**	**
C 1	7,9	7,3	8,0	7,9	7,2	7,4	6,3	7,1	5,6	7,4
C 2	7,0	8,1	7,8	5,2	5,9	6,1	4,4	6,5	5,6	6,0
C 3	7,8	7,7	10,5	8,1	10,2	6,4	6,9	11,2	7,3	8,6

** óbito

Tabela 2 – Valores absolutos de linfócitos/ μL dos cães antes e após infecção por *E. canis* (I) e dos cães do grupo controle (C). São Paulo, 2005

CÃO	Número absoluto de linfócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$									
	Dias									
	0	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I 1	2,1	0,5	1,4	3,0	1,7	2,0	1,4	2,5	2,6	2,4
I 2	1,5	1,0	1,7	2,1	0,7	0,5	1,2	1,0	1,1	1,1
I 3	2,2	0,6	1,2	1,1	0,6	0,5	0,4	0,3	0,8	0,4
I 4	2,1	1,5	3,2	4,0	1,1	1,4	1,0	0,5	0,5	0,3
I 5	2,2	2,2	2,8	6,4	5,0	2,6	1,7	1,9	1,4	2,5
I 6	1,1	0,4	0,5	0,8	1,0	1,7	2,7	0,8	0,6	0,7
I 7	1,6	0,7	1,9	0,6	0,9	0,2	**	**	**	**
C 1	2,5	2,6	1,6	2,7	2,9	2,0	2,0	1,8	3,2	2,8
C 2	2,6	3,0	2,0	2,5	1,6	1,6	1,9	2,1	2,3	2,7
C 3	2,6	1,9	3,0	2,5	1,9	2,2	2,2	2,4	2,1	1,9

** óbito

$p < 0,05$

$T_0 > T_{21}; T_{28}; T_{35}; T_{42}$

$T_7 > T_{21}$

$T_{70} > T_{28}; T_{35}$

Figura 6 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) do número de hemácias $\times 10^6 / \mu\text{L}$ antes (T_0) e após infecção (T_7 a T_{70}) de cães ($n=6$) por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

$T_0 > T_{14}; T_{21}; T_{28}; T_{35}; T_{42}$ $T_7 > T_{21}$ $T_{63} > T_{21}$

Figura 7 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) do hematócrito (%) antes (T0) e após infecção (T7 a T70) de cães (n=6) por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

$T_0 > T_{14}; T_{21}; T_{28}; T_{35}; T_{42}$ $T_7 > T_{21}$ $T_{63} > T_{21}$

Figura 8 – Representação dos valores da mediana (linha em cor preta), média (linha em cor vermelha), percentis de 25 e 75 % (delimitação do quadrilátero) da concentração de hemoglobina (g/dL) antes (T0) e após infecção (T7 a T70) de cães (n=6) por *E. canis*. São Paulo, 2005

Figura 9 – Percentual de reticulócitos no sangue periférico de cães (n=7) antes e após a infecção por *E. canis*. 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 precoce foi observada em relação a AST, no 14º dia p.i. ($p < 0,05$) e persistiu até o 28º dia p.i. ($p < 0,05$), período após o qual houve a normalização da atividade sérica da enzima (Figura 10). Em relação a ALT, (Figura 11) o aumento ocorreu de forma evidente ($p < 0,05$) a partir do dia 21 p.i. (T21) persistindo ainda no dia 28 p.i. (T28) tendo retornado a valores basais, com exceção de um animal, no 42º dia p.i. (T42). O perfil de aumento da atividade sérica de FA (Figura 12) também foi semelhante a da ALT, sendo o aumento significativo a partir do 14º dia p.i. (T14) e tendo persistido até o 42º dia p.i. (T42).

Em relação às proteínas séricas totais, ocorreram variações, porém sem significância (Figura 13) o mesmo tendo ocorrido com as variáveis uréia e creatinina sanguíneas. Houve uma discreta diminuição da albumina apenas no 21º dia p.i. ($p < 0,05$) como pode ser evidenciado na Figura 14, inversamente ao que ocorreu com as globulinas, que se encontravam aumentadas nessa ocasião (Figura 15).

$p < 0,05$

$T_{14} > T_0$ $T_{21} > T_0; T_{42}; T_{49}$ $T_{28} > T_0$

Figura 10 – 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) de cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

$T_{21} > T_0$ $T_{28} > T_0$

Figura 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 ALT (U/L) antes (T0) e após infecção (T14 a T49) de cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

$T_{21} > T_0$

$T_{28} > T_0$

$T_{42} > T_0$

Figura 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 de fosfatase alcalina (U/L) antes (T0) e após infecção (T14 a T49) de cães (n=7) por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

$T_{42} > T_{21}$

$T_{70} > T_{21}$

Figura 13 – 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) de cães (n=6) por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

$T_0 > T_{21}; T_{28}$

$T_{56} > T_{21}$

$T_{70} > T_{21}$

Figura 14 – 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) de cães (n=6) por *E. canis*. São Paulo, 2005

$p < 0,05$

$T_{21} > T_0$

$T_{28} > T_0$

$T_{42} > T_0$

$T_{49} > T_0$

Figura 15 – 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) de cães (n=6) 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 alta, 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 pós-infecção, 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), 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 uma forma homogênea, com o pico da infecção ao redor da terceira semana pós-infecção como é citado por Castro et al. (2004) e Rikihisa et al. (1994). Concomitantemente, ao auge da infecção e das manifestações clínicas, foram observadas as alterações hematológicas e bioquímicas. Extensos infiltrados mononucleares em órgãos viscerais (CASTRO, 1997; ELLET; PLAYTER; PIERCE, 1973; HILDEBRANDT et al., 1973; ORIÁ, 2001; SILVA, 2001), olho (ELLET; PLAYTER; PIERCE, 1973; ORIÁ, 2001) e na medula óssea (SILVA, 2001) evidenciam 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 das enzimas citosólicas hepáticas (ALT e AST), como também da aparente supressão da atividade eritropoética medular (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 ; excessiva produção de TNF- α e menor produção de IFN- γ resulta 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 conseqüência 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 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 indicador clínico da manutenção da infecção (HARRUS et al., 1998b). A pesquisa de material genético de *E. canis* por PCR e a persistência de altos títulos de anticorpos permitiram confirmar essa hipótese.

O baço tem um papel fundamental na patogênese da EMC (HARRUS et al., 1998c) e se constitui no órgão que alberga o parasita durante a fase assintomática e o último órgão a acomodar a *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 mecanismo 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 na PCR em um cão, na décima semana pós-infecção, a esplenomegalia ainda evidente sugeriu a possibilidade da persistência da infecção, o que foi comprovado em alguns momentos nos 138 dias subseqüentes.

A aderência das células infectadas aos capilares e sua migração pelo endotélio vascular (HIBLER; HOSKINS; GREENE, 1986), pode estar envolvida na gênese da

trombocitopenia, observada simultaneamente ao aparecimento dos sintomas gerais, antes mesmo da soroconversão e detecção de anticorpos circulantes. Os valores mais baixos foram observados entre o 14º e 28º dia coincidindo com o acme da infecção. O rápido retorno aos valores iniciais, quando o título de anticorpos ainda se encontrava baixo pelo menos na fase aguda, sugere não haver o envolvimento de mecanismo imune na gênese da trombocitopenia, como é citada por Grindem et al. (1999), Waner et al. (1995) e Waner et al. (1999).

Apesar da evidente trombocitopenia, apenas dois animais apresentaram diátese hemorrágica. De acordo com Willard, Tvedten e Turnwald (1999) somente quando a plaquetopenia alcança patamares extremamente baixos, (inferior a 20.000 plaquetas / μ L) é que ocorrem sintomas como petéquia, ecnose e epistaxe. Alguns cães não apresentam alterações hemostáticas mesmo com 10.000 plaquetas / μ L enquanto outros podem sangrar com 40 a 50.000 plaquetas / μ L. Alterações funcionais das plaquetas (HARRUS et al., 1996b) podem, muitas vezes, ser responsáveis ou associadas a alterações quantitativas, induzir o aparecimento de hemorragias.

Testes de auto-aglutinação e de antiglobulina positivas, e a hipergamaglobulinemia (HARRUS et al., 2001; WOODY; HOSKINS, 1991) que persistem por todos os estágios da doença, dão suporte à teoria de que a doença possa ter um componente imunopatológico. Da mesma forma, também pode ocorrer o envolvimento de mecanismo imune no desenvolvimento da anemia. Entretanto, a fragilidade osmótica eritrocitária que se manteve inalterada em todos os cães infectados, no decorrer da fase aguda da infecção, bem como os testes de Coombs negativos em todos os momentos estudados, indicaram que, pelo menos nesses animais, não houve 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 gradual da anemia, sem o aumento de reticulócitos na circulação sangüínea e o retorno também gradual aos patamares iniciais, sugere a existência de um mecanismo de supressão temporária da atividade eritropoética medular, como citado por Buhles Jr., Huxsoll e Hildebrandt (1975). Essa atividade foi restaurada ao mesmo tempo em que ocorria 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 havendo a produção de fator esplênico, o qual seria responsável pela supressão medular. Entretanto, a resolução da anemia, apesar da persistência da esplenomegalia, sugere o envolvimento de outros fatores na gênese da anemia.

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 a ligação do ferro à ferritina, o que resulta também na diminuição da disponibilidade de ferro 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 ser de caráter não regenerativo e pode se instalar rapidamente, com a 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* em que a queda do hematócrito já havia sido observado no sétimo dia p.i..

Citocinas liberadas durante o processo inflamatório, como IL-1 α e TNF- α podem suprimir a atividade eritropoética (WANER; HARRUS, 2000). Nos processos inflamatórios agudos, há um aumento da concentração sérica de ferritina (SMITH, 1989), também observada por Guimarães (1998), já a partir de dois dias após a aplicação intramuscular de

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 eritropoese. A supressão da atividade eritropoética pode justificar a anemia periférica apesar da aparente celularidade da medula óssea (SILVA, 2001).

Havendo a supressão temporária da eritropoese, a hemólise imunomediada, que porventura possa ocorrer (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; SILVA, 2001) não seria reconhecida pelo seu usual caráter regenerativo (JAIN, 1986) mantendo-se a característica não regenerativa da anemia. Somente os testes imunológicos ou o teste de 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 da *E. canis* pode manter ativada, embora em patamares mais baixos, os mecanismos de defesa do hospedeiro, inclusive o da indisponibilização de ferro para a multiplicação do parasita, o que ao longo do tempo pode resultar na gradual diminuição não apenas da eritropoese. Da mesma forma, toda a atividade hematopoética medular pode ser comprometida sob o efeito de TNF- α (HARA et al., 2004) resultando-se assim a pancitopenia terminal.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

---

* De acordo com a NBR 6023

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. Polymiositis 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 MOSHKOVKI 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 polyarthritis in three dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 8, p. 1093-1095, 1998.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

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.

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.

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.

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.

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.

HIBLER, S. C.; HOSKINS, J. D.; GREENE, C. E. Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 8, n. 2, p. 106-114, 1986.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

SHIMADA, T.; ISHIDA, Y.; SHIMIZU, M.; NOMURA, M.; KAWATO, K.; IGUCHI, K.; JINBO, T. Monitoring C-reactive protein in beagle 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.

TALKE, H.; SCHUBERT, G. E. Enzymatische harnstoffbestimmung in blut und serum in optischen test nach warburg. **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.

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.

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.; 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.

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.; TURNWALD, G. H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. 395 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.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS EM CÃES INFECTADOS POR *Ehrlichia canis*

1 INTRODUÇÃO

A *Ehrlichia canis* é uma riquetsia intracelular obrigatória das células mononucleares (linfócitos e monócitos) de cães, sendo considerada a espécie mais patogênica para o hospedeiro (HARRUS et al., 1999). É transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (GROVES et al., 1975), embora Johnson et al. (1998) demonstraram experimentalmente que o carrapato *Dermacentor variabilis* também pode transmitir o parasita.

