

Simone Magela Moreira

**ESTUDO RETROSPECTIVO (1998-2001) DA ERLIQUIOSE CANINA EM BELO
HORIZONTE: AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE INFECÇÕES
EXPERIMENTAIS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof^a Lygia Maria Friche Passos

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2001

M183e
2001

Moreira, Simone Magela, 1971-

Estudo retrospectivo (1998-2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte: avaliação clínica e laboratorial de infecções experimentais / Simone Magela Moreira. – Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.

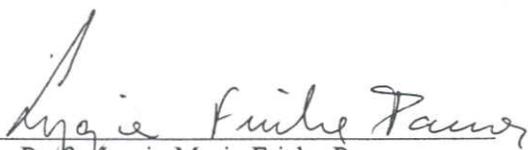
41p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

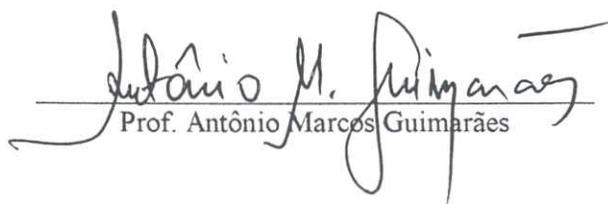
1. Cão – Doenças – Teses. 2. Erlichia – Infecção – Teses. 3. Epidemiologia- Teses. I. Título.

CDD-636.708 96

Dissertação defendida e aprovada em 29 de outubro de 2001, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Lygia Maria Friche Passos
(Orientadora)



Prof. Antônio Marcos Guimarães



Prof. Roberto Baracat de Araújo



Prof. Romário Cerqueira Leite



Prof. José Oswaldo Costa

"... vendo então as costas
daquele tempo decorrido, o
mesmo tempo que eu um dia, os
pés acorrentados, abaixava os
olhos para não ver-lhe a cara."

Raduan Nassar

AGRADECIMENTOS

Na execução deste trabalho, contei com a colaboração de diversas pessoas e instituições às quais gostaria de deixar registrado o meu mais profundo agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço a meu pai, que sabe cultivar a responsabilidade e o amor em tudo que faz. A ele meu amor e eterno agradecimento pelo carinho, apoio, compreensão e amizade.

À minha mãe que, de onde estiver, vela e acompanha, com aquele olhar terno e meigo, todos os passos do meu caminho.

À professora e orientadora, Lygia Maria Friche Passos que sempre serviu de exemplo, apoiando-me e acreditando nos resultados. Obrigada pelas inúmeras horas dedicadas à realização deste trabalho e ao meu aprimoramento pessoal.

À querida amiga Camila, por tantas horas de empenho na realização deste trabalho.

Ao professor e amigo, Alfredo de Miranda Goes, pela confiança e ensinamentos ministrados no mais animado e competente laboratório em que estive.

A professora Rozângela Zacarias Machado, do Departamento de Patologia da UNESP-Jaboticabal, pela doação do inóculo de *Ehrlichia canis*, por importantes orientações e exemplo profissional.

Simone B. Calic da FUNED- MG pela importante doação de lâminas para a reação de imunofluorescência, além de compartilharmos idéias e alegres momentos com sua importante equipe de laboratório.

À minha querida amiga, professora Maria de Fátima Leite, pelos ensinamentos, acolhimento e delicadeza no falar e ensinar.

Ao Felipe, que esteve ao meu lado na fase final, período no qual encontrava-me mais necessitada de carinho e apoio. Obrigada por cada momento, por compartilharmos alegres horas de "ensaios" sobre filosofia, mitologia, psicologia e outras aventuras pelos caminhos do conhecimento. Agradeço por muitas traduções, correções e seu jeito sério de ser.

Ao Ernesto, meu profundo carinho pelo apoio e incentivo, por acreditar em mim, quando eu mesma duvidei de minha capacidade.

Um agradecimento especial aos professores Zélia, Andrey e Maurílio pela paciência e auxílio, fornecendo orientações e materiais para a parte inicial deste trabalho.

Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhada, pelo apoio, pelos incentivos e pequenas alegrias que tornam o nosso caminho mais bonito.

À amiga Lídia, pelos 20 anos de amizade e cooperação e acolhimento, vindos também por parte de seus familiares.

Aos amigos do ICB, Laboratório de Imunologia Celular, pelos momentos de alegria e trabalho que realizamos juntos.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que sempre se dispuseram a me ajudar em todos os momentos. Destacando-se os amigos Ricardo e André, pelos inúmeros serviços prestados com a competência que lhes é característica.

Ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, pela confiança e amizade. À professora Vera Alvarenga, pelas palavras amigas e pelo constante exemplo de profissionalismo. Um agradecimento especial ao amigo e técnico, Manoel dos Santos por todo empenho nos diagnósticos.

Um carinho especial à Marilene e Mel, minhas amigas do Laboratório de Patologia, pelo carinho e atenção. Ao Adão que, sempre disponível, ajudou-me nos momentos difíceis. Ao novo amigo Fernando, pela paciência e atenção. E à Fabiana, minha amiga de docência, um agradecimento mais que especial.

Um cheirinho especial ao Nego, Pierry, Branca, Joe e Lessie. Em especial à Xuxa, por além de ser uma boa companhia, ter-me fornecido material biológico para vários estudos que iniciei. E à Miucha, pelas noites em claro em que me acompanhou, deitada sobre os livros e anotações

Ao Centro Oriente e amigos da doutrina, por me ajudarem, oferecendo amizade e ajuda para ver a vida de uma forma mais cristã e fraterna. Obrigada em especial à Neulita, Glória, Anne e Linda, que confiaram em mim, e me auxiliaram na coordenação das tarefas.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. LITERATURA CONSULTADA	14
2.1 Ciclo biológico e transmissão	14
2.2 Aspectos epidemiológicos	15
2.3 Sintomas clínicos	17
2.4 Alterações hematológicas	18
2.5 Diagnóstico	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Banco de dados	20
3.2 Infecções experimentais	21
3.2.1 Animais	21
3.2.2 Inóculo	21
3.2.3 Monitoramento das infecções	21
3.2.4 Exames sorológicos	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Características epidemiológicas	22
4.2 Alterações clínicas	26
4.2.1 Infecções naturais	26
4.2.2 Infecções experimentais	28
4.3 Alterações hematológicas	30
4.3.1 Infecções naturais	30
4.3.2 Infecções experimentais	31
5 CONCLUSÕES	35
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Distribuição por faixa etária e sexo de cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Ehrlichia platys</i> atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001..	24
TABELA 2 Distribuição por raça de cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Ehrlichia platys</i> atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001	24
TABELA 3 Ocorrência de infecção por <i>Ehrlichia canis</i> em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001, considerando-se histórico e/ou presença de carrapato e tipo de moradia	25
TABELA 4 Ocorrência de infecção por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Ehrlichia platys</i> em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001, considerando-se a origem dos animais	25
TABELA 5 Alterações do sistema respiratório em infecções por <i>Ehrlichia canis</i> em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001	27
TABELA 6 Alterações hemorrágicas em infecções por <i>Ehrlichia canis</i> em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001	27

TABELA 7 Alterações nervosas em infecções por <i>Ehrlichia canis</i> em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001	28
TABELA 8 Valores do eritrograma (Média \pm desvio padrão) de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i>	33
TABELA 9 Valores do leucograma (Média \pm desvio padrão) de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i>	34
TABELA 10 Valores da contagem de plaquetas (Média \pm desvio padrão) dos animais experimentalmente infectados por <i>E. canis</i>	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Distribuição mensal de diagnósticos de erliquiose canina no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, no período de março de 1998 a setembro de 2001	22
FIGURA 2 Diagnósticos de hemoparasitoses em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001	23
FIGURA 3 Frequência absoluta dos sinais clínicos observados em cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001..	26
FIGURA 4 Valores médios da temperatura retal de cães experimentalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i>	28
FIGURA 5 Fotomicrografias de esfregaços sangüíneos de cão infectado com <i>Ehrlichia canis</i> . Presença de mórula no interior de monócito.....	29
FIGURA 6 Percentual do tipo de célula infectada por <i>Ehrlichia canis</i> em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001	30
FIGURA 7 Fotomicrografia de esfregaço de punção de medula óssea de cão experimentalmente infectado por <i>Ehrlichia canis</i> . Presença do agente em multiplicação.	32
FIGURA 8 Reação de imunofluorescência indireta de soro de cão coletado 14 dias após infecção experimental com <i>Ehrlichia canis</i> . Visualização dos três estádios de desenvolvimento intracelular do agente: corpos elementares; corpos iniciais; mórula.....	33

RESUMO

O presente trabalho descreve um estudo retrospectivo da casuística clínica de erliquiose em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, de março de 1998 a setembro de 2001 e a avaliação clínica e laboratorial de cães experimentalmente infectados com amostra brasileira *Ehrlichia canis*. Das fichas com confirmação laboratorial de *Ehrlichia canis* e *E. platys* foram considerados aspectos demográficos (idade, raça, sexo, época do ano e região de origem), parâmetros clínicos (temperatura corporal, presença e/ou histórico de carrapatos e sinais clínicos) e parâmetros hematológicos (hemograma completo e célula parasitada). Foram analisadas 194 fichas com suspeita clínica de hemoparasitoses, das quais 31 animais encontravam-se infectados com *E. canis* e 21 com *E. platys*. O número de diagnósticos positivos para erliquiose aumentou consideravelmente a partir de 2000, sendo que 24,4 % dos casos ocorreram em animais entre 13 e 24 meses. Os sintomas mais frequentes foram febre, anorexia, apatia, dor abdominal, linfadenopatia e dispnéia. Quanto às alterações hematológicas, 70,3% dos animais apresentaram anemia, 50% apresentaram trombocitopenia e 30% leucopenia. A grande maioria das infecções por *E. canis* foi visualizada em monócitos. Os cães experimentalmente infectados foram monitorados durante a fase aguda da infecção através de exame clínico, hemograma completo, pesquisa da riquetsia e sorologia. Os períodos pré-patente variaram de 11 a 13 dias, os sinais clínicos foram febre, palidez de mucosas, linfadenopatia, secreções óculo-nasal serosa e acentuada perda de peso. A detecção da riquetsia em esfregaços sangüíneos mostrou ser um método de diagnóstico limitado, porém estádios de *E. canis* foram visualizados no material aspirado da medula óssea. Os resultados demonstram que, apesar da crescente casuística clínica de erliquiose canina em Belo Horizonte, os métodos de diagnóstico disponíveis são ainda limitados e que a punção de medula pode ser utilizada para a detecção precoce de *E. canis* na fase aguda da infecção.

Palavras –chave: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys*, epidemiologia, cães, infecção experimental.

ABSTRACT

The present work describes a retrospective study of cases of ehrlichiosis in dogs examined at the Veterinary Hospital (Universidade Federal de Minas Gerais) from March, 1998 to September, 2001, and the clinical and laboratorial evaluation of dogs experimentally infected with a Brazilian *Ehrlichia canis* isolate. From the clinical records with laboratorial confirmation of *Ehrlichia canis* or *E. platys* infections, the following parameters were considered: demographic aspects (age, race, sex, period of the year and origin), clinical parameters (body temperature, exposure to ticks and clinical signs), and hematological parameters (blood cell counts and type of infected cell). A total of 194 clinical records were analyzed, from which 31 animals were infected with *E. canis* and 21 animals with *E. platys*. The number of cases of canine ehrlichiosis increased considerably from 2000, and 24,4% of the cases occurred in 13- to 24-month-old animals. The most frequent symptoms were fever, anorexia, apathy, abdominal pain, lymphadenopathy and dispnea. Regarding hematological alterations, 70,3% of the animals presented anemia, 50% presented thrombocytopenia and 30% leukopenia. The great majority of *E. canis* infections were detected in monocytes. The experimentally infected dogs were monitored during the acute phase through clinical examination, blood cell counts, blood and bone marrow direct examination, and serology. The pre-patent periods ranged from 11 to 13 days, and the clinical signs were fever, pallidal membranes, lymphadenopathy, serous nasal secretions and accentuated weight loss. The results indicate that detection of *Ehrlichia canis* in blood smears is a limited diagnostic method; however stages of *E. canis* were visualized in the bone marrow aspirate. Although the number of clinical cases of canine ehrlichiosis is increasing in Belo Horizonte, the diagnostic methods available are still limited, and the bone marrow aspirate can be useful for early detection of *E. canis* during the acute phase of infection.

Key words: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys*, epidemiology, dogs, experimental infection.

1. INTRODUÇÃO

A erliquiose canina é uma enfermidade infecciosa que acomete essencialmente cães domésticos (Ewing, 1969; Huxsoll et al., 1970) e outros membros susceptíveis da família Canidae como lobos, raposas e coiotes (Harvey et al., 1979).

Várias espécies do gênero *Ehrlichia* podem causar infecções em cães, incluindo *E. canis*, *E. platys*, *E. equi*, *E. risticii* (Woody & Hoskins, 1991), *E. ewingii* e *E. chaffeensis* (Breitschwerdt et al., 1998). Dessas espécies, a mais freqüente é a *E. canis* que determina, segundo vários estudos, o quadro clínico mais severo (Hoskins et al., 1983; Waner et al., 1995) com alta morbidade e variada mortalidade em cães (Donatien & Lestoquard, 1935; Ewing, 1969; Huxsoll et al., 1970).

A *Ehrlichia canis*, do grupo das riquetsias – hoje considerada uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória que infecta leucócitos (Harrus et al., 1997; Woody & Hoskins, 1991) e independente metabolicamente (Weiss et al., 1982) - foi reconhecida e descrita primeiramente por Donatien & Lestoquard (1935) em cães infestados por carrapatos na Argélia. A taxonomia a define como um parasita pertencente à ordem das Rickettsiales, família Rickettsiaceae, tribo Ehrlichieae, gênero *Ehrlichia*, espécie *E. canis* (Ewing, 1969). Outra espécie, *E. platys* foi descrita por Harvey et al. (1978), e considerada uma pequena riquetsia, apresentando uma ultra-estrutura similar à *E. canis* que infecta preferencialmente os trombócitos, sem apresentar reação sorológica cruzada com outras erliquias (French & Harvey, 1983).

A erliquiose, que nos últimos anos, tornou-se uma das mais importantes doenças de cães nos Estados Unidos (Woody & Hoskins, 1991), tem sido relatada em regiões tropicais e subtropicais, incluindo África, Sul da Ásia, Caribe e em quase todo o continente americano, associando-se à presença do *Rhipicephalus sanguineus*, considerado o principal vetor biológico, sendo também transmitida mecanicamente

por transfusões sangüíneas. No Brasil, a *E. canis* foi diagnosticada pela primeira vez em Belo Horizonte, MG por Costa et al. (1973) que identificaram inclusões citoplasmáticas, em linfócitos de um cão infectado naturalmente. Em 1993, um estudo demonstrou a incidência de 1,98% entre os cães atendidos no Hospital Veterinário da UNESP - Jaboticabal (Castro, 1997). Na cidade de Curitiba-PR, um caso foi relatado por Kavinski et al. (1988), e em Campo Grande-MS, 227 cães foram diagnosticados com erliquiose em um estudo retrospectivo de 1993 a 1997 (Babo & Munhoz, 1998).

O diagnóstico da erliquiose é feito através da sintomatologia clínica e exames laboratoriais para pesquisa de inclusões da riquetsia (mórulas) no citoplasma de leucócitos ou plaquetas em esfregaços sangüíneos. Entretanto, a mórula, por ser visualizada apenas na fase aguda da doença, é de difícil identificação, já que o percentual de células infectadas raramente ultrapassa 1% (Cadman et al., 1994). Na infecção por *E. platys*, este método de detecção é ainda mais limitado, devido à parasitemia inicialmente cíclica, com microorganismos raros ou ausentes quando a contagem de plaquetas está baixa (French & Harvey, 1983).

Observa-se hoje, na clínica de pequenos animais, uma necessidade crescente de métodos de diagnóstico mais sensíveis para a erliquiose canina, que facilitem o tratamento específico dos casos positivos, os quais vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos (Carneiro, 2001).

Além da necessidade de pesquisas que melhorem as técnicas preventivas, há também carência de estudos que possam dar subsídios aos clínicos de pequenos animais quanto aos diferentes aspectos epidemiológicos da doença (Alves et al., 1995). O método de estudo epidemiológico segue os mesmos passos que o método clínico, aplicando-se à comunidade, com o objetivo de produzir conhecimento capaz de promover a saúde individual através de

medidas de alcance coletivo (Almeida Filho & Rouquayrol, 1992); ao passo que o método clínico é um sistema aplicado ao indivíduo doente, cuja finalidade é estabelecer um diagnóstico e instituir um tratamento (Maletta, 1988).

Apesar da importância crescente da erliquiose canina, pouco se conhece sobre seus aspectos epidemiológicos e clínicos em Minas Gerais e no Brasil. Assim, o presente estudo teve como objetivos:

a) *Objetivos Gerais:*

- Avaliar a ocorrência de casuística clínica e alguns aspectos epidemiológicos da erliquiose em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, no período de março de 1998 a setembro de 2001;
- Avaliar clínica e laboratorialmente cães experimentalmente infectados com amostra brasileira de *E. canis*.

b) *Objetivos Específicos:*

- Compilar as alterações clínicas, a partir das informações obtidas em fichas de cães naturalmente infectados e com diagnóstico laboratorial confirmado para *E. canis* e *E. platys*;
- Compilar as alterações hematológicas de cães naturalmente infectados e com diagnóstico laboratorial confirmado para *E. canis* e *E. platys*;
- Avaliar os parâmetros clínicos durante a fase aguda da infecção experimental por *E. canis*;
- Avaliar o eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas na fase aguda da infecção experimental por *E. canis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A doença causada por *E. canis*, conhecida como Pancitopenia Tropical Canina, Riquetsiose Canina, Febre Hemorrágica Canina ou Erliquiose Monocítica Canina, é

freqüentemente referida como erliquiose canina. Importantes avanços no estudo das erliquioses ocorreram após uma grave epizootia, que resultou na morte de aproximadamente 300 cães militares, de 1968 a 1970 (Huxsoll et al., 1970). Esse fato promoveu o desenvolvimento de um método para cultivo *in vitro* de *E. canis* (Nyindo et al., 1971; Ristic et al., 1972) permitindo a produção de antígenos e conseqüente identificação sorológica dos cães infectados.

Leucócitos apresentando inclusões de *E. canis* (denominadas mórulas) são achados característicos da erliquiose canina. Keysary et al. (1996), demonstraram que a mórula é formada por uma membrana dupla, originária da célula hospedeira, separando do citoplasma os organismos individualmente ou em pequenos grupos. As mórulas podem ser de tamanhos variados, densamente compactadas no interior de vacúolos ou podem apresentar-se como substâncias filamentosas envolvendo microorganismos pleomórficos. A multiplicação no interior desses vacúolos se dá por divisão binária.

2.1. Ciclo biológico e transmissão

O ciclo de vida da *E. canis* não está completamente descrito. Em 1971, Nyindo et al., após implantarem o primeiro cultivo *in vitro* de *E. canis*, descreveram um ciclo específico de desenvolvimento no interior dos monócitos caninos. As primeiras formas apareceram após 48 horas de incubação, como corpos elementares adjacentes ao núcleo. Nos dois a três dias seguintes, essas estruturas elementares aumentaram em número, levando a formações denominadas inclusões imaturas ou corpos iniciais, os quais foram reconhecidos como estruturas pleomórficas de aproximadamente 0,5 a 2,5 μm de diâmetro. Durante os sete a doze dias seguintes de incubação, essas formas imaturas desenvolveram-se formando inclusões maduras ou mórulas. Estas eram maiores que os corpos iniciais, de formato oval, ocorrendo em grande número (foram vistas 70 inclusões em uma única célula), nitidamente individualizadas. Os monócitos infectados eram de três a quatro vezes

maiores que os normais e podiam apresentar dois ou três núcleos, sendo muito raramente encontrados em processo de mitose. Em um período de 12 a 18 dias de incubação, as mórulas se dissociaram formando vacúolos individuais, os corpos elementares, que aparentemente eram liberados do citoplasma da célula hospedeira.

Segundo Smith et al. (1976), a grande variedade de riquetsias não patogênicas que infectam carrapatos sugere que *E. canis* seja primariamente um parasita do artrópode que afeta o hospedeiro vertebrado secundariamente. Diversos autores afirmam que o organismo passa por estádios de desenvolvimento similares nas células do carrapato e no citoplasma dos leucócitos do hospedeiro vertebrado.

O mecanismo de transmissão natural da erliquiose canina se dá através do *Rhipicephalus sanguineus* que, ao se alimentar, inocula saliva contaminada com a riquetsia em animais susceptíveis (Groves et al., 1975). O *R. sanguineus* é um carrapato trioxeno e todas as três fases de desenvolvimento (larva, ninfa e adulta) podem transmitir a doença, com os estádios adultos mantendo a capacidade de transmissão por até 155 dias (Lewis Jr. et al., 1977). O *Amblyomma americanum* e o *Otobius megnini* são vetores potenciais da doença (Woody & Hoskins, 1991). As transfusões sanguíneas e a inoculação experimental são também capazes de reproduzir a enfermidade (Davoust et al., 1991a). Lewis Jr. et al. (1977) relataram que o sangue de um cão cronicamente infectado, por mais de cinco anos, utilizado em uma transfusão, foi causa de doença para o cão transfundido.

A transmissão para o cão ocorre quando o carrapato infectado contamina com secreções salivares o local da picada durante a ingestão sanguínea. Essas secreções e a lesão tecidual desencadeiam uma reação local, atraindo células mononucleares para o sítio inflamatório, facilitando a infecção dos monócitos (Woldehiwet & Ristic, 1993). A riquetsia pode permanecer no sangue de cães que

se recuperam da fase aguda por muitos anos (Groves et al., 1975). Porém, Lewis Jr. et al. (1977), afirmaram que estes animais cronicamente infectados não constituem reservatórios naturais da doença, visto que os carrapatos somente se infectam ao se alimentarem em cães durante as primeiras semanas da infecção aguda, período no qual há uma maior porcentagem de células sanguíneas parasitadas. Davoust et al. (1991a) confirmaram que carrapatos alimentados em cães parasitados, durante a fase crônica, não foram capazes de transmitir a infecção. Portanto, o *R. sanguineus*, melhor que os cães, atua como reservatório primário da doença.

No carrapato infectado, a *E. canis* se multiplica nos hemócitos, mesogastro, células da glândula salivar, e infecta células epiteliais do trato digestivo (Smith et al., 1976; Lewis Jr. et al., 1977). Em 1975, Groves et al. ao relacionarem o *R. sanguineus* com *E. canis*, evidenciaram a transmissão transtesticular, sem a transmissão transovariana no artrópode. Smith et al. (1976), com o auxílio da imunofluorescência e da microscopia eletrônica, comprovaram esta afirmativa, observando inclusões intracitoplasmáticas, formadas pelo parasito em células intestinais e na glândula salivar de carrapatos infectados. Entretanto, estas inclusões ou suas remanescências não foram encontradas nos ovários. Os autores verificaram ainda que machos e fêmeas são igualmente capazes de transmitir a doença.

A sobrevivência da riquetsia por longos períodos pode significar que o organismo passe o inverno no carrapato, que ao reinfestar os cães nas estações seguintes, completaria o ciclo. Assim, o *R. sanguineus* transmite a doença com grande sucesso devido sua ampla distribuição, sua habilidade de sobreviver em condições adversas e sua resistência aos acaricidas (Lewis Jr. et al., 1977).

2.2. Aspectos epidemiológicos

O método epidemiológico se inicia a partir de informações obtidas de dados primários, com subsequente estudo de múltiplos

determinantes (qualquer característica que afete a saúde da população), visando a um diagnóstico global e posterior intervenção. As informações relativas ao hospedeiro são de grande valor, pois fornecem elementos úteis não somente para o diagnóstico, mas também para a execução de medidas terapêuticas e preventivas (Maletta, 1988). A influência do hospedeiro na ocorrência de doenças foi reforçada por Robinson (1967) ao salientar que o risco de algumas patologias em cães varia com a idade, raça e sexo, pois várias enfermidades têm maior impacto em determinadas faixas etárias e o estudo dessas variações ajuda a compreender os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da doença.