A hepatoesplenomegalia é um achado comum da fase aguda (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989). Ultrapassada a fase aguda da doença, de cerca de quatro semanas de duração, a infecção se torna assintomática, e o agente pode se manter no organismo do hospedeiro por longo período de tempo (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986). Finalmente, a pancitopenia, que se instala em consequência do comprometimento medular, pode conduzir ao desfecho fatal (TROY; FORRESTER, 1990).

Existem evidências que sugerem o envolvimento do mecanismo imunológico da patogênese da doença. Extenso infiltrado plasmocítico é observado no pulmão, rins, baço, meninge e olhos (CASTRO et al., 2004; HILDEBRANDT et al., 1973). Testes de auto-aglutinação e de antiglobulina positivas, e a hipergamaglobulinemia (HARRUS et al., 2001; WOODY; HOSKINS, 1991) que persistem por todos os estágios da doença, dão suporte à teoria de que a doença possa ter um componente imunopatológico (WANER et al., 1995;

WANER et al., 2001). A resposta humoral não parece representar um papel importante na proteção contra *E. canis*, e tem sido proposto em contribuir na patogênese da doença (CASTRO et al., 2004; RISTIC; HOLLAND, 1993). Apesar da resposta humoral, a riquetsia sobrevive nas células mononucleares infectadas (HARRUS et al., 1999). Assim, a *E. canis* pode ser isolada (NYINDO et al., 1971) ou identificada por técnicas de biologia molecular (PCR) em cães com altos títulos de anticorpos (WEN et al., 1997). É proposto que a imunidade de proteção da erliquiose monocítica canina (EMC) é mediada primariamente pela resposta imune celular do que pela resposta humoral (RISTIC; HOLLAND, 1993).

O papel do baço na manutenção da infecção tem sido investigado extensivamente, principalmente na patogênese da doença imunomediada (LEWIS; MEYERS, 1996), e na EMC (HARRUS et al., 1998a).

Embora a patogênese da fase aguda da EMC esteja parcialmente esclarecida, pouco é conhecido a respeito da função dos neutrófilos durante o curso da doença. De um modo geral, nas infecções de cães, virais ou por protozoários, a atividade fagocítica dos neutrófilos não se encontra alterada (BRANDONISIO et al., 1996; MURATA et al., 1994; POLI; NICOLETTI; FARAVELLI, 1973). A quimiotaxia, a fagocitose e a atividade microbicida são os mecanismos pelos quais os neutrófilos agem contra os microrganismos em defesa do hospedeiro. Os métodos de Boyden e Boyden's modificado, quimiotaxia dos leucócitos sob agarose, análise fagocítica de leucócitos aderidos à placa de vidro ou em suspensão, corado com laranja de acridina são usados para a avaliação das funções dos neutrófilos (CHAMMAS; HAGIWARA, 1998). Testes indiretos que mensuram metabólitos de oxigênio produzidos durante a fagocitose foram utilizados, tais como teste de redução de tetrazólio nitroazul (NBT) e quimiluminescência (BREITSCHWERDT et al., 1987; NAGAHATA et al., 1991).

O teste de redução de NBT é o teste mais simples para se avaliar a capacidade funcional dos neutrófilos e foi utilizado extensivamente em humanos para o diagnóstico da

doença granulomatosa crônica (PARK et al., 1969). Também, o teste permite a determinação da fagocitose e da atividade metabólica dos neutrófilos em cães (NAGAHATA et al., 1991; STICKLE, 1996). Em cães saudáveis cerca de 2 a 14% dos neutrófilos podem apresentar reação positiva (POLI; NICOLETTI; FARAVELLI, 1973). Quando estimulados, o percentual de neutrófilos que apresenta atividade oxidativa pode ser maior (BREITSCHWERDT et al., 1987).

Na EMC o comprometimento do sistema imune na fase aguda da infecção pode tornar o cão mais suscetível a infecções secundárias (NEER, 1998), e isto pode ocorrer pela diminuição da atividade funcional dos neutrófilos periféricos. Brandonisio et al. (1996) observaram que a produção do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio pelas células polimorfonucleares (PMN) foi significativamente mais baixo em cães infectados por *Leishmania*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos circulantes em cães, a fim de investigar o papel das células PMN durante a fase aguda da infecção.

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, imunizados contra as principais doenças de cães⁹ e vermifugados¹⁰. A prevenção da infestação por ectoparasitas foi realizada a cada três semanas, com a utilização de fipronil tópico¹¹. A ausência de infecção prévia por *E. canis* foi confirmada por meio de pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* (Dotblot-ELISA¹² e IFI¹³) e por meio da pesquisa de material genético do parasita em DNA extraído a partir de amostra de sangue periférico (técnica de PCR¹⁴). Sete animais, escolhidos aleatoriamente (dois machos e cinco fêmeas) constituíram o grupo experimental (I) e os demais três animais (um macho e duas fêmeas) permaneceram como controle (grupo C).

2.2 INÓCULO

A cepa de *E. canis* utilizada foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. 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 de erliquiose canina, em 1993). A amostra de sangue contendo o agente etiológico havia sido

---

⁹ Fort Dodge Saúde Animal

¹⁰ Panacur® cães e gatos (febendazole) – Intervet S.A.

¹¹ Frontline® top spot – Merial Saúde Animal Ltda.

¹² Immunocomb® – Biogal Galed Laboratories

¹³ VMRD, Inc. – lâminas (antígenos); conjugados anti-IgM e anti-IgG canino; soros controle positivo e negativo

¹⁴ Executado no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu

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, acondicionado em frasco contendo EDTA sódico como anticoagulante. Imediatamente após, cada animal do grupo I foi inoculado com 5 mL dessa amostra de sangue.

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

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, linfonodos, palpação do baço, coloração das mucosas e funções vitais), durante quatro semanas e posteriormente, em intervalos semanais até a sexta semana pós-infecção (p.i.).

As amostras de sangue foram colhidas para a realização do leucograma e teste de NBT e detecção do material genético de *E. canis* (técnica de PCR) nos momentos zero, e 2, 3, 4, 5, 6 semanas após a infecção, foram colhidas mediante venipunção cefálica ou jugular e acondicionadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA-K₃ a 7,5%¹⁵. A pesquisa de inclusões (mórulas) de *E. canis* foi realizada em amostras de sangue venoso e de sangue capilar obtidas do pavilhão auricular até a sexta semana p.i..

Os esfregaços de sangue foram preparados a fresco, imediatamente após a colheita, secos ao ar livre e corados com o corante de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

---

¹⁵ Vacutainer® Becton Dickinson, USA

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 sódico a 7,5 %, acondicionadas adequadamente e enviadas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, onde foram processadas, segundo a técnica descrita por Bulla (2003).

2.5 LEUCOGRAMA

A contagem global de leucócitos foi realizada em contador automático de células⁸. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos, corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

2.6 TESTE DE REDUÇÃO DO NBT

Para a avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, foi utilizada a técnica de tetrazólio nitroazul (NBT) com kit comercial⁹ descrito por Ciarlini et al. (2002). Resumidamente, 50µL de NBT foi misturada com 50µL de sangue heparinizado em um tubo eppendorf e em outro, 50µL de NBT com 25µL de sangue heparinizado acrescido de 2,5µL de estimulante¹⁰ (extrato bacteriano inativado) e incubados à 37°C por 10 minutos em banho-maria e mantidas em repouso à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Esfregaços sangüíneos (em triplicata) foram confeccionados a partir de cada preparado e corados com o

---

⁸ ABC™ VET, ABX'S, França

⁹ NBT, Sigma Diagnostic, St. Louis, USA

¹⁰ Stimulant, Sigma Diagnostic, St. Louis, USA

corante de Rosenfeld. Foram contados cem neutrófilos em cada um dos esfregaços corados, em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), sendo considerados positivos os neutrófilos que apresentaram grânulos intracitoplasmáticos de cor violácea ou enegrecida (cristais de formazan), independentemente do número e tamanho das granulações. Foi obtida a média aritmética dos valores observados em cada uma das três lâminas.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nesse estudo, foi utilizado o modelo linear para as análises de medidas repetidas no tempo (WANG; GOONEWARDENE, 2004). Os dados foram analisados usando o procedimento PROC MIXED com estrutura de covariância de ante dependência [ANTE (1)] e o comando LSMEANS/PDIFF para verificar as diferenças entre tratamentos nos diferentes tempos (SAS®, Statistical Analysis Software, version 8.2, SAS Institute, Cary, NC). Este procedimento avalia efeitos aleatórios no modelo estatístico, e pode computar estimativas eficientes de efeitos fixos e erros padrão válidos das estimativas (LITTELL; HENRY; AMMERMAN, 1998). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Febre, esplenomegalia, linfadenomegalia, perda de peso, anorexia, prostração foram as principais alterações clínicas observadas em todos os animais infectados, a partir da primeira a sexta semana após a infecção. Febre intermitente (39.8°C a 41.7°C) e mórulas de *E. canis* foram detectadas em todos os animais inoculados em pelo menos um momento, entre a segunda a quarta semana pós-infecção (p.i.) no sangue capilar, mas não no sangue periférico. Na quinta semana p.i., houve o melhoramento dos sinais clínicos, redução gradual da hiperplasia dos linfonodos e o desaparecimento da *E. canis* do sangue capilar e periférico indicando a superação da fase aguda. Apesar disso, o PCR permaneceu positivo em todos os animais (Quadro 1).

Anemia e trombocitopenia foram observadas em todos os cães infectados a partir da segunda semana p.i.. Não foram observadas alterações significativas no leucograma dos cães, com exceção da linfopenia ($p<0,05$) observada nos animais infectados na segunda semana p.i. (Figura 1). Os neutrófilos mantiveram a capacidade de redução de NBT, à semelhança dos animais do grupo controle ($p>0,05$) (Figura 2A). Entretanto, quando estimulados, apresentaram maior capacidade de redução do NBT ($p<0,05$) entre a quarta e quinta semana p.i. (Figura 2B).

Número de cães com	Semanas						
	0	1	2	3	4	5	6
Esplenomegalia	0	1	7	7	7	7	7
Linfadenomegalia	0	0	5	7	6	5	0
Mórulas (sangue capilar)	0	0	5	4	3	0	0
PCR	0	**	7	**	7	**	7

** não realizado

Quadro 1 – Número de cães com esplenomegalia, linfadenomegalia, presença de mórulas e/ou PCR positivo, durante a fase aguda da infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

Figura 1 – Valores de média e desvio-padrão da contagem do número total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e linfócitos (C) ($/\mu\text{L}$) em cães do grupo controle■ e infectado□ por *E. canis* durante a fase aguda. São Paulo, 2005. * $p < 0,05$

Figura 2 – Frequência relativa de neutrófilos positivos ao teste de redução de tetrazólio nitroazul (NBT) em cães infectados (—) e não infectados (---) por *E. canis*, durante a fase aguda da doença. (A) Teste não estimulado. (B) Teste estimulado. São Paulo, 2005. * $p < 0,05$

4 DISCUSSÃO

Os sintomas gerais e inespecíficos observados em todos os animais infectados a partir da segunda até a sexta semana pós-infecção (p.i.) são relatados por Woody e Hoskins (1991) e Neer (1998) na fase aguda da erliquiose canina. Sintomas como hemorragia ou pancitopenia que ocorrem na fase crônica ou terminal (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989) não foram observados durante o período abrangido por este estudo, com exceção do cão de número 7. A esplenomegalia, um achado comum na EMC (CASTRO et al., 2004; HIBLER; HOSKINS; GREENE, 1986) e a reação positiva de PCR foram observadas durante todo o experimento. O papel do baço na patogênese da EMC tem sido investigado extensivamente (HARRUS et al., 1998a). A esplenite linfoplasmática relatada por Castro et al. (2004), Harrus et al. (1998b) e Reardon e Pierce (1981) com a liberação de substâncias inflamatórias e/ou outras substâncias esplênicas tem um papel preponderante na patogênese da erliquiose canina. O baço constitui-se no órgão onde a *E. canis* se mantém durante a fase subclínica e o último órgão que alberga a riquetsia, antes de ser totalmente eliminada do hospedeiro (HARRUS et al., 1998a).