É importante destacar que na população canina são considerados jovens aqueles cães com idade inferior a um ano e idosos aqueles com mais de oito anos (Eckersley et al., 1992). A idade foi analisada por Ewing (1969) que considerou a infecção por *E. canis* uma enfermidade que pode passar despercebida, exceto em filhotes muito jovens, nos quais geralmente é fatal. Já Greene et al. (1985), estudando a ocorrência da erliquiose canina em quatro estados americanos, relataram maior distribuição em cães de meia-idade, sem diferenciação por gênero, e mais freqüentemente em animais de raça pura.

A diferença na susceptibilidade entre raças é considerada um fator determinante da patogenia da erliquiose canina (Woody & Hoskins, 1991; Breitschwerdt, 1995). Codner & Farris-Smith (1986) mencionaram que diferenças na susceptibilidade podem afetar a duração da doença, além de constatarem que os sinais clínicos tendem a ser mais severos em Beagles experimentalmente infectados do que em cães sem raça definida (SRD). Os autores relataram ainda, em cães da raça Pastor Alemão, natural ou experimentalmente infectados, uma severa síndrome hemorrágica, associação esta também observada por Huxsoll et al. (1972).

Vários autores citam que infecções por organismos do gênero *Ehrlichia* causam, no cão, sinais clínicos diferenciados,

dependendo da espécie infectante e da célula parasitada. Woody & Hoskins (1991), em conformidade com outros autores, afirmam ser a *E. canis* a mais patogênica para este hospedeiro e que, como a *E. risticii*, invade primariamente leucócitos mononucleares (principalmente monócitos), enquanto que a *E. equi* parasita leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), estas diferenciam-se da *E. platys* que invade os trombócitos. Em uma pesquisa realizada por Dawson et al. (1991), a avaliação da reatividade do soro de um paciente frente a antígenos de *E. canis* originários da Flórida e Oklahoma revelou variação nos títulos de anticorpos, sugerindo a ocorrência de duas amostras diferentes. Em 1996, Keysary et al. constataram uma terceira amostra em um animal naturalmente infectado em Israel.

Reardon & Pierce (1981) descreveram a erliquiose canina, limitada à área de incidência do seu artrópodo vetor, o *R. sanguineus*, cujo ciclo é altamente influenciado por variações de temperatura e umidade (Heath, 1979). Keysary et al. (1996) constataram que a erliquiose canina é prevalente em Israel, onde a forma aguda de doença é diagnosticada predominantemente nos meses do verão.

Dentre os animais de companhia, o cão é a espécie de predileção (Assis et al., 1996). Silva (1980), em Belo Horizonte, encontrou a relação de 8,62 pessoas por cão, tornando evidente que a estreita associação entre o homem e a espécie canina apresenta, além das naturais implicações de ordem afetiva, importantes implicações de ordem sanitária (Rangel, 1980).

Nas últimas décadas, as erliquioses surgiram relacionando-se à saúde pública nos Estados Unidos. Vários relatos de pacientes testados sorologicamente foram positivos para *E. canis* (Maeda et al., 1987; Fishbein et al., 1989 e 1994; Harkess et al., 1989; Eng et al., 1990; Dawson et al., 1991; Bakken et al., 1994). Em 1991, Anderson et al. determinaram a *E. chaffeensis*, como agente causal da erliquiose humana. Esta espécie apresenta 98,2% dos 16S rDNA homólogos aos da *E. canis* (Anderson et al., 1991), compartilhando as principais

proteínas antigênicas (Chen et al., 1994). A erliquiose humana é considerada doença de importância zoonótica pela Organização Panamericana de Saúde (Benenson, 1992), apresentando-se em quadros agudos e infecções oportunistas nos pacientes com comprometimento do sistema imune (Paddock et al., 1993). Dawson et al. (1991) afirmaram que todo progresso feito na caracterização do patógeno canino pode ser diretamente aplicado ao estudo das erliquioses humanas.

2.3. Sinais Clínicos

Apesar de sua distribuição mundial e das inúmeras pesquisas realizadas, a patogenia das erliquioses ainda não está completamente esclarecida.

Após um período de incubação de oito a vinte dias, ocorrem as primeiras manifestações clínicas. São reconhecidas, por estudos experimentais, três fases da doença: fase aguda, subclínica e crônica, dificilmente diferenciadas nos casos de ocorrências naturais (Woody & Hoskins, 1991). A fase aguda normalmente dura de duas a quatro semanas, nas quais os organismos se multiplicam nas células mononucleares, propagando-se para o fígado, baço e linfonodos. Nessa fase, os sinais são inespecíficos, em muitos casos transitórios, podendo não ser percebidos pelo proprietário e ter resolução em uma ou duas semanas. Tais sinais incluem: febre, descarga óculo-nasal serosa ou purulenta, anorexia, dispnéia, depressão, perda de peso, intolerância ao exercício (Codner et al., 1985), além de várias alterações músculo-esqueléticas (Hoskins et al., 1983; Buoro et al., 1990), neurológicas (Meinkoth et al., 1989) e renais (Codner & Maslin 1992). É a fase na qual as mórulas podem ser encontradas com maior facilidade em esfregaços sangüíneos, bem como é notada a presença de carrapatos ao exame clínico (Troy & Forrester, 1990).

A tendência a hemorragias externas nem sempre ocorre, apesar da trombocitopenia muitas vezes presente (Walker et al., 1970). Em um pequeno número de casos, estão presentes hemorragias petequiais ou outros

sinais de diáteses hemorrágicas (Greene et al., 1985).

Distúrbios oculares, acometendo quase todas as estruturas, são freqüentemente correlacionados à erliquiose aguda, incluindo conjuntivite, petéquias conjuntival ou iridal, edema corneal, panuveíte, hifema, glaucoma secundário, hemorragia e deslocamento de retina, além de cegueira aguda, associados a alterações na viscosidade sérica (Hoskins et al., 1983; Troy & Forrester, 1990; Harrus et al., 1998; Gould et al., 2000).

Alterações no sistema nervoso central, como hiperestesia, mioclonia, incoordenação e irreflexia no nervo cranial, podem ocorrer como resultado de inflamação e hemorragias nas meninges (Meinkoth et al., 1989).

Sinais clínicos de dispnéia, estertores e cianose resultam de alterações pulmonares, podendo ser a pneumonia intersticial confirmada por uma radiografia torácica (Greene et al., 1985).

Em alguns casos a fase aguda se resolve sem tratamento, dando início à fase subclínica. Acredita-se que cães imunocompetentes possam eliminar a *E. canis*, no início da infecção (Hoskins, 1991).

Na fase subclínica, o cão pode apresentar-se clinicamente normal com diferentes estudos procurando caracterizar as principais alterações hematológicas nesta fase, como citopenias e hiperglobulinemia, que pode durar por vários anos, principalmente em animais de regiões enzoóticas (Codner et al., 1985). Os títulos de anticorpos, que começam a aumentar de sete a vinte e oito dias após a infecção inicial, continuam elevando-se durante todo o curso da doença. Títulos altos, sem sintomas clínicos, indicam duração prolongada da infecção e persistência intracelular do agente (Waner et al., 1997).

A recorrência dos sinais clínicos nos graves estágios da infecção crônica parece ser mediada pela persistência da *E. canis* nas células mononucleares. Assim, cães com

prolongada infecção e constante estimulação antigênica podem desenvolver pancitopenia e outras manifestações imunologicamente mediadas (Codner et al., 1985). Nesta última fase, a hipoplasia da medula, os sinais clínicos severos, as alterações hematológicas graves e as freqüentes infecções secundárias podem levar o animal à morte. Os sinais clínicos mais evidentes são os hemorrágicos, tais como epistaxe, hematúria, petéquias e equimoses distribuídas pela pele, além de alterações oculares, edema escrotal e de membros, bem como sintomas nervosos conseqüentes às hemorragias e à meningite (Troy & Forrester, 1990).

Vários estudos demonstram que os anticorpos indicam infecção pelo agente, porém, altos títulos não conferem imunidade protetora aos animais infectados. Esse fato é comprovado quando animais cronicamente infectados, com elevados títulos de anticorpos, repentinamente adoecem e morrem (Buhles et al., 1974). Estas observações indicam que os anticorpos podem favorecer a infecção, contribuindo para a severidade das lesões (Reardon & Pierce, 1981) e um prognóstico desfavorável nos casos de erliquiose crônica (McBrid et al., 2001).

2.4. Alterações hematológicas

Os achados laboratoriais, mais freqüentemente observados durante a enfermidade, também variam de acordo com a fase clínica, contudo, muitas vezes, repetem-se com maior ou menor intensidade.

A trombocitopenia ocorre de 10 a 20 dias pós-infecção (PI) e tende a persistir ao longo de todas as fases da doença (Buhles Jr. et al., 1974; Davoust et al., 1991b). Numerosos estudos vêm buscando elucidar os mecanismos que leve a este freqüente achado. A diminuição no número de plaquetas durante a fase inicial da doença é associada à redução na meia-vida plaquetária (Pierce et al., 1977), e a mecanismos imunológicos, inflamatórios, ou de coagulação envolvendo a destruição dos trombócitos. A ativação de complemento

ocorre secundariamente aos mecanismos imunológicos ou de coagulação atuando na destruição das plaquetas. Lovering et al. (1980) observaram que cães decomplementados apresentaram contagem de plaquetas significativamente altas durante a infecção. Lesão e perda da função plaquetária, somados à hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear, levam a um seqüestro inespecífico de plaquetas no baço (Reardon & Pierce, 1981). Recente pesquisa, utilizando citometria de fluxo, identificou anticorpos (IgG) ligados às plaquetas, demonstrando que a participação de um componente imunológico e a exposição ao agente infeccioso, no caso *E. canis*, podem ativar um mecanismo auto-imune, além de outros mecanismos não imunológicos envolvidos na patogênese da trombocitopenia (Waner et al., 2000).

Leucopenia moderada ocorre ao redor da terceira e quarta semanas PI, tendendo a desaparecer, seguida de leucocitose e monocitose (Hibbler et al., 1986). Porém, Buhles Jr. et al. (1974) e Huxsoll et al. (1972) demonstraram, em infecção experimental, o início da leucopenia entre o 10º e 20º dias PI. O início da leucopenia foi detectada por Davoust et al. (1991a) no 16º dia PI, sendo que cerca de metade dos animais acometidos apresentavam eosinopenia. A linfopenia aparece em mais de 60% dos cães, enquanto que a linfocitose é infreqüente durante a fase aguda; já a anemia do tipo arregenerativa é um achado comum (Troy & Forrester, 1990). Em 27 casos de infecção natural por *E. canis*, a trombocitopenia e a anemia estavam quase sempre presentes, não tendo sido verificada leucopenia (Waddle & Littman, 1988). Os animais doentes apresentavam-se com discretas variações nos valores do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), caracterizando uma anemia do tipo normocítica-normocrômica (Kuehn & Gaunt, 1985). Troy et al. (1980) observaram, em 30 casos de erliquiose canina natural, anemia em todos os cães e, em mais da metade deles, macrocitose e hipocromia. Outro fato importante é a freqüente auto-aglutinação de hemácias e teste de Coombs positivo, o

que leva a certa confusão com o diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada (Hoskins, 1991).

A fase subclínica da infecção, associada à persistência do antígeno, é caracterizada por trombocitopenia, anemia e variada leucopenia, com ausência de sinais clínicos (Codner & Farris-Smith, 1986).

Durante a fase crônica, as alterações hematológicas são semelhantes às descritas para a fase aguda. Anemia e trombocitopenia são geralmente mais proeminentes e responsáveis pela maior parte dos sinais (Waddle & Littman, 1988). A pancitopenia ocorre nos casos crônicos e graves devido à hipoplasia das células progenitoras na medula óssea (Hibbler et al., 1986). Buhles Jr. et al. (1975), ao realizarem biópsias de medula óssea, constataram, nos casos mais graves, evidente depleção dos megacariócitos, caracterizando um quadro de anemia aplásica. Weiser et al. (1991) observaram linfocitose e presença de granulações azurólicas citoplasmáticas, em mais de 50% das células linfocitárias. Estes linfócitos, de acordo com os autores, poderiam representar células T citotóxicas, células "natural killer" que raramente são encontradas na circulação periférica dos animais domésticos.

As proteínas séricas geralmente sofrem variações no curso da doença. Pode-se observar, na maior parte das vezes, hipoproteinemia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Esta última, mais marcante na fase aguda, tende a resolver-se na fase subclínica (Troy & Forrester, 1990). Alterações semelhantes foram observadas por Burghen et al. (1971), nos cães em fase terminal da doença com pronunciada pancitopenia e epistaxe. Os autores sugerem que esses achados sejam decorrentes de um estado de hipersensibilidade ou resposta auto-imune, na fase crônica da enfermidade. Codner & Maslin (1992), ao dosarem as perdas de proteína pela urina, sugeriram que a hipoalbuminemia seja decorrente do quadro de proteinúria que se instala na fase aguda da doença. A hiperviscosidade sérica com

gamopatia monoclonal foi descrita por Hoskins et al. (1983), associada à infecção pela riquetsia, em um relato sobre a ineficácia da imunidade humoral no controle da enfermidade. Weiser et al. (1991) encontraram hiperproteinemia em oito animais acometidos por erliquiose crônica e gamopatia monoclonal em 25% dos casos.

Os níveis de alaninoaminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina podem estar aumentados, especialmente durante a fase aguda da doença. Em uma pequena porcentagem dos cães pode-se encontrar elevações dos níveis de bilirrubina e discreta icterícia. Aumentos nos valores de uréia e creatinina parecem refletir um quadro de azotemia pré-renal (Troy & Forrester, 1990). Há descrição de casos de morte por graves processos de glomerulonefrite (Troy et al., 1980).

2.5. Diagnóstico

Os sintomas da infecção por *E. canis* são, na maioria das vezes inespecíficos, dificultando o diagnóstico clínico. Assim, testes laboratoriais são freqüentemente utilizados para a confirmação do diagnóstico.

A detecção direta do parasita em esfregaços sangüíneos não constitui um método muito sensível, uma vez que a mórula é visualizada por um período de tempo limitado. A ausência do parasita em esfregaços não exclui, portanto, o diagnóstico da enfermidade (Ewing, 1969; Hoskins, 1991; Campbell, 1994). Porém, Elias (1991) encontrou uma sensibilidade de 88% no diagnóstico da doença, ao pesquisar mórulas em células mononucleares a partir de esfregaços sangüíneos preparados com sangue obtido por punção da borda da orelha e corados pelo Giemsa. Com esses mesmos procedimentos Burr (1982), na Índia, estabeleceu o diagnóstico de erliquiose canina, além de identificar infecções simultâneas com outros hemoparasitas, tais como *Babesia canis* e *Haemobartonella canis*. Segundo Troy & Forrester (1990), a confecção de esfregaços com sangue de capilares, como os obtidos a partir da

orelha, facilita o achado da riquetsia.

A contagem de plaquetas, segundo Davoust et al. (1991b), é um bom método de diagnóstico presuntivo em casos crônicos assintomáticos da doença, uma vez que trombocitopenia é observada em 75% dos casos de erliquiose canina.

Outros métodos de diagnóstico são atualmente citados, como PCR, Western Immunoblotting, Dot-Blot Elisa, detecção de antígenos plasmáticos, contagem plaquetária e kits comerciais largamente utilizados em Israel, Estados Unidos, Europa e alguns países da América do Sul. No Brasil, a limitação na produção de antígenos em larga escala, através da infecção experimental, somada às dificuldades na implantação de um cultivo *in vitro* e o alto custo dos testes comerciais, faz com que, na prática, os diagnósticos sejam realizados através de esfregaços sangüíneos ou de forma subjetiva, por meio da sintomatologia clínica e das alterações hematológicas.

A punção de medula é uma técnica freqüentemente utilizada em exames para controle e detecção de patologias humanas, e mais recentemente, vem sendo utilizada para demonstrar uma fase medular no ciclo de parasitas em animais. Estudo realizado por Harrus et al. (1998), em animais inoculados experimentalmente, utilizou aspirado de medula óssea, além de amostras esplênicas e de sangue para obtenção de DNA para o teste de PCR. A punção de medula é ainda um método seguro de verificação e acompanhamento dos casos de neoplasias linfáticas e nas diversas causas de pancitopenias (Jain, 1986).

Wen et al. (1997) afirmaram que a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), cujos antígenos são geralmente procedentes de cultivo celular, padronizado inicialmente por Ristic et al. (1972), é o método mais utilizado atualmente. Essa técnica detecta anticorpos anti-*E. canis* a partir do sétimo dia PI. Porém, alguns animais tornam-se soropositivos somente no 28º dia PI (Woody & Hoskins, 1991). Os soros que apresentam

reações em diluição igual ou maior a 1:10 são considerados positivos (Rikihisa et al., 1994), ressaltando-se que resultados falso-negativos podem ocorrer devido a pouca experiência do técnico ou quando os antígenos não forem de boa qualidade. Resultados falso-positivos ocorrem quando amostras de soro estiverem contaminadas por bactérias (Woody & Hoskins, 1991). Reações cruzadas são observadas entre *E. canis* e *E. chaffeensis*, entre *E. canis* e *Cowdria rumminantium*, dificultando a diferenciação entre essas espécies através deste método.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Banco de dados

Considerou-se a demanda clínica espontânea de cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária da UFMG, no período de março de 1998 a setembro de 2001, devido à alta demanda de atendimento, facilidade na obtenção dos dados e principalmente à ampla distribuição espacial do atendimento.

Foram analisadas fichas clínicas de cães suspeitos de hemoparasitoses e selecionadas as fichas com confirmação laboratorial de infecção por *E. canis* e *E. platys*. O diagnóstico da infecção foi realizado, quando solicitado pelo veterinário, através do exame de lâminas preparadas com amostras do sangue total ou da papa de leucócitos, coradas pelo Giemsa. Após a confirmação do diagnóstico parasitológico, passou-se a análise dos parâmetros clínicos e hematológicos desses animais.

As variáveis analisadas foram agrupadas nas seguintes categorias:

- Características demográficas: idade, raça, sexo, época do ano e origem (urbana ou peri-urbana);
- Parâmetros clínicos: infecções concomitantes, temperatura retal, presença ou histórico de carrapatos e sintomas clínicos registrados pelo veterinário nas fichas de consulta;

- Parâmetros hematológicos: célula parasitada, contagem de hemácias, leucócitos (incluindo contagem diferencial) e plaquetas.

3.2. Infecções experimentais

Considerando-se a escassez de informações sobre as alterações clínicas e hematológicas da fase aguda de infecções com amostras brasileiras de *E. canis*, dois cães foram experimentalmente infectados e avaliados durante a fase aguda da doença.

3.2.1. Animais

Foram utilizados dois cães, um macho e uma fêmea, sem raça definida (SRD), pesando 13,250 Kg e 20,100 Kg respectivamente, criados e mantidos no canil experimental do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG (DMVP), livres de endo e ectoparasitos. Os animais receberam ração comercial e água à vontade e foram tratados com Fipronil¹. O canil experimental foi pulverizado com Amitraz² para controle dos ectoparasitas no ambiente. Os exames hematológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital da Escola de Veterinária -UFMG e os demais exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Hemoparasitoses do DMVP.

3.2.2. Inóculo

Foi utilizada a amostra de *E. canis* isolada por Machado (1993) e criopreservada em nitrogênio líquido. O primeiro cão recebeu 5 ml do inóculo, por via endovenosa, segundo técnica descrita por Buhles Jr. et al. (1974). O segundo cão foi inoculado por via endovenosa com aproximadamente 10 ml de sangue do primeiro animal, colhidos na fase aguda da infecção (21 dias PI), segundo a mesma técnica.

3.2.3. Monitoramento das infecções

Imediatamente antes das infecções, 3 ml de

sangue foram colhidos para obtenção de controle negativo de soro. Diariamente a temperatura retal era registrada e realizava-se palpação dos órgãos abdominais e linfonodos. Duas vezes ao dia, esfregaços sangüíneos eram confeccionados com uma gota de sangue de capilares da borda interna da orelha, sendo corados pelo Giemsa, para a pesquisa do parasito (Elias, 1991). A cada dois dias, eram coletados 3 ml de sangue da veia cefálica em EDTA dissódico 10% em seringas plásticas, para realização do hemograma completo e contagem de plaquetas. A contagem total de hemácias e leucócitos foi feita em contador automático de células e a determinação dos níveis de hemoglobina através do método da cianometahemoglobina. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa e os índices hematimétricos calculados segundo Ferreira Neto et al. (1981). A determinação do volume globular foi efetuada pelo método do microhematócrito e as contagens de plaquetas, realizadas em câmara de Newbawer, usando-se como diluente a solução aquosa de oxalato de amônio a 1%, de acordo com Benjamin (1979). Foram considerados como normais os valores de referência preconizados por Jain (1986).

Do segundo animal, além dos procedimentos acima citados, foram realizadas punções de medula óssea, semanalmente, de acordo com Melveger (1969). Do material puncionado foram confeccionados esfregaços, que corados pelo Giemsa, destinaram-se ao acompanhamento das alterações decorrentes da infecção.

Os cães foram sacrificados e necropsiados no 21º dia PI do primeiro cão e 15º dia PI do segundo animal.

3.2.4. Exames sorológicos

As amostras de soro de cada cão (dia 0 e dia da necropsia) foram testadas através de RIFI em diluições duplas, frente ao antígeno de *E. canis* (PANBIO, USA).

¹ FrontLine – Merial

² Triatox - Coopers

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características epidemiológicas

Foram analisadas 194 fichas clínicas de cães atendidos com suspeita de hemoparasitose no Hospital da Escola de Veterinária da UFMG (HEV-UFMG), no período de março de 1998 a setembro de 2001. Ressalta-se que os resultados apresentados nesse trabalho referem-se a demanda espontânea de atendimento do hospital. Considerando-se os resultados de

Alves (1996), estimou-se para o período de estudo, aproximadamente 23.000 consultas clínicas. Os casos suspeitos de hemoparasitoses representaram, portanto, aproximadamente 0,85% do atendimento clínico. É importante destacar que o número de cães diagnosticado com erliquiose aumentou consideravelmente a partir do ano 2000 (Figura 1). Esse fato se deve possivelmente a uma maior acuidade no diagnóstico, tendo em vista os constantes relatos da doença no Brasil e no mundo.

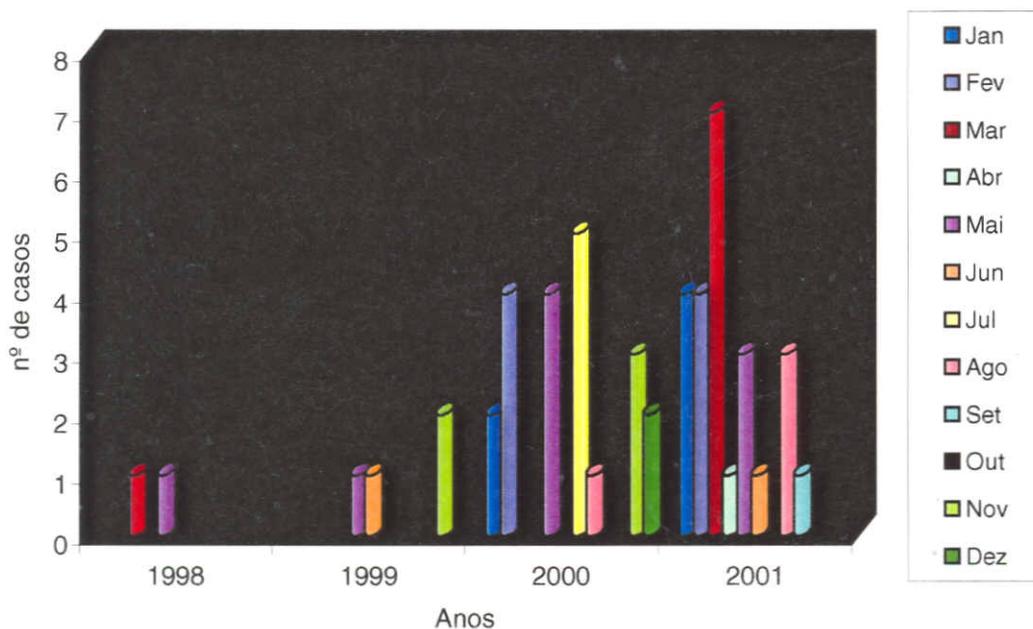


Figura 1. Distribuição mensal de diagnósticos de erliquiose canina no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, no período de março de 1998 a setembro de 2001.