Alterações brandas nos leucócitos como as observadas, são constantes na durante a fase aguda (NEER, 1998). A linfopenia transitória pode ser explicada pela liberação de corticosteróides durante a fase aguda da infecção (JAIN, 1993), com a replicação de *E. canis* no sistema mononuclear fagocítico do baço, fígado e linfonodos (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989).

A capacidade dos neutrófilos em reduzir o NBT foi mantida em cães infectados por *E. canis* durante a fase aguda, sugerindo assim não haver nenhum prejuízo ou qualquer influência sobre as células PMN circulantes. Em regra geral, um aumento variável na atividade oxidativa dos neutrófilos dos cães pode ser observado em infecções bacterianas, virais ou parasitárias (BRANDONISIO et al., 1996; BREITSCHWERDT et al., 1987;

MURATA et al., 1994; NAGAHATA et al., 1991; POLI; NICOLETTI; FARAVELLI, 1973). Não obstante, quando estimulado, o teste de redução de NBT foi maior nos cães infectados, principalmente na quarta e quinta semana p.i., permanecendo até a semana subsequente da infecção. Coincidentemente, a resolução da parasitemia ocorreu na quinta semana p.i., e a redução dos linfonodos na sexta semana p.i.. Existem algumas evidências que substâncias esplênicas (HARRUS et al., 1998a) e outras substâncias inflamatórias liberadas pelo fígado durante a fase aguda da infecção (RIKIHISA et al., 1994) estejam envolvidas na maior reatividade dos neutrófilos. A proteína C reativa a principal proteína da fase aguda em cães e tem a capacidade de prejudicar a função fagocítica dos neutrófilos (TIZARD, 2000). A resposta do hospedeiro e a maior capacidade oxidativa das células PMN, quando estimuladas, poderia resultar na limitação da infecção e na persistência do agente apenas no tecido retículo endotelial (CASTRO et al., 2004; HARRUS et al., 1998b). Além disso, os cães infectados por *Leishmania*, apresentaram uma menor atividade funcional das células PMN contribuindo para a manutenção da infecção.

Os resultados desse estudo indicaram que a infecção por *E. canis* não tem influência negativa na atividade funcional dos neutrófilos circulantes e que na fase aguda da doença essas células são mais reativas.

REFERÊNCIAS*

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.

BRANDONISIO, O.; PANUNZIO, M.; FALIERO, S. M.; CECI, L.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum* – infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 53, n. 1/2, p. 95-103, 1996.

BREITSCHWERDT, E. B.; BROWN, T. T.; DE BUYSSCHER, E. V.; ANDERSEN, B. R.; THRALL, D. E.; HAGER, E.; ANANABA, G.; DEGEN, M. A.; WARD, M. D. W. Rhinitis, pneumonia, and defective neutrophil function in the Doberman Pinscher. **American Journal Veterinary Research**, v. 48, n. 7, p. 1054-1062, 1987.

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.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. C. C. T.; 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.

CHAMMAS, P. P.; HAGIWARA, M. K. Evaluation of neutrophilic function (chemotaxis, phagocytosis and microbicidal activity) in healthy dogs and in dogs suffering from recurrent deep pyoderma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 1, p. 123-131, 1998.

CIARLINI, P. C.; CIARLINI, L. D. R. P.; ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; RODRIGUES, C. F. C. Metabolismo oxidativo de neutrófilos em ovelhas naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais e correlação entre nível sérico de cortisol e carga parasitária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 1-7, 2002.

---

* De acordo com a NBR 6023

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

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

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.; 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, 1998a.

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.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARL, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 15-27, 1998b.

HIBLER, S. C.; HOSKINS, J. D.; GREENE, C. E. Rickettsial Infectious in dogs part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 8, n. 2, p. 106-114, 1986.

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.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JOHNSON, E. M.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; FOX, J. C.; CROW, D. W.; KOCAN, K. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichiae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2/4, p. 277-288, 1998.

LEWIS, D. C.; MEYERS, K. M. Canine idiopathic thrombocytopenia purpura. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 4, p. 207-218, 1998.

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. 1216-123, 1998.

MURATA, T.; TAGAMI, R.; INOUE, M.; UZUKA, Y.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Investigation of nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in the dog infected with *Hepatozoon canis* [abstract]. **Jikken Dobutsu**, v. 43, n. 1, p. 101-103, 1994.

NAGAHATA, H.; SAKO, T.; REITER, J. A.; DIBARTOLA, C. G.; COUTO, C. G.; KOCIBA, G. J. Neutrophil, adherence, phagocytic-nitroblue tetrazolium reduction and chemiluminescence in canine whole blood. **Veterinary Research Communications**, v. 15, n. 3, p. 181-188, 1991.

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. 139-154.

NYINDO, M. B. A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent: *Ehrlichia canis*. **American Journal Veterinary Research**, v. 32, n. 2, p. 1651-1658, 1971.

PARK, B. H.; HOLMES, R. A.; RODEY, G. E.; GOOD, R. A. Nitroblue tetrazolium test in children with fatal granulomatous disease and newborn infants. **The Lancet**, v. 1, n. 7586, p. 157, 1969.

POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) test nel cane. **Folia Veterinaria Latina**, v. 3, n. 2, p. 215-239, 1973.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis I Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, p. 48-61, 1981.

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

RISTIC, M.; HOLLAND, C. J. Canine ehrlichiosis. In: WOLDECHIWET, Z.; RISTIC, M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Oxford: Pergamon Press, 1993. p. 169-186.

STICKLE, J. E. The neutrophil – function, disorders, and testing. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 5, p. 1013-1021, 1996.

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.

TIZARD, I. R. Lymphocytes. In: . **Veterinary immunology: an introduction**. 6.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p. 84-97.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 404-418.

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.

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.

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

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

CAPÍTULO IV

DINÂMICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR EM CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Ehrlichia canis*

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa multissistêmica de cães causada pela *Ehrlichia canis*, cujo vetor é o *Rhipicephalus sanguineus* (BREITSCHWERDT, 2002; HARRUS; BARK; WANER, 1997). A erliquiose canina caracteriza-se por um período de incubação de oito a 20 dias, seguido pelo surgimento de sintomas variáveis e na maioria das vezes, inespecíficos, como depressão, letargia, perda de peso, anorexia, febre, linfadenomegalia e esplenomegalia (HARRUS et al., 1997; KEYSARY et al., 1996). No decurso da infecção são consideradas três fases, aguda, subclínica e crônica, que diferenciam-se entre si pela gravidade dos sintomas e alterações hematológicas no hospedeiro (NEER, 1998).

Durante a fase aguda, de cerca de duas a quatro semanas de duração a riquetsia dissemina-se pela corrente sanguínea e linfática, e se localiza nas células mononucleares fagocíticas do baço, fígado e nódulos linfáticos (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989). Isto resulta em linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular do fígado e baço (REARDON; PIERCE, 1981). As células infectadas se localizam a seguir em outros órgãos, especialmente pulmão, rim e meninge, e ao aderirem ao endotélio vascular, induzem vasculite e infecção do tecido subendotelial (SIMPSON, 1974).

Após a fase aguda, a infecção se torna assintomática (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989) e o agente pode se manter no organismo do hospedeiro por longo período de tempo (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986). Os cães imunocompetentes são capazes de eliminar o parasita durante esta fase (BREITSCHWERDT, 2002). Meses ou anos após, os hospedeiros que não foram capazes de eliminar a infecção podem apresentar pancitopenia, que se instala em consequência do comprometimento medular e que pode conduzir ao desfecho fatal (TROY; FORRESTER, 1990). Os fatores que podem afetar a gravidade das manifestações clínicas e patológicas da infecção por *E. canis* estão na dependência da patogenicidade da cepa, raça do cão, presença de infecções concomitantes ou estado imune hospedeiro (HARRUS; BARK; WANER, 1997).

O desenvolvimento da imunidade humoral pode ocorrer, posteriormente ao surgimento dos sintomas da doença (HARRUS; BARK; WANER, 1997). Assim, o teste sorológico na fase inicial da infecção pode fornecer resultados falsos negativos, e não sendo um bom indicador da infecção (NEER, 2002). Por outro lado, títulos elevados de anticorpos podem indicar extinção da infecção ou, quando persistentes, a manutenção da infecção (BARSTCH; GREENE, 1996; FRANK; BREITSCHWERDT, 1999).

A persistência da *Ehrlichia*, apesar do alto título de anticorpos, sugere o envolvimento da imunidade mediada por células na defesa do hospedeiro contra o agente, como ocorre em outras infecções, cujos agentes etiológicos apresentam localização intracelular no hospedeiro (MARTIN; CASPERSEN; DUMLER, 2001). Nessas infecções ocorre tipicamente a produção de IFN- γ e resposta citotóxica para a eliminação do microrganismo (MARTIN; CASPERSEN; DUMLER, 2001). Também a ativação da célula T, assim como, a interação entre a resposta imune humoral e celular são essenciais para a destruição efetiva do parasita intracelular (KAKOMA et al., 1977; NYINDO et al., 1980). Aparentemente a imunidade

protetora da erliquiose canina depende da persistência ativa do agente após a fase aguda (WEISER et al., 1991).

Existem evidências de que a imunidade celular está fortemente envolvida na patogenia da erliquiose (CASTRO et al., 2004; REARDON; PIERCE, 1981), considerando-se principalmente o aumento da citotoxicidade mediada por células (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; HEEB et al., 2003; KAKOMA et al., 1977).

A diminuição dos linfócitos T CD4+, resulta na inversão da relação CD4:CD8 que é citada por Frank e Breitschwerdt (1999) em cães infectados por *E. canis*. Os linfócitos T CD4+ são responsáveis pela ativação dos macrófagos e pela eliminação dos patógenos intracelulares (BITSAKTSIS; HUNTINGTON; WINSLOW, 2004). Essas células produzem citocinas do tipo 1, tais como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), responsáveis pelo desencadeamento da atividade microbicida em fagócitos infectados (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

A *E. chaffeensis* e *E. muris* são as espécies mais intimamente relacionadas a *E. canis*, e a similaridade na sequência dos genes 16S rRNA entre elas é maior que 98%. Na imunidade por *E. muris*, há a secreção de IFN- γ pelas células CD4, as quais também contribuem para a proliferação dos linfócitos T CD8. Em camundongos nocaute, sem a presença do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I a fatalidade da infecção por *E. muris* é de 81%, e em camundongos sem os linfócitos T CD4 e CD8, é de 80%. O reconhecimento dos antígenos de *E. muris* no contexto da apresentação da molécula de MHC de classe I pelos linfócitos T CD8 constitui-se no fator crítico na imunidade de proteção contra a *Ehrlichia* (FENG; WALKER, 2004).

Uma considerável contribuição à compreensão do mecanismo imunopatogênico envolvido na infecção humana causada por *E. chaffeensis* ocorreu após o isolamento da cepa de *Ehrlichia* de *Ixodes ovatus* (EIO) (BITSAKTSIS; HUNTINGTON; WINSLOW, 2004).

Bitsaktsis, Huntington e Winslow (2004) demonstraram que os camundongos infectados por EIO apresentaram proliferação das células T CD4⁺ em resposta a antígenos do microrganismo, com a secreção de citocinas do tipo 1, essenciais para a defesa do hospedeiro. Provavelmente há a indução, via citocinas inflamatórias, da produção de óxido nítrico reativo e/ou espécies reativas de oxigênio, resultando na morte da erlíquias no interior dos macrófagos, havendo, ao mesmo tempo, estímulo para a produção de anticorpos por parte das células B, o que contribui para a resistência do hospedeiro (GANTA et al., 2004).

Assim, a eliminação completa dessa riquetsia intracelular requer a presença da célula T CD4⁺ funcionais, estando a resposta protetora associada à secreção de IFN- γ e resposta celular do tipo Th1 como havia mencionada por Ganta et al. (2002).

A diminuição marcada das respostas das células T CD4⁺, incluindo um baixo número de células Th1 produtoras de IFN- γ estão fortemente associadas com o evento fatal na infecção por *Ehrlichia* spp. A produção exacerbada de TNF- α pelas células T CD8⁺ esplênicas, antígenos-específicos, está relacionada com a gravidade dessa doença. A produção eficiente dos linfócitos Th1 CD4⁺ pode representar um papel regulatório em controlar a produção de células T CD8⁺ que produzem TNF- α antígenos-específicos. Uma resposta fraca de células Th1 CD4⁺ está associada com a suscetibilidade após a infecção por EIO, que ocorre devido a apoptose das células Th1 CD4⁺ esplênicas (ISMAIL et al., 2004).

A diminuição dos linfócitos no sangue periférico pode ser causada pela diminuição da proliferação, aumento na morte dos linfócitos ou marginação/sequestro. A marginação e sequestro das células T são dependentes das interações adesivas entre as moléculas de superfícies dos linfócitos e das moléculas de superfícies das células endoteliais capilares. Estas interações adesivas são reguladas por uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas como a interleucina 1 (IL-1), TNF- α e proteína inflamatória dos macrófagos-1 β (FEENEY et al., 1995).

A relação entre as células CD4⁺ e CD8⁺ no sangue total é indicada para estimar resposta imune do hospedeiro em situações clínicas: o aumento na contagem de células CD4⁺ significa um aumento na reatividade dos linfócitos e altos níveis de CD8⁺ indica uma depleção dos linfócitos (TIZARD, 2000).

Considerando-se o envolvimento da resposta imune celular na depuração do agente infeccioso e no desenvolvimento da imunidade específica, a quantificação sequencial dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e a determinação da relação entre essas células no decorrer da infecção por *E. canis*, durante a fase aguda e na fase subclínica da infecção, podem trazer informações adicionais para o esclarecimento da patogenia 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, imunizados contra as principais doenças de cães¹⁶ e vermifugados¹⁷. A prevenção da infestação por ectoparasitas foi realizada a cada três semanas, com a utilização de fipronil tópico¹⁸. A ausência de infecção prévia por *E. canis* foi confirmada por meio de pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* (Dotblot-ELISA¹⁹ e IFI²⁰) e da pesquisa de material genético do parasita em DNA extraído a partir de amostra de sangue periférico (técnica de PCR²¹). Sete animais, escolhidos aleatoriamente (dois machos e cinco fêmeas) constituíram o grupo experimental (I) e os demais três animais (um macho e duas fêmeas) permaneceram como controle (grupo C).

2.2 INÓCULO

A cepa de *E. canis* utilizada foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. 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 de erliquiose canina, em 1993). A amostra de sangue contendo o agente etiológico havia

---

¹⁶ Fort Dodge Saúde Animal

¹⁷ Panacur® cães e gatos (febendazole) – Intervet S.A.

¹⁸ Frontline® top spot – Merial Saúde Animal Ltda.

¹⁹ Immunocomb® - Biogal Galed Laboratories

²⁰ VMRD, Inc. – lâminas (antígenos); conjugados anti-IgM e anti-IgG canino; soros controle positivo e negativo

²¹ Executado no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu

sido criopreservada em DMSO 10 % (Dimetilsulfóxido – Merck®) a -176° C. Após o descongelamento, a amostra foi inoculada em um cão jovem, 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 16° 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, acondicionado em frasco contendo EDTA sódico como anticoagulante. Imediatamente após, cada animal do grupo I foi inoculado com 5 mL dessa amostra de sangue.

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Antes e após a infecção, os cães do grupo I e do grupo C foram submetidos a exame físico diário (estado geral, temperatura corpórea, linfonodos, palpação do baço, coloração das mucosas e funções vitais), durante quatro semanas e posteriormente, em intervalos semanais até o 84° dia pós-infecção (p.i.), e quinzenalmente até o 138° dia p.i..

As amostras de sangue destinadas à realização da contagem dos linfócitos totais, citometria de fluxo e detecção do material genético de *E. canis* (técnica de PCR) foram colhidas mediante venipunção cefálica ou jugular e acondicionadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA-K₃ a 7,5%⁷. As amostras de sangue destinadas a citometria de fluxo não foram refrigeradas e processadas no máximo, quatro horas após a colheita. Parte da amostra sangüínea (5mL) foi acondicionada em tubos de vidro siliconizados, contendo gel ativador de coágulo⁷. 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 sorológicas (IFI). A pesquisa de

---

⁷ Vacutainer® Becton Dickinson, USA

inclusões (mórulas) de *E. canis* foi realizada em amostras de sangue venoso e de sangue capilar obtidas do pavilhão auricular até a décima semana p.i. (70º dia).

Os esfregaços de sangue foram preparados a fresco, imediatamente após a colheita, secos ao ar livre e corados com o corante de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

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 sódico a 7,5 %, acondicionadas adequadamente e enviadas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, onde foram processadas, segundo a técnica descrita por Bulla, 2003.

2.5 CONTAGEM DOS LINFÓCITOS TOTAIS

A contagem total dos leucócitos foi realizada em analisador automatizado⁸. Os esfregaços sangüíneos preparados no momento da colheita e destinados à contagem diferencial de leucócitos foram corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982) e examinados em microscópio óptico, com objetiva de imersão (100x), realizando-se à contagem diferencial de leucócitos, obteve-se os valores absolutos de linfócitos.

---

⁸ ABC™ VET, ABX'S, França

2.6 REAÇÃO DE IFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM OU IgG ANTI-*E. canis*

A técnica de reação de imunofluorescência indireta utilizada foi a descrita por Ristic et al. (1972). As lâminas⁹, depois de retiradas do freezer, foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Os soros testados foram diluídos em solução salina tamponada (pH 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 positivo¹⁰ e de soro controle negativo¹¹ foi utilizado nos poços reservados para esse 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 da lâmina foi adicionado 10 µL do conjugado anti-IgM¹² ou anti-IgG¹³ de cão repetindo-se a incubação e a 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 epiluminação¹⁴ com lâmpada de alta pressão, no aumento de (40x). Foram considerados positivos, os soros que apresentaram fluorescência de intensidade na diluição >1:80, segundo Waner et al. (2001).

---

⁹ VMRD catalog nº 210-88-12-EC

¹⁰ VMRD catalog nº 211-P-EC

¹¹ VMRD catalog nº 211-N-EC

¹² VMRD catalog nº 036-10

¹³ VMRD catalog nº 035-10

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

2.7 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS LINFÓCITOS T CD4+ E CD8+

As subpopulações de linfócitos T foram quantificadas utilizando-se a técnica de citometria de fluxo, com marcadores CD4+ e CD8+. Foram adicionadas em cada tubo 100µL da amostra de sangue com EDTA sódico a 7,5% e diluídas com solução de NaCl a 0,2% para a lise das hemácias e após 20 segundos foi adicionado um volume igual de NaCl a 1,6%, centrifugando as amostras por 5 minutos a 184,8 g. Esse procedimento para a remoção das hemácias foi repetido por duas vezes. Em seguida, as amostras foram incubadas com 5 µL de anticorpo monoclonal específico CD4+¹⁵ e CD8+¹⁶ à temperatura ambiente por 15 minutos e ressuspendidas em 1 mL de PBS. Os controles negativos eram realizados de forma similar, utilizando-se como controles IgG de ratos, das subclasses IgG2a e IgG1, conjugados aos fluorocromos FITC e RPE, respectivamente. A seguir foi realizada a leitura no citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado com um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). A análise do número de linfócitos T foi realizada a partir da marcação, de linfócitos T CD4+ e CD8+, calculando-se a porcentagem de células que apresentaram esses marcadores.

---

¹⁵ rat anti-canine CD4/FITC – Serotec

¹⁶ rat anti-canine CD8/PE – Serotec

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nesse estudo, foi utilizado o modelo linear para as análises de medidas repetidas no tempo (WANG; GOONEWARDENE, 2004). Os dados foram analisados usando o procedimento PROC MIXED, com estrutura de covariância de ante dependência [ANTE (1)] e o comando LSMEANS/PDIFF para verificar as diferenças entre tratamentos nos diferentes tempos (SAS®, Statistical Analysis Software, version 8.2, SAS Institute, Cary, NC). Este procedimento avalia efeitos aleatórios no modelo estatístico, e pode computar estimativas eficientes de efeitos fixos e erros padrão válidos das estimativas (LITTELL; HENRY; AMMERMAN, 1998). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

As alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas estão descritas no capítulo I até o 70º dia pós-infecção (p.i.), e em alguns cães somente a esplenomegalia persistiram até o final do experimento.

A presença de material genético do parasita foi observada na reação de PCR em todos os cães infectados a partir do 14º dia até o 42º dia. A partir do 56º dia apenas dois animais se mantiveram positivos até o final do período de observação, enquanto em outros, a reação foi positiva de forma intermitente (Tabela 1). O que não ocorreu com os animais do grupo controle.

Tabela 1 – Detecção do material genético de *E. canis* por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR) dos animais controle (C) e infectado (I), antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

CÃO	Dias										
	0	14	28	42	56	70	84	98	112	126	138
I 1	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
I 2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
I 3	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
I 4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 6	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
I 7	-	+	+	+	**	**	**	**	**	**	**
C 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

** óbito

3.2 CONTAGEM DE LINFÓCITOS

Houve diminuição dos valores médios no número absoluto de linfócitos/ μL de sangue dos animais infectados, sendo a linfopenia observada no 14º, 63º, 70º, 98º e 112º dia p.i., diferindo do grupo controle ($p<0,05$) conforme se verifica na Figura 1.

Figura 1 – Valores médios e desvio-padrão do número total de linfócitos/ μL de sangue dos cães antes e após infecção por *E. canis* e dos cães do grupo controle. São Paulo, 2005

3.3 ANTICORPOS ANTI-*E. canis*

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 (Figura 2), 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. (Tabela 2). Todos os animais não infectados permaneceram soronegativos.

Figura 2 – Prova de IFI. Amostra positiva para anticorpos de IgG anti-*E. canis* (aumento de 40x). São Paulo, 2005

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

CÃO	Títulos de anticorpos												
	Dias												
	0	7	14	21	28	42	56	70	84	98	112	126	138
I 1	0	0	40	80	160	640	2560	1280	2560	5120	2560	2560	5120
I 2	0	0	40	160	320	2560	20480	10240	20480	10240	10240	10240	10240
I 3	0	0	40	160	320	640	10240	5120	10240	5120	5120	5120	10240
I 4	0	0	40	160	320	640	5120	10240	10240	5120	5120	10240	5120
I 5	0	0	40	160	320	5120	10240	20480	20480	20480	10240	20480	10240
I 6	0	0	40	160	320	640	5120	10240	5120	5120	5120	5120	5120
I 7	0	0	40	160	320	5120	**	**	**	**	**	**	**
C 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

** óbito

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T

Os valores absolutos dos linfócitos T CD4+/ μ L de sangue de cada animal estão apresentados na Tabela 3 e, os valores médios e desvio padrão da média entre os grupos nos diferentes momentos na Figura 3. A partir do 14º dia p.i., observou-se a diminuição acentuada ($p<0,05$) dos valores absolutos médios de linfócitos T CD4+ nos animais infectados.