Dos animais suspeitos, 52 tiveram diagnóstico confirmado de *E. canis* e/ou *E. platys*. Destes, 31 apresentavam infecção por *E. canis* e 21 encontravam-se infectados por *E. platys*. Cinco cães apresentavam outros hemoparasitas associados: dois

animais parasitados por *E. canis* e *E. platys*, um cão com *E. canis* e *Haemobartonella canis*, um cão com *E. canis* associada à *Babesia canis* e um animal apresentou-se infectado por *E. platys* e *B. canis* (Figura 2).

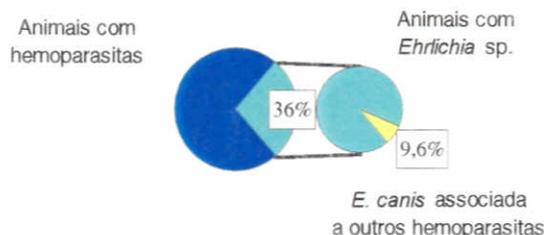


Figura 2. Diagnósticos de hemoparasitoses em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001.

A infecção conjunta de erliquiose e babesiose leva a uma grave síndrome caracterizada por anemia normocítica-normocrômica, na qual há destruição de eritrócitos, causada pela *Babesia*, e impedimento da eritropoiese induzida pela *Ehrlichia* (Ewing & Bucker, 1965). A doença causada simultaneamente por *E. canis* e *E. Platys* foi relatada em graves ocorrências na China (Hua et al., 2000), apresentando alta incidência, também em outros estudos, possivelmente, por serem transmitidas pelo mesmo vetor (French & Harvey, 1983). Segundo Kordick et al. (1999), vários casos de coinfeções com múltiplos organismos foram relatados, com sintomas mais graves que aqueles observados quando um único agente esteve envolvido. Infecções simultâneas de patógenos transmitidos por carrapatos podem ocorrer como resultado da transmissão dos múltiplos organismos por um mesmo carrapato vetor ou da transmissão independente de infecções crônicas por diferentes artrópodos em tempos diversos. A espécie canina apresenta elevado risco a estas associações por estar freqüentemente infestada por um grande número de carrapatos, e não raramente, com espécies diferentes.

No laboratório de Patologia Clínica do HEV-UFMG, o diagnóstico de hemoparasitose foi realizado através de esfregaços sanguíneos

confeccionados com sangue venoso, utilizando-se da amostra de sangue que normalmente foi retirada para a realização do hemograma. Em infecções experimentais, observou-se que as mórulas de *E. canis* foram mais freqüentemente diagnosticadas em sangue de pequenos capilares (borda da orelha), do que em sangue venoso (Castro, 1997). O percentual de animais com erliquiose representou 35,9% dos 145 animais confirmados com hemoparasitas e tendo em vista as limitações do diagnóstico direto (McBride et al., 1996), sinaliza a possibilidade de um número maior de animais portadores de *E. canis*. O pequeno número de associações com outros hemoparasitas (9,6%), encontradas neste período, podem, portanto estar relacionadas a essas limitações.

Quanto à idade e ao sexo dos animais positivos para erliquiose canina (Tabela 1), observou-se que os 24,4% dos animais concentravam-se na faixa etária de 13 a 24 meses, e que dos 52 animais positivos, 61,5% eram fêmeas. Esses valores podem ser atribuídos a idade na qual se inicia a vida reprodutiva de machos e fêmeas. Nessa faixa etária um número maior de fêmeas é atendido com complicações obstétricas ou é levado à clínica para castração (Alves, 1996), além de haver maior deslocamento para exposições, concursos e cobrições.

Tabela 1. Distribuição por faixa etária e sexo de cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia platys* atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001.

Faixa etária (meses)	Frequência absoluta		Total*	Frequência relativa (%)
	Macho	Fêmea		
0-6	3	2	5	11,1
7-12	3	7	10	22,2
13-24	7	4	11	24,4
25-48	2	7	9	20,0
49-72	3	3	6	13,3
73-96	0	0	0	0,0
97-120	0	3	3	6,7
> 120	0	1	1	2,2
Total	18	27	45	100

* para outros sete animais positivos não havia registro da idade.

A categoria "não informada", que representa indefinição da idade, abrangia 13,5% dos casos, o que reflete uma dificuldade na obtenção de dados relativos às unidades primárias de análise.

Quanto às diferenças de susceptibilidade entre raças, que pode ser um fator determinante na patogenia da erliquiose canina (Breitschwert, 1995), observou-se

que 23,1% dos animais positivos eram SRD. Esse predomínio é visto também no número total de animais atendidos no hospital (Alves, 1996; Assis et al., 1996), não podendo ser atribuída qualquer diferença quanto à susceptibilidade racial no presente estudo. Destaca-se a grande variedade de raças acometidas e o número elevado de cães de grande porte (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição por raça de cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia platys* atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001.

Raça	Porte*	Frequência absoluta	Frequência relativa(%)
Akita	G	3	5,9
Beagle	M	1	1,9
Cocker	M	6	11,5
Dobermann	G	2	3,9
Dogue Alemão	G	1	1,9
Fila	G	3	5,8
Husky	G	1	1,9
Labrador	G	2	3,9
Mastim	G	1	1,9
Pastor Alemão	G	6	11,5
Poodle	P	6	11,5
Rottweiler	G	4	7,7
Samoiedo	G	1	1,9
São Bernardo	G	1	1,9
Setter	M	2	3,9
SRD	P/M/G	12	23,0
Total		52	100

* P - pequeno M - médio G - grande

O fato de o maior número de animais infectados ser de grande porte, pode ser explicado por 78,1% dos proprietários residirem em casas e apenas 21,9% em apartamentos, indicando um risco maior de

cães que moram em casa se infectarem. Além do tipo de moradia, um aspecto importante parece ser o histórico e/ou a presença do carrapato ao exame clínico (Tabela 3).

Tabela 3. Ocorrência de infecção por *Ehrlichia canis* em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001, considerando-se histórico e/ou presença de carrapato e tipo de moradia.

Tipo de moradia	Histórico e/ou presença de carrapatos	
	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Casa	15	75
Apartamento	5	25
Total*	20	100

* para outros 32 cães diagnosticados com erliquiose não havia descrição de histórico e/ou presença de carrapatos na ficha clínica

Quanto à origem, os animais positivos diagnosticados com erliquiose canina concentraram-se na região da Pampulha e em áreas periurbanas (Tabela 4). Entretanto, por se tratar de um hospital-escola, o atendimento abrange uma amostra diversificada, com ampla distribuição nas diferentes regionais de Belo

Horizonte, conforme descrito por Alves (1996). Maiores frequências de doenças transmitidas por carrapatos são esperadas em áreas periurbanas, uma vez que os cães, em geral, são criados livres; estando, portanto, mais expostos aos artrópodes vetores da riquetsia.

Tabela 4. Ocorrência de infecção por *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia platys* em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001, considerando-se a origem dos animais.

Região	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Centro-Sul	1	3,0
Leste	1	3,0
Oeste	2	6,1
Nordeste	1	3,0
Noroeste	5	15,1
Pampulha	12	36,4
Peri-urbana	11	33,4
Total*	33	100

* para outros 19 cães positivos não havia registro do endereço.

4.2. Alterações clínicas

4.2.1. Infecções naturais

Do total de animais positivos para *E. canis* e/ou *E. platys* 61,5% não tinham anotações referentes ao exame clínico, o que limitou a análise destas alterações. Dos animais diagnosticados com *E. platys*, foram encontrados somente o hemograma e o resultado da pesquisa de hemoparasitas, sem a avaliação semiótica do cão. Cabe

ressaltar a importância do preenchimento das fichas de consultas como importante instrumento de predição, análise e implementação de planejamento econômico e sanitário (Alves et al., 1995).

Os sinais clínicos mais freqüentes, nos animais diagnosticados com *E. canis* foram, em ordem decrescente: febre, anorexia, apatia e descarga óculo-nasal (Figura 3). Estes sintomas foram também os mais freqüentemente relatados por Ewing (1969).

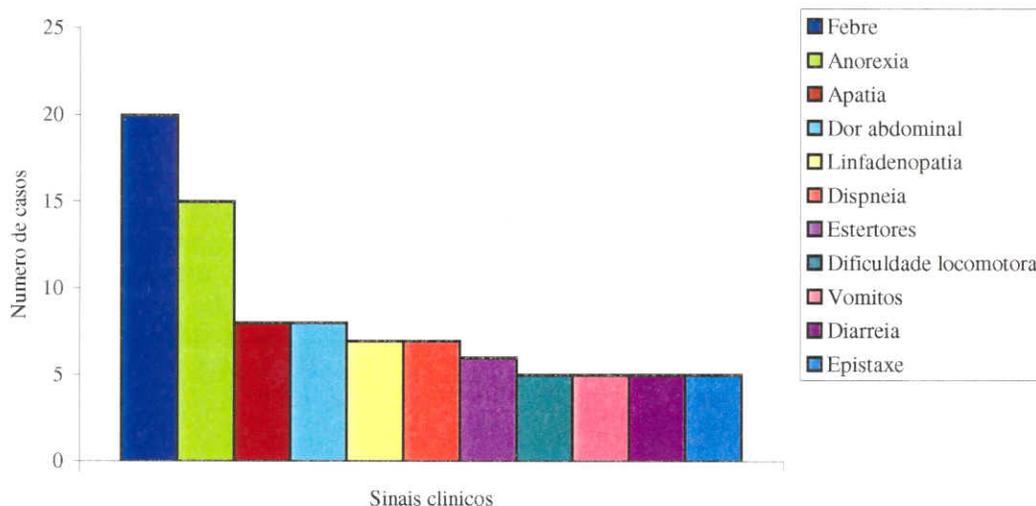


Figura 3. Frequência absoluta dos sinais clínicos observados em cães infectados com *Ehrlichia canis* atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001.

Todos os animais positivos para *E. canis* apresentaram aumento de temperatura, com média 39,7°C. A febre na erliquiose ocorre provavelmente devido à liberação de pirógenos e substâncias antigênicas pela riquetsia, uma vez que a resposta humoral específica pode ser detectada precocemente. Existe ainda a possibilidade de que haja produção aumentada de interleucina I (IL-1), sabidamente um pirógeno endógeno, produzido por vários tipos celulares, principalmente por células apresentadoras de antígeno e linfócitos B (Gershwin et al., 1995).

Linfadenopatia foi evidenciada em 27% dos cães, especialmente nos linfonodos submandibulares e poplíteos. Este percentual

foi o mesmo encontrado por Kuhen & Gaunt (1985). Entretanto, Hoskins (1991) afirmou ser a linfadenopatia uma alteração clínica inconstante na erliquiose. Somente um animal apresentou esplenomegalia. Kuhen & Gaunt (1985) consideraram a esplenomegalia uma alteração pouco freqüente, enquanto que Ewing (1969), descreveu-a como um achado bastante comum na enfermidade, podendo ocorrer aumento do baço da ordem de duas a três vezes em relação ao seu tamanho normal. A hepatomegalia, também observada em um dos animais, segundo o mesmo autor, indicou um grave acometimento, inclusive com visualização de hepatócitos com degenerações acidófilas ou necrose ao exame histopatológico.