Em relação aos linfócitos T CD8+ houve aumento dos valores absolutos/ μ L de sangue, na fase inicial da infecção, conforme se observa na Tabela 4 em que são apresentados os valores individuais. A representação gráfica dos valores absolutos médios e desvio-padrão dos linfócitos T CD8+ encontra-se na Figura 4, e a diferença ($p<0,05$) ocorreu entre o 21º e 28º dia p.i. nos animais infectados.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores individuais da relação CD4:CD8 dos animais do grupo controle e dos animais infectados nos diferentes momentos. Na Figura 5, estão apresentados os valores médios e desvio-padrão de relação CD4:CD8 observando-se diferença entre os grupos $p<0,05$ em todos os momentos, a partir do 14º dia p.i..

Na Figura 6 estão apresentados a quantificação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ pela citometria de fluxo de um cão não inoculado (controle) e inoculado por *E. canis* no dia 0 e no 28º dia p.i..

Tabela 3 – Valores absolutos individuais, média e desvio padrão (DP) de linfócitos T CD4+/ μ L dos animais controle (C) e infectado (I), antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

CÃO	Linfócitos T CD4+/ μ L															
	Dias															
	0	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	98	112	126	138
I 1	1097	249	443	834	411	680	478	829	916	857	1069	944	877	619	993	601
I 2	1023	302	321	615	217	160	351	334	298	341	236	432	214	333	372	574
I 3	833	197	298	198	163	155	165	200	295	140	372	500	322	283	421	541
I 4	707	406	468	399	186	213	231	182	130	72	37	107	83	272	257	332
I 5	657	722	679	1252	1434	693	417	586	322	552	500	613	437	288	510	374
I 6	664	159	157	169	171	341	780	366	235	271	170	348	128	149	266	264
I 7	795	263	272	81	181	64	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Média	825	328	377	507	395	329	404	416	366	372	397	491	344	324	470	448
DP	174,27	190,69	169,63	423,57	466,36	257,67	217,66	249,04	278,19	290,73	366,02	279,84	291,51	357,11	273,54	141,93
C 1	981	1263	753	1221	1506	1128	994	983	1490	1388	1149	1418	1237	1621	1189	1036
C 2	721	1700	1109	1425	994	979	1130	1270	1358	1614	997	1024	1378	1150	1269	810
C 3	1076	671	1121	864	776	844	964	951	868	774	971	1135	952	973	852	1079
Média	926	1211	994	1170	1092	984	1029	1068	1239	1259	1039	1192	1189	1248	1103	975
DP	183,78	516,44	209,09	283,96	374,74	142,06	88,46	175,67	327,72	434,68	96,15	203,16	217,02	334,93	221,31	144,50

** óbito

Figura 3 – Valores absolutos médios e desvio-padrão de linfócitos T CD4+/ μ L de sangue dos cães antes e após infecção por *E. canis* e dos cães do grupo controle. São Paulo, 2005

Tabela 4 – Valores absolutos individuais, média e desvio padrão de linfócitos T CD8+/ μ L de sangue dos animais controle (C) e infectado (I), antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

CÃO	Linfócitos T CD8+/ μ L															
	Dias															
	0	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	98	112	126	138
I 1	322	200	738	1190	833	818	501	864	751	762	601	590	495	405	415	244
I 2	257	487	1114	1157	319	235	438	271	380	350	187	306	220	266	236	496
I 3	291	205	474	520	309	258	100	34	180	100	258	322	188	197	315	417
I 4	209	842	2195	2631	789	765	454	124	148	59	21	58	36	134	150	119
I 5	298	779	1587	3838	2832	1140	736	591	413	1051	572	920	760	457	976	659
I 6	266	74	133	239	516	835	1074	241	147	214	66	188	49	78	236	191
I 7	351	255	1320	305	481	86	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Média	285	406	1080	1556	868	591	551	354	337	423	284	397	291	256	388	354
DP	46,28	303,22	700,0	1259,62	889,97	394,84	327,36	313,44	234,73	398,78	249,08	310,9	283,13	150,17	301,55	205,45
C 1	371	471	292	558	515	294	265	277	473	554	363	489	458	524	354	371
C 2	125	389	248	276	180	131	160	182	160	323	170	192	225	216	254	131
C 3	432	492	654	471	498	519	363	235	257	481	301	552	399	383	366	538
Média	309	451	398	435	398	315	263	231	297	453	278	411	361	374	325	347
DP	162,52	53,43	222,79	144,41	188,7	194,82	101,52	47,61	160,23	118,08	98,53	192,26	121,14	154,18	61,49	204,59

** óbito

Figura 4 – Valores absolutos médios e desvio-padrão de linfócitos T CD8+/μL de sangue dos cães antes e após infecção por *E. canis* e dos cães do grupo controle. São Paulo, 2005

Tabela 5 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação dos linfócitos T CD4:CD8 dos animais controle (C) e infectado (I), antes e após a infecção por *E. canis*. São Paulo, 2005

CÃO	Relação CD4:CD8															
	Dias															
	0	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	98	112	126	138
I 1	3,4	1,24	0,6	0,7	0,49	0,83	0,95	0,96	1,22	1,12	1,78	1,6	1,77	1,53	2,4	2,46
I 2	3,98	0,62	0,29	0,53	0,68	0,68	0,8	1,23	0,78	0,97	1,26	1,41	0,97	1,25	1,58	1,16
I 3	2,86	0,96	0,63	0,38	0,53	0,6	1,65	5,88	1,64	1,4	1,44	1,55	1,71	1,44	1,34	1,3
I 4	3,38	0,48	0,21	0,15	0,23	0,28	0,51	1,46	0,88	1,22	1,76	1,85	2,3	2,03	1,71	2,79
I 5	2,2	0,92	0,43	0,32	0,5	0,6	0,57	0,99	0,78	0,52	0,87	0,67	0,58	0,63	0,52	0,57
I 6	2,49	2,15	1,18	0,7	0,33	0,4	0,72	1,51	1,6	1,26	2,57	1,85	2,61	1,91	1,13	1,38
I 7	2,26	1,03	0,2	0,26	0,38	0,74	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Média	2,94	1,06	0,51	0,43	0,45	0,59	0,87	2,01	1,15	1,08	1,61	1,49	1,66	1,47	1,45	1,61
DP	0,67	0,54	0,34	0,22	0,15	0,19	0,42	1,91	0,40	0,31	0,58	0,44	0,77	0,50	0,63	0,84
C 1	2,64	2,68	2,58	2,18	2,92	3,84	3,75	3,55	3,15	2,5	3,16	2,9	2,7	3,09	3,36	2,79
C 2	5,78	4,37	4,47	5,16	5,52	7,43	7,06	6,98	8,47	5	5,86	5,33	6,12	5,32	5	6,18
C 3	2,49	1,36	1,71	1,83	1,56	1,62	2,65	4,05	3,38	1,61	3,22	2,06	2,39	2,54	2,33	2
Média	3,64	2,80	2,92	3,06	3,33	4,30	4,49	4,86	5,00	3,04	4,08	3,43	3,74	3,65	3,56	3,66
DP	1,86	1,51	1,41	1,83	2,01	2,93	2,30	1,85	3,01	1,76	1,54	1,70	2,07	1,47	1,35	2,22

** óbito

Figura 5 – Valores médios e desvio-padrão da relação de linfócitos T CD4:CD8 dos cães antes e após infecção por *E. canis* e dos cães do grupo controle. São Paulo, 2005

Figura 6 – Quantificação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ pela citometria de fluxo de um cão controle (A) e de um cão inoculado por *E. canis* no dia 0 (B) e no 28º dia p.i. (C). São Paulo, 2005

4 DISCUSSÃO

A presença de inclusões intracitoplasmáticas de *E. canis* em células mononucleares circulantes em um ou mais momentos em todos os cães infectados, bem como a amplificação do material genético do parasita comprovaram de forma cabal, a infecção dos cães inoculados.

O curso clínico da infecção, bem como as manifestações clínicas, como febre, esplenomegalia, linfadenomegalia e as alterações laboratoriais, como a trombocitopenia, anemia, aumento das atividades séricas de ALT, AST e FA foram semelhantes aos relatados por Harrus et al. (1997) e Neer (1998) e observados tanto na infecção natural (KUEHN; GAUNT, 1985; MYLONAKIS et al., 2004) quanto na infecção experimental (ALMOSNY, 1998).

De acordo com Harrus et al. (1998b) o baço desempenha papel primordial na infecção por *E. canis*, sendo um dos órgãos onde ocorre a replicação do microrganismo e o último local de abrigo da erlíquia, durante a fase subclínica da infecção (HARRUS et al., 1998a). Assim, a persistência da esplenomegalia apesar da aparente resolução clínica, é indicativa de manutenção da *E. canis* no hospedeiro. Apesar do alto título de anticorpos, foi comprovada a presença do material genético do agente por meio da PCR.

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 alto título 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 (7, 14, 21, 28 e 35 dias p.i.). Títulos baixos (= 40),

na reação de IFI foram observados 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 da *E. canis* não resulta em estímulo antigênico 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.

Altos títulos de IgG observados durante a fase assintomática são também citados por Codner e Farris-Smith (1986) e Waner et al. (1997) e são indicativos da manutenção da infecção; o declínio gradual do título de anticorpos ocorre após a eliminação do agente infeccioso (HARRUS et al., 1998a) e em condições naturais, após algum tempo o cão se torna novamente suscetível à infecção (NEER, 2002).

Aparentemente a imunidade humoral não foi suficiente para eliminar a infecção, já que a presença da *E. canis* foi constatada por meio de PCR, em mais da metade dos cães inoculados, ao término do período da infecção. Entretanto, a presença de IgG pode ter contribuído para limitar a replicação do agente infeccioso, como citam Winslow et al. (2000), que demonstraram a importância da resposta humoral na limitação da infecção por *E. chaffeensis*.

Sendo a imunidade humoral de per si insuficiente para a extinção da infecção por *E. canis* (NYINDO et al., 1980; WANER et al., 2001), a relação parasita-hospedeiro é regulada

pelo mecanismo celular (SCHAIBLE; COLLINS; KAUFMANN, 1999). O desenvolvimento consistente e duradouro da imunidade e, a eliminação da *E. canis* do organismo hospedeiro estão ancorados na interação entre a resposta humoral e a resposta imune mediada por células (KAKOMA et al., 1977; NYINDO et al., 1980). Alterações na relação CD4:CD8 no sangue circulante (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; HEEB et al., 2003) na erliquiose natural, hiperplasia linforreticular de linfonodos (REARDON; PRIECE, 1981) e a imunofenotipagem das células residentes em linfonodos e baço (CASTRO, 2004; CASTRO et al., 2004) comprovam o envolvimento da reposta imune mediada por células no curso da infecção.

A linfopenia observada a partir do 14º dia até o final do experimento, mais evidente em alguns momentos, não pode ser atribuída, de forma simplificada, à liberação de corticóides na fase aguda da infecção como é citada por Jain (1993). Provavelmente, está relacionada à replicação de *E. canis* no sistema mononuclear fagocítico do baço, fígado e linfonodo (HARRUS et al., 1998b; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989). Essa linfopenia pode ser creditada, pelo menos em parte, à diminuição dos linfócitos T CD4+ observada já no 14º dia p.i. e que persistiu até o final do experimento.

Os linfócitos T CD4+ possuem um importante papel na elaboração e potencialização da resposta imune humoral e celular, sendo responsáveis pela produção de IFN- γ que atuam estimulando a atividade microbicida do macrófago (BITSAKTSIS; HUNTINGTON; WINSLOW, 2004). Portanto, são essenciais no mecanismo de proteção e eliminação da infecção erliquial (BITSAKTSIS; HUNTINGTON; WINSLOW, 2004). Na infecção de camundongos por EIO é citada a ocorrência de apoptose das células Th1 esplênicas (ISMAIL et al., 2004) o que favoreceria a persistência da infecção. No caso da infecção de camundongos por *E. chaffeensis*, a presença de células T CD4+ funcionalmente aptas é essencial para a secreção de IFN- γ e eliciação de resposta celular do tipo Th1 (GANTA et al., 2002). Assim, minimizar a atividades das células T CD4+ pode se constituir no mecanismo

também adotado pela *E. canis*, para sua sobrevivência no organismo do hospedeiro. De fato, a supressão das moléculas do MHC de classe II foi observada por Castro (2004) em células linfóides dos linfonodos de cães e por Harrus et al. (2003), em células DH82 quando infectados por *E. canis*.

A persistência da linfopenia e da diminuição dos linfócitos CD4⁺ foi associada à persistência da esplenomegalia na fase assintomática da erliquiose canina. Assim, a linfopenia e se possível, a quantificação de linfócitos T CD4⁺ em cães que apresentam esplenomegalia podem ser constituir em indicadores clínicos da persistência da infecção, ainda que a pesquisa de material genético não revele a presença de *E. canis*, como ocorreu em dois dos cães infectados em alguns dos momentos estudados.

O incremento na proporção e no número absoluto das células CD8⁺ contrapondo-se à diminuição das células CD4⁺ no auge da infecção, resultou na inversão da relação CD4:CD8, como é citado na literatura, por Frank, Breitschwerdt (1999) e Heeb et al. (2003) na erliquiose de ocorrência natural. Embora a relação CD4:CD8 se mantivesse mais baixa quando comparada com a do grupo controle, somente na fase aguda da infecção, a partir do 21º dia até o 49º dia p.i., é que houve a inversão da relação entre os dois tipos celulares (CD4:CD8 <1), devido principalmente ao aumento das células CD8⁺.

A expansão do “pool” de células CD8⁺ foi observada por Castro (1997), em estudo imunohistoquímico de linfonodos de cães com erliquiose aguda, e por citometria de fluxo, no sangue periférico por Frank, Breitschwerdt (1999) e Heeb et al. (2003). O aumento inicial dos linfócitos T CD8⁺ ocorreu após a observação das inclusões intracelulares de *E. canis* na circulação sangüínea. Na fase de replicação do agente ocorre, provavelmente a exclusão dos receptores das moléculas do MHC da classe I nas células infectadas por *E. canis*. Barnewall, Rikihisa e Lee (1997) observaram “in vitro” esse fenômeno durante a endocitose da *E. chaffeensis*. Concluíram que se trata de um mecanismo utilizado por esse microrganismo, para

possibilitar sua sobrevivência na célula infectada. Assim, possivelmente, a supressão ou a minimização temporária da atividade das células T CD4 na fase inicial da infecção e da supressão parcial da apresentação de moléculas de MHC da classe I pelo fagócito infectado, retardando o concurso dos linfócitos T CD8+, permitem a replicação do agente infeccioso no organismo hospedeiro. A partir do momento em que a *E. canis* passou a infectar outras células, o que ocorreu provavelmente entre 14 e 21 dias, houve o aumento dos linfócitos T CD8+ na circulação sanguínea. Coincidentemente, as alterações clínicas hematológicas e bioquímicas atingiram o auge entre 21 e 28 dias, quando se observou o aumento máximo das células CD8+ no sangue periférico.

A produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α por parte dos linfócitos T CD8+ está envolvida no desenvolvimento de lesões teciduais (ISMAIL et al., 2004), que se traduzem em sintomas como, febre, claudicação, secreção ocular, conjuntivite, uveíte, convulsões, entre outras manifestações clínicas que compõem a constelação de sintomas e lesões de órgãos relatados nos casos naturais de erliquiose canina (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; MYLONAKIS et al., 2004). Também a supressão medular, resultando em anemia e trombocitopenia pode ter sido ocasionada pela excessiva produção de TNF- α , cuja secreção pelas células residentes na medula óssea é responsável pela aplasia medular (HARA et al., 2004). O efeito dessa citocina causando apoptose e/ou necrose dos hepatócitos (BRADHAM et al., 1998) também pode ter ocasionado elevação abrupta e evidente da atividade sérica das enzimas liberadas dos hepatócitos (ALT e AST) ou induzidas (FA).

Dessa forma, a imunopatogenia da erliquiose canina pode estar relacionada à produção descontrolada de TNF- α pelos linfócitos T CD8+ na fase aguda da infecção e em menor grau, durante a fase assintomática da infecção, estimulada pela presença insidiosa da *E. canis* no baço (HARRUS et al., 1998a) e, provavelmente, na medula óssea (SILVA, 2001).

Quando a carga do agente infeccioso é alta, com a exacerbada resposta dos linfócitos T CD8+, aliada a menor resistência orgânica do hospedeiro, a infecção pode apresentar evolução fatal, como ocorreu com um dos cães infectados, no 50º dia p.i.. Neste animal, os sintomas observados (uveíte, epistaxe, edema de membros e da cauda) e a gradual queda no número de leucócitos, hemácias e plaquetas, demonstraram a generalização da infecção. A exacerbada resposta imune humoral (título de anticorpo = 5.120) e celular não se constituíram para a recuperação clínica.

O bloqueio parcial da atividade dos linfócitos T CD4+, constitui-se provavelmente em um dos mecanismos de escape da *E. canis*, enquanto a contínua liberação de TNF- α pelas células citotóxicas, como parte do mecanismo do hospedeiro para a eliminação do parasita pode resultar na pancitopenia terminal observado freqüentemente nos cães cronicamente infectados por *E. canis*.

REFERÊNCIAS*

- ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. 553p.
- 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.
- BARNEWALL, R. E.; RIKIHISA, Y.; LEE, E. H. *Ehrlichia chaffeensis* inclusions are early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 4, p. 1455-1461, 1997.
- 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.
- 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.
- BITSAKTSIS, C.; HUNTINGTON, J.; WINSLOW, G. Production of IFN- γ by CD4 T cells essential for resolving ehrlichia infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 6894-6901, 2004.
- 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, n. 3, p. G387-G392, 1998.
- BREITSCHWERDT, E. B. Ehrlichiosis: a new zoonosis? **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, n. 1(A), p. 10-14, 2002.
- 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.

---

* De acordo com a NBR 6023

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

CASTRO, M. B. **Avaliação histopatológica e caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em órgãos linfóides e lesões na infecção aguda experimental em cães por *Ehrlichia canis*.** 2004. 75 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 11, p. 73-86, 2004.

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

FEENEY, C.; BRYZMAN, S.; KONG, L.; BRAZIL, H.; DEUTSCH, R.; FRITZ, L. C. T-lymphocyte subsets in acute illness. **Critical Care Medicine**, v. 23, n. 10, p. 1680-1685, 1995.

FENG, H. M.; WALKER, D. H. Mechanisms of immunity of *Ehrlichia muris*: a model of monocyotropic ehrlichiosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 966-971, 2004.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. 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.

GANTA, R. R.; CHENG, C.; WILKERSON, M. J.; CHAPES, S. K. Delayed clearance of *Ehrlichia chaffeensis* infection in CD4+ T-cell knockout mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 159-167, 2004.

GANTA, R. R.; WILKERSON, M. J.; CHENG, C.; ROKEY, A. M.; CHAPES, S. K. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 380-388, 2002.

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.

HARA, T.; ANDO, K.; TSURUMI, H.; MORIWAKI, H. Excessive production of tumor necrosis factor- α 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.; 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. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.

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, 1998a.

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, 1998b.

HEEB, H. L.; WILKERSON, M. J.; CHUN, R.; GANTA, R. R. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, n. 4, p. 379-384, 2003.

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

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

KAKOMA, I.; CARSON, C. A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; STEPHENSON, E. H.; NYINDO, M. B. A. Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 10, p. 1557-1559, 1977.

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, n. 3/4, p. 331-340, 1996.

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

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. 1216-123, 1998.

MARTIN, M. E.; CASPERSEN, K.; DUMLER, J. S. Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon- γ and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 5, p. 1881-1888, 2001.

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.

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. 139-154.

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 Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 250-254, 1980.

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.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis – I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Veterinary Pathology**, v.18, n. 1, p. 48-61, 1981.

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.

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.

SIMPSON, C. F. Relationship of *Ehrlichia canis* – infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. **Infection and Immunity**, v. 10, n. 3, p. 590-596, 1974.

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 Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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. 277-279.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 404-418.

TIZARD, I. R. Lymphocytes. In: . **Veterinary immunology: an introduction**. 6.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p. 84-97.

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 special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

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

WEISER, M. G.; THRALL, M. A.; FULTON, R.; BECK, E. R.; WISE, L. A.; STEENHOUSE, J. L. V. Granular lymphocytosis and hiperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 84-88, 1991.

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

WINSLOW, G. M.; YAGER, E.; SHILO, K.; VOLK, E.; REILLY, A.; CHU, F. K. Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2187-2195, 2000.

LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS*

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. 553p.

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.

ANDERSON, B. E.; DAWSON, J. E.; JONES, D. C.; WILSON, K. H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2838-2842, 1991.

BAEHNER, R. L.; NATHAN, D. G. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. **Science**, v. 155, n. 764, p. 835-836, 1967.

BARNEWALL, R. E.; RIKIHISA, Y.; LEE, E. H. *Ehrlichia chaffeensis* inclusions are early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 4, p. 1455-1461, 1997.

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.

BITSAKTSIS, C.; HUNTINGTON, J.; WINSLOW, G. Production of IFN- γ by CD4 T cells essential for resolving ehrlichia infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 6894-6901, 2004.

---

* De acordo com a NBR 6023

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, n. 3, 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.

BRANDONISIO, O.; PANUNZIO, M.; FALIERO, S. M.; CECI, L.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum* – infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 53, n. 1/2, p. 95-103, 1996.

BREISTCHWERDT, 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.; BROWN, T. T.; DE BUYSSCHER, E. V.; ANDERSEN, B. R.; THRALL, D. E.; HAGER, E.; ANANABA, G.; DEGEN, M. A.; WARD, M. D. W. Rhinitis, pneumonia, and defective neutrophil function in the Doberman Pinscher. **American Journal Veterinary Research**, v. 48, n. 7, p. 1054-1062, 1987.

BREITSCHWERDT, E. B.; HERGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **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. Polymiositis 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 MOSHKOVKI 1945**. 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

CASTRO, M.B. **Avaliação histopatológica e caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em órgãos linfóides e lesões na infecção aguda experimental em cães por *Ehrlichia canis***. 2004. 75 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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.

CHAMMAS, P. P.; HAGIWARA, M. K. Evaluation of neutrophilic function (chemotaxis, phagocytosis and microbicidal activity) in healthy dogs and in dogs suffering from recurrent deep pyoderma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 1, p. 123-131, 1998.

CIARLINI, P. C.; CIARLINI, L. D. R. P.; ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; RODRIGUES, C. F. C. Metabolismo oxidativo de neutrófilos em ovelhas naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais e correlação entre nível sérico de cortisol e carga parasitária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 1-7, 2002.

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 polyarthritis in three dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 8, p. 1093-1095, 1998.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

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

DUMLER, J. S.; 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.