Hildebrandt et al. (1973) afirmaram que as lesões mais freqüentes ocorrem na cavidade torácica, com alterações pulmonares em 70% dos cães com erliquiose aguda. Nas fichas analisadas, a dispnéia foi o principal sinal clínico dos animais que manifestaram alterações no sistema respiratório, sendo vista em 26,9%

dos casos (Tabela 5). A pneumonia foi confirmada através de radiografia em um animal. Espessamento dos septos alveolares com pronunciada reação intersticial foi descrito como uma das principais lesões por Reardon & Pierce (1981) em animais com dificuldade respiratória.

Tabela 5. Alterações do sistema respiratório em infecções por *Ehrlichia canis* em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001.

Alterações	Freqüência absoluta	Freqüência relativa (%)
Estertores	6	23,1
Dispnéia	7	26,9
Pneumonia	1	3,9
Sem alterações respiratórias	12	46,1
Total*	26	100

* para outros cinco cães positivos para *E. canis* não foi possível compilar os dados da ficha de consulta.

Epistaxe foi encontrada em 15,4% dos animais com distúrbios hemorrágicos (Tabela 6). Essa alteração é característica da fase crônica, sendo causada por hemorragia nos pulmões ou na mucosa nasal podendo estar presente em 30 a 50% dos casos graves, acompanhada por

petéquias no abdome, mucosa genital, conjuntiva e na cavidade oral (Eng & Giles, 1989). Dois animais apresentaram petéquias ao exame clínico, sendo um no abdome e cavidade oral e o outro na região do prepúcio.

Tabela 6. Alterações hemorrágicas em infecções por *Ehrlichia canis* em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001.

Alterações	Freqüência absoluta	Freqüência relativa (%)
Petéquias	2	7,7
Epistaxe	4	15,4
Melena	2	7,7
Sem alterações hemorrágicas	18	69,2
Total*	26	100

* para outros cinco cães positivos para *E. canis* não foi possível compilar os dados da ficha de consulta.

Alterações nervosas foram observadas em 19,2% dos animais diagnosticados com *E. canis* (Tabela 7). Ataxia, paresia e paralisia são descritos em infecções experimentais, podendo ocorrer tanto na fase aguda como

na crônica decorrentes da infiltração de células mononucleares ou hemorragias na meninge (Greene, 1985). De acordo com Valli (1993) essas lesões são muito freqüentes na erliquiose.

Tabela 7. Alterações nervosas em infecções por *Ehrlichia canis* em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001.

Alterações	Freqüência absoluta	Freqüência relativa (%)
Paresia	3	11,5
Hiperestesia	1	3,8
Paralisia membro posterior	1	3,8
Sem alterações nervosas	21	80,8
Total*	26	100

* para outros cinco cães positivos para *E. canis* não foi possível compilar os dados da ficha de consulta.

A mesma freqüência (19,2%) foi encontrada para as dificuldades de locomoção. Dos animais acometidos, 50% apresentavam edema articular ou de membros, porém não foram realizados exames complementares aos do hemograma e pesquisa de hemoparasitas. Além desses sinais, outros são citados em animais na fase crônica da doença como incoordenação e edema generalizado (Meinkoth et al., 1989). Edema das extremidades foi relatado em 33% dos animais por Greene et al. (1985) e poliartrite é freqüentemente associada a infecções por *E. ewingii* (Stockham et al., 1985).

semelhante à proposta por Buhles Jr. et al. (1974), foram adequados. Os dois animais infectados apresentaram sinais clínicos e febre entre o 11^o e o 15^o dia PI (Figura 4). Estes achados estão de acordo com os observados por Huxsoll et al. (1972) e Pierce et al. (1977) que relataram febre e início dos sintomas clínicos, entre dez e quinze dias após a inoculação experimental de cães com *E. canis*. Entretanto, Davoust et al. (1991a), em trabalho semelhante, constataram que os animais apresentaram alterações clínicas e febre a partir do 20^o dia PI.

4.2.2. Infecções experimentais

O método de infecção e o tipo de inóculo, utilizados no presente trabalho, de maneira

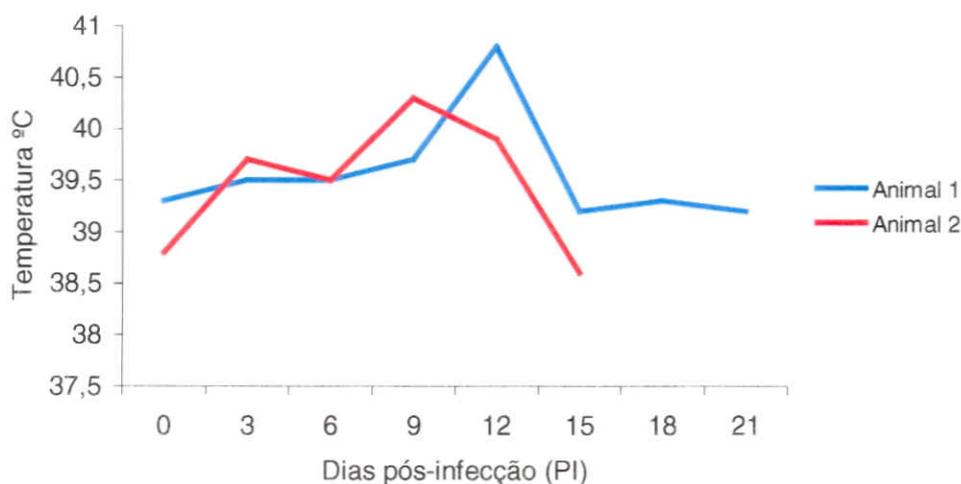


Figura 4. Valores médios da temperatura retal de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*.

A detecção de mórulas características de *E. canis*, no citoplasma de células mononucleares em esfregaços sangüíneos (Figura 5), obtidos da punção de capilares da borda da orelha ocorreu no período em que os animais apresentavam-se febris. Este método mostrou ser limitado para a detecção da riquetsemia nos animais.

No primeiro animal inoculado (animal 1), a mórula característica em monócitos foi visualizada no 11º dia PI e no segundo animal (animal 2), a primeira mórula foi visualizada no 13º dia PI, também infectando um monócito. Nos esfregaços confeccionados com o sangue enviado para hemograma, o parasita não foi encontrado em nenhum dos animais.

Os dois cães apresentaram, como principais

sinais clínicos: palidez de mucosas, linfadenopatia, observada especialmente nos linfonodos sub-mandibulares e poplíteos e secreção óculo-nasal serosa. O emagrecimento foi acentuado no animal 2, que perdeu aproximadamente 10 Kg nos 15 dias da infecção experimental. A perda de peso foi observada por Woody & Hoskins (1991) em 50% dos casos, durante um estudo retrospectivo sobre erliquiose canina, podendo ser atribuída à freqüente anorexia e apatia dos animais. Apesar de não ter havido controle do volume de ração ingerido por cada animal, foi possível perceber uma redução considerável do consumo. Observou-se também presença de fezes liquefeitas e vômitos a partir do 10º dia PI do animal 2. Estas alterações foram também citadas por Hibbler et al. (1986) como sinais infreqüentes na erliquiose canina.

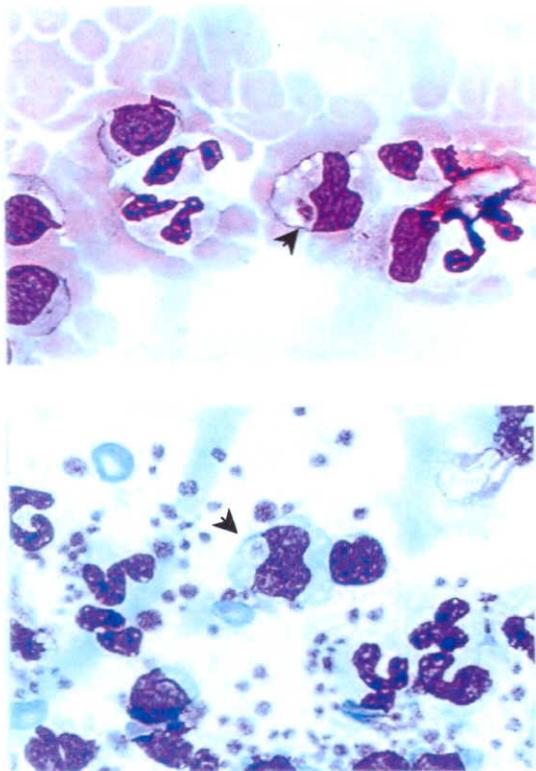


Figura 5. Fotomicrografias (A e B) de esfregaços sangüíneos de cão infectado com *Ehrlichia canis*. Presença de mórula (setas) no interior de monócitos (Giemsa, 1000 x)

4.3. Alterações hematológicas

4.3.1. Infecções naturais

Foram analisados os resultados de hemogramas completos de 50 animais com diagnóstico confirmado de erliquiose canina através da identificação de inclusões características de *E. canis* parasitando diferentes leucócitos (Figura 6) e de *E. platys* nos trombócitos circulantes. A ricketsemia foi predominantemente vista em monócitos sanguíneos, que são, de acordo com Ewing (1969), os mais freqüentemente infectados. Entretanto, o mesmo autor cita

um estudo anterior, no qual uma amostra isolada infectava preferencialmente linfócitos e muito raramente neutrófilos. Meinkoth et al.(1989) também afirmaram que *E. canis* é vista quase que exclusivamente em células mononucleares (linfócitos e monócitos). Os cães podem ser parasitados por diferentes erlíquias, incluindo algumas que são tradicionalmente consideradas como patógenos primários de outros animais e, segundo Dawson et al. (1997), mais de uma espécie de erlíquia pode infectar a mesma linhagem celular de um hospedeiro e algumas espécies infectam ocasionalmente mais de um tipo celular.

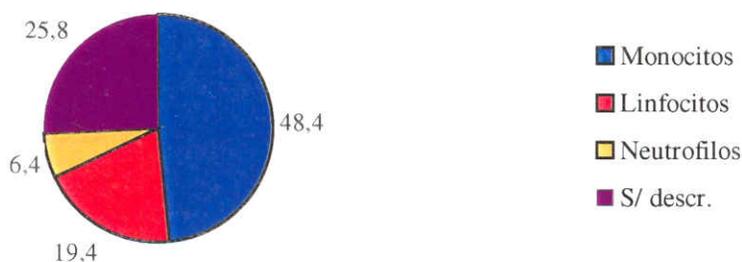


Figura 6. Percentual do tipo de célula infectada por *Ehrlichia canis* em cães atendidos no Hospital da Escola de Veterinária - UFMG, de 1998 a 2001.

A análise dos hemogramas revelou que as alterações hematológicas mais freqüentes foram anemia (70,3%), trombocitopenia (50%) e leucopenia (30%). Estas alterações, de acordo com Greene e Harvey (1990), são freqüentes não só na fase aguda, mas normalmente persistem na fase subclínica, podendo ainda estar presentes de forma acentuada na fase crônica (Woody & Hoskins, 1991).

A etiologia da anemia na erliquiose canina ainda não está perfeitamente esclarecida. Acredita-se que dois mecanismos principais estejam envolvidos. Primeiro, a retirada das hemácias pelo sistema monocítico/macrofágico e/ou lise destas

células, por ação do complemento, devido a uma reação imunológica de hipersensibilidade do tipo II. O segundo deles, a supressão da eritropoiese na medula óssea. A eritrofagocitose foi também observada por Hildebrant et al. (1973) ao necropsiarem 100 animais acometidos por erliquiose no Sudeste Asiático. A hipótese de retirada das hemácias opsonizadas com anticorpos, por eritrofagocitose, é reforçada pelos achados de Hoskins (1991), ao afirmarem que animais acometidos por *E. canis* podem, com freqüência, apresentar positividade ao teste de Coombs direto. Buhles Jr. et al. (1975) observaram que cães acometidos por erliquiose, e sofrendo severa pancitopenia, apresentavam

marcante hipoplasia de medula óssea e depleção de megacariócitos. Estes mesmos pesquisadores chegaram a sugerir que este fato, possivelmente, ocorra devido a algum mecanismo de injúria imunológica, capaz de provocar alterações no estroma medular ou nas células tronco.