EICKHOFF, S.; MIRONOWA, L.; CARLSON, R.; LEIBOLD, W.; TIPOLD, A. Measurement of phagocytosis and oxidative burst of canine neutrophils: high variation in healthy dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, n. 1/2, p. 109-121, 2004.

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.

FEENEY, C.; BRYZMAN, S.; KONG, L.; BRAZIL, H.; DEUTSCH, R.; FRITZ, L. C. T-lymphocyte subsets in acute illness. **Critical Care Medicine**, v. 23, n. 10, p. 1680-1685, 1995.

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.

FENG, H. M.; WALKER, D. H. Mechanisms of immunity of *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 966-971, 2004.

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.

GANTA, R. R.; CHENG, C.; WILKERSON, M. J.; CHAPES, S. K. Delayed clearance of *Ehrlichia chaffeensis* infection in CD4+ T-cell knockout mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 159-167, 2004.

GANTA, R. R.; WILKERSON, M. J.; CHENG, C.; ROKEY, A. M.; CHAPES, S. K. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 380-388, 2002.

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.

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.

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.; HUSXOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal 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.

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.

HEEB, H. L.; WILKERSON, M. J.; CHUN, R.; GANTA, R. R. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, n. 4, p. 379-384, 2003.

HIBLER, S. C.; HOSKINS, J. D.; GREENE, C. E. Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 8, n. 2, p. 106-114, 1986.

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. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JOHNSON, E. M.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; FOX, J. C.; CROW, D. W.; KOCAN, K. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichiae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2/4, p. 277-288, 1998.

KAKOMA, I.; CARSON, C. A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; STEPHENSON, E. H.; NYINDO, M. B. A. Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 10, p. 1557-1559, 1977.

KAWAHARA, M.; ITO, T.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; RIKIHISA, Y.; HATA, K.; HIRAI, K. Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and animals with *E. muris* as antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1123-1139, 1999.

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, n. 3/4, p. 331-340, 1996.

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. Canine idiopathic thrombocytopenia purpura. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 4, p. 207-218, 1998.

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. 1216-123, 1998.

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.

MARTIN, M. E.; CASPERSEN, K.; DUMLER, J. S. Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon- γ and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 5, p. 1881-1888, 2001.

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.

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

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.

MURATA, T.; TAGAMI, R.; INOUE, M.; UZUKA, Y.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Investigation of nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in the dog infected with *Hepatozoon canis* [abstract]. **Jikken Dobutsu**, v. 43, n. 1, p. 101-103, 1994.

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.

NAGAHATA, H.; SAKO, T.; REITER, J. A.; DIBARTOLA, C. G.; COUTO, C. G.; KOCIBA, G. J. Neutrophil, adherence, phagocytic-nitroblue tetrazolium reduction and chemiluminescence in canine whole blood. **Veterinary Research Communications**, v. 15, n. 3, p. 181-188, 1991.

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.

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.

NYINDO, M. B. A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent: *Ehrlichia canis*. **American Journal Veterinary Research**, v. 32, n. 2, p. 1651-1658, 1971.

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.

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.

PARK, B. H.; HOLMES, R. A.; RODEY, G. E.; GOOD, R. A. Nitroblue tetrazolium test in children with fatal granulomatous disease and newborn infants. **The Lancet**, v. 1, n. 7586, p. 157, 1969.

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.

POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) test nel cane. **Folia Veterinaria Latina**, v. 3, n. 2, p. 215-239, 1973.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis I Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, 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.; HOLLAND, C. J. Canine ehrlichiosis. In: WOLDECHIWET, Z.; RISTIC, M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Oxford: Pergamon Press, 1993. p. 169-186.

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.

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.

SIMPSON, C. F. Relationship of *Ehrlichia canis* - infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. **Infection and Immunity**, v. 10, n. 3, p. 590-596, 1974.

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.

STICKLE, J. E. The neutrophil – function, disorders, and testing. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 5, p. 1013-1021, 1996.

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.

TIZARD, I. R. Lymphocytes. In: . **Veterinary immunology: an introduction**. 6.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p. 84-97.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 404-418.

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.

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 special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WANER, T.; 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.; 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.

WEISER, M. G.; THRALL, M. A.; FULTON, R.; BECK, E. R.; WISE, L. A.; STEENHOUSE, J. L. V. Granular lymphocytosis and hiperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 84-88, 1991.

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

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.; TURNWALD, G. H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. 395 p.

WINSLOW, G. M.; YAGER, E.; SHILO, K.; VOLK, E.; REILLY, A.; CHU, F. K. Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2187-2195, 2000.

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.

APÊNDICE

Fri, 17 Dec 2004 10:51:04 -0800

Dear Dr. Hasegawa,

I am pleased to inform you that your revised manuscript #04-645, "Evaluation of neutrophil oxidative metabolism in canine monocytic ehrlichiosis", has completed the scientific review process and is accepted for publication pending editorial review. Your manuscript will be edited for inclusion in an upcoming issue of Veterinary Clinical Pathology. You will hear from me again during this process, with additional questions and suggestions regarding your manuscript.

*Attached is a COPYRIGHT TRANSFER FORM. Please print the form, complete it, and return it as soon as possible to the address at the bottom of the form. Please note that all authors are required to sign the Copyright Transfer agreement.

*Please send TIFF files of your figures (1200 dpi, LZW compression) to the Associate Editor (younk@svm.vetmed.wisc.edu) either as e-mail attachments or by mail (CD) to the address below. I would ask that you please first make the following revisions to your figures:

(1) Figure 1

- add y-axis labels
- delete the P value and boxes with non-infected/infected, as these can be indicated in the legend
- could you confirm the shading is the same for all shaded bars? In the paper copy, some bars appear solid, others hatched.

(2) Figure 2

- change y-axis labels to whole numbers without decimal places (eg, 10, 8, 6)
- the dashed line is difficult to see - can you use a heavier dash?
- remove the P value and the A-non-stimulated test/B-stimulated test, as these can be indicated in the legend

Thank you for submitting your excellent manuscript to Veterinary Clinical Pathology. We look forward to working with you towards its publication. Please do not hesitate to contact me at any time to check on publication status.

Sincerely,

--

Mary M. Christopher, DVM, PhD, Dipl ACVP, Dipl ECVCP
Editor-in-Chief
Vet Med:PMI
University of California
One Shields Ave
Davis, CA 95616
USA
530-752-7970 (tel)
530-752-3347 (fax)
mmchristopher@ucdavis.edu

Evaluation of neutrophil oxidative metabolism in canine monocytic ehrlichiosis¹

Marcia Y. Hasegawa, Aguemi Kohayagawa, Leonardo P. Brandão, Maria Silvia F. A. Morgulis, Mitika K. Hagiwara

Background: Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is a tick borne disease caused by *Ehrlichia canis*, a rickettsia that infects monocytes of dogs. This infection may result in a chronic and life-threatening disease. Thrombocytopenia, mild anemia and leukopenia are the most common hematological findings in CME. **Objective:** To investigate the role of peripheral blood neutrophils in CME, an evaluation of their functional state during the acute phase of the disease in dogs experimentally infected by *E. canis* was conducted. **Methods:** Seven dogs were inoculated with *E. canis* and three remained as non-infected controls. All dogs were submitted to a physical exam and to hematological observations (CBC and NBT reduction test) during a 6-week period. **Results:** There was no difference ($P > .05$) in spontaneous NBT reduction test between the two groups of dogs throughout the six week period of observation. Nevertheless, when stimulated, the neutrophils showed higher activity in the infected group ($P < .05$) on weeks 4 and 5 post-infection. **Conclusion:** We conclude that the infection by *E. canis* has no influence on the neutrophil oxidative metabolism even though during the remission period of acute phase of the disease the neutrophils seem to be more reactive under stimulation.

Key Words: *Ehrlichia canis*, neutrophils, nitroblue tetrazolium, oxidative metabolism.

From the College of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil (Hasegawa, Kohayagawa, Brandão, Morgulis, Hagiwara). Corresponding author: Marcia Y. Hasegawa, College of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 Cidade Universitária, São Paulo, CEP05508-000, Brazil (myhasegawa@usp.br)

¹ Supported by FAPESP (Grant 01/14252-4). This project has been submitted to Bioethical Committee from the College of Veterinary Medicine, University of São Paulo and approved under n°. 151/2002

Introduction

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is a potentially fatal tick borne disease caused by *Ehrlichia canis*,¹ the most pathogenic *Ehrlichia* sp for dogs. The etiologic agent is distributed world-wide, causing extensive morbidity and mortality in dogs. The brown tick *Rhipicephalus sanguineus* is the principal vector of CME,² although the *Dermacentor variabilis* tick can also transmit *E. canis* through experiments.³

Hepatosplenomegaly is common feature during the acute phase.⁴ Once the one to four week acute phase is over, the infection becomes asymptomatic and the parasite can remain in the host for a long period of time.⁵ Finally, the pancytopenia due to the bone marrow depression might lead to death.⁶

There is increasing evidence that immunological mechanisms may be involved in the pathogenesis of the disease. Extensive plasma cells infiltration of the lungs, kidneys, spleen, meninges and eyes were found in CME.^{7,8} The positive direct antiglobulin and autoagglutination tests, and hypergammaglobulinemia^{9,10} that persist in all stages of the disease further support the theory that the disease may have an immunopathologic component.^{11,12} The humoral immune response does not seem to play an important role in the protection against *E. canis*. Yet it has been proposed to contribute to the pathogenesis of the disease.^{8,13} Despite the humoral response, the rickettsia remains in the infected mononuclear cells.¹ Thus, *E. canis* can be isolated¹⁴ or identified by molecular testes (PCR) in dogs showing high antibody titers.¹⁵ It has been proposed that protective immunity in CME is mediated primarily via cellular immune response rather than humoral response.¹³

The role of the spleen in maintaining the infection has been extensively investigated. As it has been known for a long time, the spleen plays a major role in the pathogenesis of

immunomediated disease.¹⁶ It also has a key role in the pathogenesis of CME, as can be observed previously.¹⁷

Although the pathogenesis of acute phase of CME is quite clear, little is known concerning neutrophil function during the course of the disease. As a rule, during viral or protozoal infection, the metabolic activity of neutrophils remains otherwise normal.¹⁸⁻²⁰ Chemotaxis, phagocytosis and microbicidal activity are the mechanisms by which neutrophils act against microorganisms in host defense. Boyden and Boyden's modified (leading front) method, chemotaxis of leukocytes under agarose, phagocytic assay of leukocytes adhered to glass coverslips or in suspension, stained with acridine orange are used for the evaluation of polymorphonuclear (PMN) cells functions.²¹ An indirect test that measures oxygen metabolites generated during phagocytosis, such as nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test and chemiluminescence have been also used.^{22,23}

The reduction of NBT is the most simple test to evaluate the functional ability of neutrophils and has been widely used in humans for the diagnosis of chronic granulomatous disease.²⁴ The test allows, as well, the determination of phagocytosis and metabolic activity of neutrophils in dogs.^{23,25} In normal dogs 2 to 14% of neutrophils may show a positive NBT reaction.¹⁸ When stimulated, the amount of positive neutrophils can be higher.²²

In CME, the impairment of the immune system in the acute phase of infection might lead the infected dog to be more susceptible to secondary infections,²⁶ and this may occur by the reduction of the functional status of peripheral neutrophils. Brandonisio et al²⁰ observed that superoxide anion and hydrogen peroxide production by PMN cells was significantly lower in *Leishmania*-infected dogs.

The purpose of this study was to evaluate the functional state of peripheral blood neutrophils in dogs in order to investigate the role of PMN during the acute phase of CME.