A diminuição numérica de plaquetas é a alteração laboratorial mais citada, acometendo grande número de cães, de acordo com Troy & Forrester (1990), que relataram trombocitopenia em 86% dos animais. Alguns mecanismos são propostos para explicar a diminuição do número de plaquetas. Além da aplasia de medula óssea e/ou supressão de suas atividades eritropoiética, leucopoiética e trombopoiética, a retirada ou destruição de plaquetas, por mecanismos imunomediados, parece ter um papel importante no desencadeamento da trombocitopenia. Kakoma et al. (1978 e 1980) sugeriram que a trombocitopenia, constantemente presente nos casos da doença, fosse decorrente da produção de um fator inibidor da migração plaquetária, e linfócitos T citotóxicos, capazes de destruir plaquetas. Pierce et al. (1977) relataram a existência de uma substância não identificada, em cães infectados por *E. canis*, capaz de inibir a liberação do fator plaquetário-3 (PF-3) pelos trombócitos.

A leucopenia tem sido relatada como uma das alterações mais comuns nos animais acometidos por erliquiose canina. Ewing (1969) e Walker et al. (1970) relataram inúmeros casos da doença em cães do exército americano na Guerra do Vietnã. A leucopenia foi um dos mais importantes achados laboratoriais observados; muitas vezes, fazendo parte de um quadro pancitopênico, que deu origem ao nome de Pancitopenia Tropical Canina. Os mecanismos que induziram à leucopenia nos animais podem ser os mesmos atribuídos à anemia. Porém, poderia acrescentar-se ainda, conforme sugerido por Hibbler et al. (1986), uma vasculite, encontrada de forma generalizada em vários

órgãos e sistemas dos cães infectados por *E. canis*. A vasculite e a produção de IL-1 podem ter um papel importante na marginação e adesão de leucócitos à parede vascular, com saída destes da circulação sanguínea para os focos de inflamação (Cotran et al., 1989).

O aumento do número de bastonetes foi encontrado em 66,7% dos animais positivos. Observou-se uma queda significativa nos valores de eosinófilos em 43,3% dos casos e monocitopenia em 30% nos cães atendidos. Waddle e Littman (1988), também em um estudo retrospectivo de 27 casos de erliquiose canina natural, detectaram neutropenia, linfopenia, eosinopenia e monocitopenia em 22%, 48%, 63% e 51% dos animais, respectivamente. Kuem e Gaunt (1985) reportaram estas alterações em 56 casos da doença, porém com menor incidência. É importante lembrar que a maioria dos autores citados, a exemplo do presente estudo, trabalhou com casos de erliquiose natural, sem o conhecimento da fase em que se encontrava a infecção, não sendo possível a avaliação do provável efeito do estresse provocado pelo parasita em seu hospedeiro, levando de forma secundária às alterações do leucograma.

4.3.2. Infecções experimentais

A análise das duas primeiras punções de medula não revelou alterações dignas de nota. Anormalidades no exame da punção de medula dos cães com erliquiose dependem principalmente do estágio da infecção. Alterações foram vistas por Ewing (1969) somente a partir da terceira semana de infecção, com uma marcada hiper celularidade no 150º dia PI. Essa alteração é comum nos casos agudos, porém é inconstante e flutuante conforme Reardon & Pierce (1981).

Entretanto, na última punção realizada no dia do sacrifício do animal 2 (15 dias PI), foi possível visualizar inclusões citoplasmáticas compatíveis com *E. canis* (Figura 7).

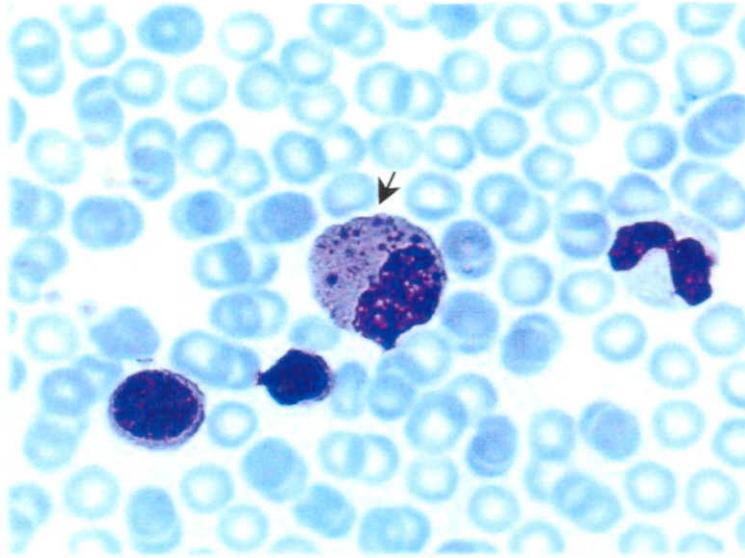


Figura 7. Fotomicrografia de esfregaço de punção de medula óssea de cão experimentalmente infectado com *Ehrlichia canis*. Presença do agente em multiplicação (Giemsa 1000 x)

A demonstração de erlíquias envolvendo o sistema nervoso de cães é rara e somente dois relatos foram encontrados na literatura. No primeiro, descreveu-se um cão com acometimento súbito e anemia arregenerativa, no qual os leucócitos infectados eram raros e todos eram mononucleares, sugerindo uma infecção por *E. canis* (Meinkoth et al., 1989); em outro, uma análise do aspirado medular revelou uma leve pleocitose, aumento de proteínas e de leucócitos que continham mórulas de erlíquias. Neste último, as mórulas foram localizadas primariamente em neutrófilos, sugerindo uma infecção por *E. ewingii*, ou por um organismo do grupo da erliquiose humana (EGH), a *E. equi*, ou até mesmo um outro agente não identificado.

O exame sorológico demonstrou que os dois animais apresentavam-se negativos (sem

títulos) para *E. canis* antes da infecção experimental. Já os soros de ambos animais colhidos no dia do sacrifício apresentaram títulos positivos até a diluição 1:32. Buhles Jr et al. (1974) detectaram títulos sorológicos pela RIFI, para *E. canis*, em aproximadamente 15 e 65% dos animais, no sétimo e 13º dia de infecção, respectivamente. Já Davoust et al. (1991a) observaram a presença de títulos sorológicos específicos para a riquetsia, utilizando o mesmo método, somente no 18º dia PI.

Pela RIFI, utilizando antígeno comercial produzido em cultivo celular, foram observadas reações contra diferentes fases de multiplicação intracelular da *Ehrlichia canis* (Figura 8).

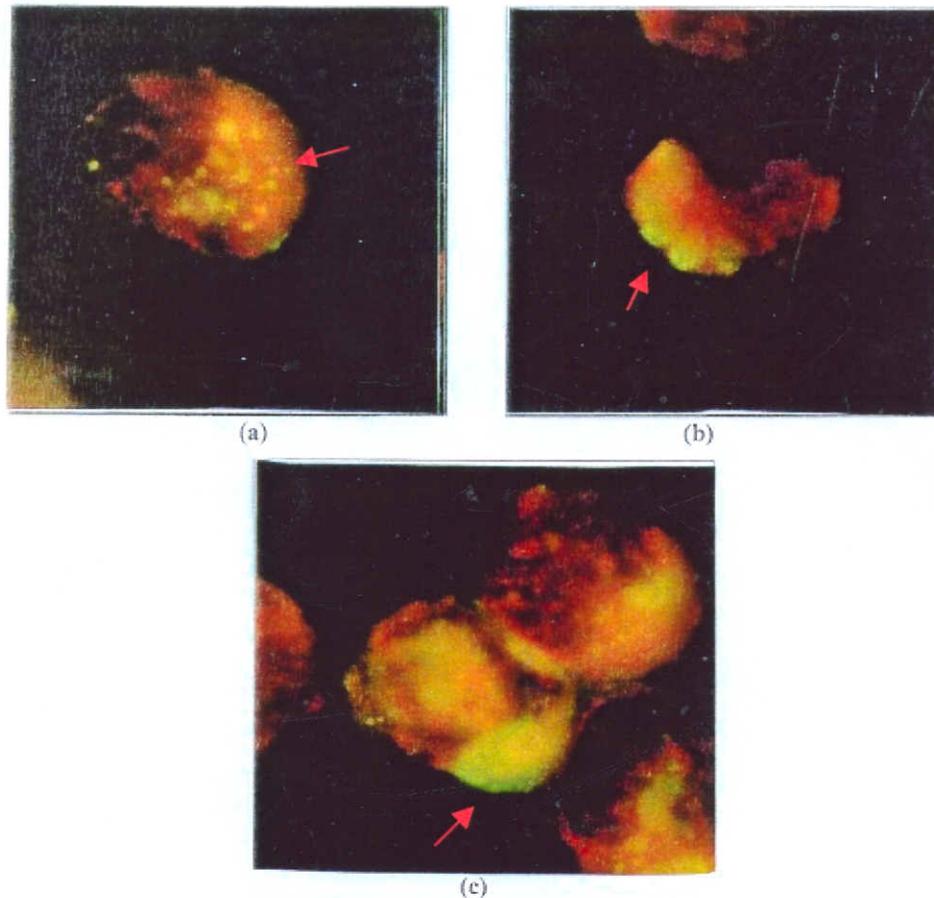


Figura 8. Reação de imunofluorescência indireta de soro de cão aos 14 dias após infecção experimental com *E. canis*, sendo possível a visualização de três estádios (setas) de desenvolvimento intracelular do agente: (a) corpos elementares; (b) corpos iniciais; (c) mórula.

Os resultados do hemograma foram divididos em eritrograma (Tabela 8), leucograma (Tabela 9) e contagem de plaquetas (Tabela 10).

Tabela 8. Valores do eritrograma (Média \pm desvio padrão) de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*.

Parâmetro (dia 0)	Semanas		
	Primeira	Segunda	Terceira
Hemácias $\times 10^6/\mu\text{l}$ (6,27 \pm 0,53)	5,36 \pm 0,29	3,86 \pm 0,62	3,95 \pm 0,52
Hemoglobina (g/dl) (13,89 \pm 1,64)	12,19 \pm 1,46	8,02 \pm 0,60	6,93 \pm 0,58
Volume Globular (%) (45,12 \pm 5,69)	36,12 \pm 1,35	33,75 \pm 1,67	24,87 \pm 2,47

O número de hemácias dos dois animais apresentou uma queda considerável a partir da primeira semana PI, acentuando-se na semana seguinte. Este mesmo comportamento foi observado para a concentração de hemoglobina. O volume globular (VG) apresentou queda acentuada a partir da primeira semana do experimento, mantendo-se em declínio até o dia em que os animais foram sacrificados. O volume corpuscular médio (VCM) apresentou pequena variação, mas manteve-se dentro de parâmetros considerados normais, o mesmo acontecendo com os valores da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) até a terceira semana.

Os dois animais infectados apresentaram anemia do tipo normocítica-normocrômica. Este tipo de alteração já havia sido observada por Walker et al. (1970), que a classificaram como anemia normocítica normocrômica arregenerativa, ocorrendo em todas as fases da erliquiose canina. Segundo Waddle e Littman (1988), a anemia é um dos achados hematológicos mais freqüentes na doença. Troy et al. (1980) descreveram que 90% dos cães com erliquiose apresentaram anemia; Reardon e Pierce (1981) relataram ocorrência desta

durante a fase aguda da doença. No presente experimento, a anemia foi detectada ao redor do 12º dia PI, de maneira semelhante a Huxsoll et al. (1972), também em infecções experimentais de *E. canis*.

O número total de leucócitos diminuiu acentuadamente na terceira semana PI, com evidente queda do número de neutrófilos segmentados e linfócitos (Tabela 9). Os valores de eosinófilos e basófilos não apresentaram variações que diferissem dos valores normais para a espécie, porém a partir da segunda semana observou-se uma evidente monocitose. As principais alterações, observadas na contagem diferencial de leucócitos no presente experimento, foram provavelmente decorrentes de processos semelhantes aos previamente descritos para a leucopenia nos animais naturalmente infectados. Troy e Forrester (1990) citaram a eosinopenia, a linfopenia e o aumento das formas jovens da linhagem neutrofílica como uma consequência secundária à liberação excessiva de glicocorticóides endógenos, frente ao estresse provocado pelo parasito em seu hospedeiro.