Materials and Methods

Animals

Ten mongrel dogs, three to four years old, three males and seven females, bred under tick-free conditions (Front line top spot – Merial Animal Health) at the Department of Medical Clinics, Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo were included. All dogs were free of anti-*E. canis* antibody (IFA) and negative in the polymerase chain reaction (PCR) for *E. canis*. Seven dogs (two males and five females) were inoculated by intravenous route with 5.0 (five) mL of peripheral blood containing morulae of *E. canis* obtained from a dog previously inoculated with a local strain of *E. canis* (Immunoparasitology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, São Paulo State University, Jaboticabal, Brazil). Three dogs (one male and two females) were kept as non-infected controls. The dogs were submitted to a physical examination daily. Blood was collected for hematology (total leukocyte count, NBT test) and PCR²⁷ (Virology Laboratory, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu, Brazil) on days 0 and weeks 2, 3, 4, 5 and 6 post-infection. Blood obtained from capillaries veins was stained in thin blood smears and examined for the presence of morulae.²⁸

White blood cell counting

The total leukocyte count was obtained using an automatic blood analyzer (ABC^{TM} VET, ABX'S, France). Blood smears were stained by May-Grünwald Giemsa stain.

Nitroblue tetrazolium reduction test (NBT)

The NBT reduction to formazan by canine neutrophils was assayed using a commercially available kit (NBT, Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) as described by Ciarlini et al.²⁹ Briefly, 50µL of NBT solution was added to 50µL of heparinized blood in an

eppendorf tube. In another eppendorf tube, 50µL of NBT solution was added to 25µL of heparinized blood plus 2,5µL - inactivated bacterium extract (Stimulant, Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). After incubation (37°C, 10 minutes in water bath followed by incubation at room temperature for 10 minutes) blood smears were made and stained by May-Grünwald Giemsa stain. Three slides were made for each sample and examined by optical microscope under oil immersion objective (100x). The slides were read and confirmed blindly by two persons. The mean values of neutrophils containing intracytoplasmically purplish-black granules (formazan crystals) obtained on three slides were calculated. The results were expressed as percentage of NBT positive cells.

Statistical analysis

The mixed model for the analyses of repeated measures designs in animal studies³⁰ was used. The data was analyzed using Proc Mixed Procedure and mean separation was performed using means probability of difference (SAS®, Statistical Analysis Software, version 8.2, SAS Institute, Cary, NC). This procedure implements random effects in the statistical model, and can compute efficient estimates of fixed effects and valid standard errors of the estimates.³¹ The level of significance was set at $P < .05$.

Results

Fever, splenomegaly, lymphadenomegaly, weight loss, anorexia and lethargy were the main clinical symptoms observed in all inoculated animals as early as the first week, lasting until the 6th week post-infection. Intermittent fever (39.8°C to 41.7°C) and *E. canis* morulae were detected in all inoculated dogs at least in one occasion, between the second to fourth week post-infection in the capillary blood but not in the peripheral blood. Starting on the fifth

week of infection, the amelioration of clinical signs, the gradual reduction of lymph node hyperplasia and the disappearance of *E. canis* from peripheral or capillary blood indicated overcoming of the acute phase. In spite of this, PCR remained positive in all dogs (Table 1).

Anemia and thrombocytopenia were observed in all dogs starting on the second week post-infection. No significant alterations in WBC counting were observed (Figure 1), but lymphopenia ($P < .05$) found in the second week post-infection was the only significant feature. The oxidative metabolism of neutrophils was similar in both infected and non-infected dogs (Figure 2A) during all the experimental period. Notwithstanding, under stimulation, a higher reduction capability of NBT ($P < .05$) (Figure 2B) was observed in dogs with CME.

Discussion

The general and nonspecific symptoms observed in all infected animals from the second to the 6th week post-infection have been previously reported by Woody & Hoskins⁹ and Neer²⁶ and are considered quite common in the acute phase of the disease. Bleeding tendencies or pancytopenia that may occur in the chronic or terminal phase⁴ were not observed during the period embraced by the study. Splenomegaly, a common finding in canine ehrlichiosis^{8,32} and positive PCR results were observed during the whole course of the study. The role of the spleen in the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis has been extensively investigated.³³ The extensive plasma cell infiltration of spleen,^{8,17,34} with liberation of inflammatory and/or other splenic substances, has a key role in the pathogenesis of the canine ehrlichiosis. *E. canis* can be localized in the parenchymal organs, like spleen, during the subclinical phase, and can stay there until the completely elimination by the host.¹⁷

Mild leukocyte alterations, as observed, are quite common during the acute phase.²⁶ Transient lymphopenia may be explained due to corticosteroids liberation during the acute phase of infection,³⁵ with *E. canis* replication in mononuclear phagocytic cells of the spleen, liver and lymph nodes.⁴

The neutrophils ability of reducing NBT was maintained in *E. canis* infected dogs throughout the acute phase, thus suggesting no impairment or any influence of the erlichial infection on circulating PMN cells. As a rule, a variable increase on neutrophils's oxidative activity of dogs can be observed in bacterial, viral or parasitic infections.^{18-20,22,23} Nevertheless, when stimulated, the NBT reduction test was higher in the infected dogs, mainly in the fourth and fifth week, lasting until the subsequent week of infection. Coincidentally, the resolution of parasitemia occurred in the fifth week of infection, and the lymph nodes reduction in the sixth week. There are some evidences that splenic substances³³ and other inflammatory substances released by the liver during the acute stage of disease³⁶ and their concentrations that were shown to increase during acute CME³⁷ could be involved in this higher neutrophilic activity. C-reactive protein, the major acute phase protein in dogs, has the ability to improve neutrophilic phagocytic function.³⁶ The host response and the high oxidative capacity of PMN cells, when stimulated, may lead to the limitation of the infection that might persist only in reticuloendothelial tissue.^{8,33} Otherwise, as quoted by Brandionisio et al.,²⁰ in *Leishmania*-infected dogs, the low killing activity of PMN cells could contribute to the maintenance of the infection.

In conclusion, the results of this study suggested that the infection by *E. canis* has no negative influence in the functional state of peripheral blood neutrophils and that in the acute phase of the disease these cells are more reactive.

Acknowledgements

The authors express gratitude to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CNPq and CAPES for financial support.

References

1. Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AWCA. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2745-2749.
2. Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res.* 1975;36:937-940.
3. Johnson EM, Ewing AS, Barker RW, Fox, JC, Crow DW, Kocan K. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichiae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 1998;74:277-288.
4. Swango LJ, Bankemper KW, Kong LI. Bacterial, rickettsial, protozoal, and miscellaneous infections. In: Ettinger SJ. *Textbook of veterinary internal medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1989:265-297.
5. Codner EC, Farris-Smith LL. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;189:47-50.
6. Troy GC, Forrester SD. Canine ehrlichiosis. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1990:404-418.
7. Hildebrandt PK, Huxsoll DL, Walker JS, Nims RM, Taylor R, Andrews M. Pathology of canine ehrlichiosis (Tropical canine pancytopenia). *Am J Vet Res.* 1973;34:1309-1320.

8. Castro MB, Machado RZ, Aquino LCCT, Alessi AC, Costa MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol.* 2004;119:73-86.
9. Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1991;21:75-98.
10. Harrus S, Day MJ, Waner T, Bark H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol.* 2001;83:343-349.
11. Waner T, Harrus S, Weiss DJ, Bark H, Keysary A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 48:177-182.
12. Waner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen AWCA. Review – Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol.* 2001;95:1-15.
13. Ristic M, Holland CJ. Canine ehrlichiosis. In: Woldechiwet Z, Ristic M. *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*. Oxford: Pergamon Press; 1993:169-186
14. Nyindo MBA, Ristic M, Huxsoll DL, Smith AR. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent: *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res.* 1971;32:1651-1658.
15. Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1852-1855.
16. Lewis DC, Meyers, KM. Canine idiopathic thrombocytopenia purpura. *J Vet Int Med.* 1996;10:207-218.

17. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol*. 1998;36:73-76.
18. Poli G, Nicoletti G, Faravelli G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) test nel cane. *Folia Vet Lat*. 1973;3:215-239.
19. Murata T, Tagami R, Inoue M, Uzuka Y, Taura Y, Nakama S. Investigation of nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in the dog infected with *Hepatozoon canis* [abstract]. *Jikken Dobutsu*. 1994;43:101-103.
20. Brandonisio O, Panunzio M, Faliero SM, Ceci L, Fasanella A, Puccini V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum* – infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996;53:95-103.
21. Chammas PPC, Hagiwara MK. Evaluation of neutrophilic function (chemotaxis, phagocytosis and microbicidal activity) in healthy dogs and in dogs suffering from recurrent deep pyoderma. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998;64:123-131.
22. Breitschwerdt EB, Brown TT, De Buyscher EV, et al. Rhinitis, pneumonia, and defective neutrophil function in the Doberman Pinscher. *Am J Vet Res*. 1987;48:1054-1062.
23. Nagahata H, Sako T, Reiter JÁ, Dibartola CG, Couto CG, Kociba GJ. Neutrophil, adherence, phagocytic-nitroblue tetrazolium reduction and chemiluminescence in canine whole blood. *Vet Res Communic*. 1991;15:181-188.
24. Park BH, Holmes BM, Rodey GE, Good RA. Nitroblue tetrazolium test in children with fatal granulomatous disease and newborn infants. *Lancet*. 1969;1:157.
25. Stickle JE. The neutrophil – function, disorders, and testing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1996;26:1013-1021.
26. Neer TM. Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: Greene, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2th ed. Philadelphia: Saunders; 1998:139-154.

27. Bulla C, Takahira RK, Araujo Jr JP, Trinca LA, Lopes RS, Wiedmeyer CE. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet Res.* 2004;35:141-146.
28. Elias E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *J Small Anim Pract.* 1991;33:540-543.
29. Ciarlini PC, Ciarlini LDRP, Alencar NX, Kohayagawa A, Rodrigues CFC. Metabolismo oxidativo de neutrófilos em ovelhas naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais e correlação entre nível sérico de cortisol e carga parasitária. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002;54:1-7.
30. Wang Z, Goonewardene LA. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Can J Anim Sci.* 2004;84:1-11.
31. Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci.* 1998;76:1216-1231.
32. Hibler SC, Hoskins JD, Greene CE. Rickettsial infections in dogs. Part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1986;8:106-114.
33. Harrus S, Waner T, Keysary A, Aroch I, Voet H, Barl H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;62:15-27.
34. Reardon MJ, Pierce KR. Acute experimental canine ehrlichiosis I Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet Pathol.* 1981;18:48-61.
35. Jain NC. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993:417.
36. Tizard IR. Lymphocytes. In: Tizard IR. *Veterinary immunology: an introduction*. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000:84-97.
37. Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, et al. C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol.* 1994;32:912-917.

Table 1. Number of dogs showing splenomegaly, lymphadenomegaly, morulae and/or positive PCR test during the acute phase of canine ehrlichiosis. São Paulo, 2004.

Number of dogs with	Week						
	0	1	2	3	4	5	6
Splenomegaly	0	1	7	7	7	7	7
Lymphadenomegaly	0	0	5	7	6	5	0
Morulae (capillary blood)	0	0	5	4	3	0	0
PCR (+)	0	**	7	**	7	**	7

** Not performed

Figure 1. Mean $\pm$ SD for WBC, differential leukocyte (A), neutrophil (B) and lymphocyte (C) counts (/μL) of non-infected $\blacksquare$ and infected dogs $\square$ with *E. canis* during the acute phase of the disease. * $P < .05$

Figure 2. Relative frequency of NBT positive neutrophils of the in dogs non-infected (---) and infected (—) with *E. canis* during the acute phase of the disease. (A) Non-stimulated test. (B) Stimulated test. * $P < .05$