Tabela 9. Valores do leucograma (Média \pm desvio padrão) de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*.

Parâmetro (dia 0) (x 10 ³ /µl)	Semanas		
	Primeira	Segunda	Terceira
Leucócitos (11,02 \pm 1,95)	9,62 \pm 2,13	8,21 \pm 1,63	5,61 \pm 1,05
Basófilos (0)	0	0	0
Eosinófilos (0,66 \pm 0,55)	0,57 \pm 0,47	0,46 \pm 0,33	0,65 \pm 0,50
Bastonetes (0,08 \pm 0,09)	0,18 \pm 0,09	0,07 \pm 0,08	0,03 \pm 0,05
Segmentados (6,52 \pm 1,10)	5,61 \pm 2,12	5,43 \pm 1,53	3,79 \pm 0,62
Linfócitos (3,54 \pm 0,89)	3,18 \pm 0,09	2,02 \pm 0,43	0,96 \pm 0,37
Monócitos (0,21 \pm 0,23)	0,29 \pm 0,19	0,46 \pm 0,23	0,75 \pm 0,42

A contagem de plaquetas teve queda considerável na segunda semana PI (Tabela 10) e os valores médios mais baixos foram observados no animal 2. A queda numérica de plaquetas na erliquiose canina é a alteração laboratorial mais observada, ocorrendo em 86% dos cães (Troy & Forrester, 1990).

Os achados clínicos e laboratoriais dos dois animais experimentalmente infectados além de servirem como referencial, apontam para a importância de se dar continuidade a estudos mais detalhados com amostras brasileiras de *E. canis* na tentativa de auxiliar o trabalho de clínicos e pesquisadores.

Tabela 10. Valores de contagem de plaquetas (Média \pm desvio padrão) de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*.

Parâmetro (dia 0) (x 10 ³ /µl)	Semanas		
	Primeira	Segunda	Terceira
237,63 \pm 69,67	223,32 \pm 35,89	103,75 \pm 21,04	155,34 \pm 26,90

• 5. CONCLUSÕES

- Há necessidade de maior atenção por parte dos clínicos e técnicos para a erliquiose canina uma vez que 35,9% dos cães atendidos com suspeita de hemoparasitoses no Hospital da Escola de Veterinária da UFMG apresentavam infecções por *Ehrlichia canis* ou *E. platys*;
- A erliquiose canina ocorre nas diferentes regiões de Belo Horizonte e áreas periurbanas, verificando-se maior risco de infecção para animais cujos proprietários residam em casas;
- A anemia normocítica normocrômica é a alteração hematológica mais freqüente nos animais com erliquiose canina, superando os quadros de trombocitopenia;
- O número de casos confirmados de erliquiose canina em Belo Horizonte tem aumentado consideravelmente nos últimos anos em função da maior acuidade no diagnóstico;
- Os dados provenientes de fichas clínicas constituem importante fonte de informação, com a necessidade de imprescindível rigor no seu preenchimento;

- Há um parasitismo da medula óssea que permite a detecção de *Ehrlichia canis* durante a fase aguda, indicando que o exame parasitológico do aspirado de medula óssea pode ser útil na identificação precoce de infecções em cães.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA FILHO, N., ROUQUAYROL, M. Z. **Introdução à epidemiologia moderna**. ed., Belo Horizonte, Coopmed Apce Abrasco, 1992, 184 p.
- ALVES, P. A. B., VIÉGAS, D. M., MODENA, C. M. Características demográficas da população canina atendida em hospitais veterinários de Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 47, n. 4, p. 613-619, 1995.
- ALVES, P. A. B. Perfil epidemiológico da população canina atendida em hospitais veterinários de Belo Horizonte – MG 1987 a 1994. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996 (Dissertação, Mestrado).

ANDERSON, B.E., DAWSON, J.E., JONES, D.C., WILSON, K.H. *Ehrlichia chaffeensis* a new species associated with human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, n.12, p.2838-42, 1991.

ASSIS, A. C. B., ALVES, P. A. B., CAETANO JUNIOR, J., MODENA, C. M. Caracterização do perfil de proprietários e interação homem/animal de estimação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** UFMG, Belo Horizonte, 1996 (Trabalho enviado para publicação).

BABO, V.J., MUNHOZ, A.L.F. Estudo retrospectivo das características da Erlichiose canina. **Hora Veterinária**, v.18, n.106, p.39-43, 1998.

BAKKEN, J.S., DUMLER, J.S., CHEN, S.M., ECKMAN, M.R., VAN ETTA, L.L., WALKER, D.H. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States: a new species emerging? **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.272, p.212-218, 1994.

BENENSON, A.S. Ehrlichiosis. In: **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre**. 15 ed. Washington D.C: Organización Mundial de Salud, p. 115-17, 1992.

BENJAMIN, M. M. Counting of blood cells. In: **Outline of Veterinary Clinical Pathology**. 3 ed. Iowa: The Iowa State University Press, 1979. p. 48-59.

BREITSCHWERDT, E. B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S. J. & FELDMAN, E. C. (ed.). **Veterinary Internal Medicine; Diseases of dog and cat**, 1995 p. 376-383.

BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B.C., HANCOCK, S.I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi*, *E. ewingii* or *Bartonella vinsonii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.9, p.2645-51, 1998.

BUHLES Jr., W.C., HUXSOLL, D.L., HILDEBRANDT, P.K. Tropical Canine Pancytopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. **J. Comp. Pathol.**, v.85, n.4, p.511-21, 1975.

BUHLES Jr., W.C., HUXSOLL, D.L., RISTIC, M. Tropical Canine Pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **J. Infect. Dis., Chicago**, n.130, n.4, 1974.

BUORO, I.B.J. et al. Polymyositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. **J. Small Anim. Pract.**, v.31, n.12, p.624-27, 1990.

BURGHEN, G.A., BEISEL, W.R., WALKER, J.S., NIMS, R.M., HUXSOLL, D.L. Development of hypergammaglobulinemia in Tropical Canine Pancytopenia. **Am. J. Vet. Res.**, v.32, n.5, p.749-56, 1971.

BURR, E. W. Methods for diagnosis of *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Haemobartonella canis*. **Indian Vet. J.**, v.59, n.12, p.984-87, 1982.

CADMAN, H.F., KELLY, P.J., MATTHEWMAN, L.A., ZHOU, R., MASON, P.R. Comparasion of the dot-blot- enzyme linked-immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Vet. Record**, v.135, n.15, p.362, 1994.

CAMPBELL, R. S. F. Pathogenesis and pathology of the complex rickettsial infections. **Vet. Bull.**, v. 64, n. 1, p. 1-24, 1994.

CASTRO, M.B. Alterações clínicas, anatomopatológicas e imunopatológicas na erliquiose aguda experimental em cães. Unesp, 1997. 97p. (Dissertação, Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

- CHEN, S.M., DUMLER, J.S., BACKKEN, J.S., WALKER, D.H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.589-95, 1994.
- CODNER, E.C., ROBERTS, R.E.; AINSWORTH, A.G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.186, n.2, p.166-69, 1985.
- CODNER, E. C., FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 189, n. 1, p. 47-50, 1986.
- CODNER, E.C., MASLIN, W.R. Investigation of renal protein loss which acute experimental induced *Ehrlichia canis* infection. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, n.3, p.294-99, 1992.
- COSTA, J.O., SILVA, M., BATISTA JÚNIOR, J.A., GUIMARÃES, M.,P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, v.25, n.2, p.199-200, 1973.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Inflammation and Repair. In: ROBBINS, S. L. **Pathologic Basis of Disease**. 4 ed. Philadelphia: W.B.Saunders, p.39-86. 1989.
- DAVOUST, B. et al. Ehrlichiose Canine Experimentale: étude clinique et thérapeutique. **Rév. Méd. Vet.**, v.167, n.1, p.33-40, 1991a.
- DAVOUST, B. et al. Ehrlichiose Canine Chronique: intérêt de la numération plaquettaire. **Rév. Méd. Vet.**, Toulouse, v. 142, n. 4, p. 287-92, 1991b.
- DAWSON, J.E. et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p.2741-45, 1991.
- DAWSON, J. E., WARNER, C. K., EWING, S. A. et al. Fingerprinting of *Ehrlichia* species by repetitive element PCR. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 109-114, 1997.
- DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.28, p.408-9, 1935.
- ECKERSLEY, G. N., REYERS, F., TURNER, G. V.; WONLMARANS, L. A comparison between the disease status of hospitalised dogs from developed and those developing communities, **J. S. Afr. Vet. Ass.**, v. 63, n. 1, p. 2-6, 1992.
- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **J. Small Anim. Pract.**, v.33, p.540-43, 1991.
- ENG, T. R., HARKESS, J.R., FISHBEIN, D.B., DAWSON, J.E., GREENE, C.N., REDUS, M.A. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. **J.A.M.A.**, v.264, p.2251-58, 1990.
- ENG, T. R., GILES R. Ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Illinois, v. 194, n. 4, p.497-500, 1989.
- EWING, S. A., BUCKER, R. G. Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infections in the dog. **Am. J. Vet. Res.**, v. 26, p. 815-828, 1965.
- EWING, S.A. Canine Ehrlichiosis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.13, p.331-53, 1969.
- FERREIRA NETO, J. M., VIANA, E. S., MAGALHÃES, L. M. **Patologia Clínica Veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo, 1981. 279p.
- FISHBEIN, D.B., KEMP, A., DAWSON, J.E., GREENE, N.R., REDUS, M.A., FIELDS, D.H. Human ehrlichiosis: prospective active surveillance in febrile hospitalized patients. **J. Infect. Dis.**, v.160, p.803-809, 1989.
- FISHBEIN, D.B., DAWSON, J.E., ROBINSON, L.E. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. **Ann. Intern. Med.**, v.120, p.736-43, 1994.

FRENCH T. W. & HARVEY, J. W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 2407-2411, 1983.

GERSHWIN, L.J., KRAKOWKA, S., OLSEN, R.G. Citokines. In: **Immunology and Immunopathology of Domestic Animals**. 2 ed. St. Louis: Mosby, p.40-46, 1995.

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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 186, p. 465-72, 1985

GREENE, C. E., HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis, p. 405-414. In: GREENE, C. E. (ed.), **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia, 1990.

GOULD D. J., MURPHY, K., RUDORF, H. CRISPIN, S. M. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. **J. Small Anim. Pract.**, v. 41, Cap. 6, 2000.

GROVES, M.G., DENNIS, G.L., AMYX, H.L., HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **Am. J. Vet. Res.**, v.36, n.7, p.937-40, 1975.

HARKESS, J.R., EWING, S.A., CRUTCHER, J.M., KUDLAC, J., MACKEE, G., ISTRE, G.R. Human ehrlichiosis in Oklahoma. **J. Infect Dis.**, v.159, p.576-79, 1989.

HARRUS, S., AROCH, I., LAVY, E., BARK, H. Clinical manifestation of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet. Record**, v.141, n.10, p.247-50, 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*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.1, p.73-76, 1998.

HARVEY, J.W., SIMPSON, C.F, GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J. Infect. Dis.**, v.137, p. 182-88, 1979.

HARVEY, J.W., SIMPSON, C.F, GASKIN, J.M., SAMECK, J.H. Ehrlichiosis in wolves, dogs, and wolf-dog crosses. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.175, n.9, p.901-5, 1979.

HEATH, A. C. G. The temperature and humidity preferences of *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes holocyclus* and *Rhipicephalus sanguineus* (ixodidae): studies on eggs. **Intern. J. Parasitol.**, v. 9, p. 33-39, 1979.

HIBBLER, CO.S., HOSKINS, J.D., GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs Part II: Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **Comp. Cont. Edu.**, v.8, n.2, p.106-13, 1986.

HILDEBRANDT, P.K., HUXSOLL, D.L., WALKER, J.S., NIMS, R. M., TAYLOR, R., ANDREWS, M. Pathology of Canine Ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia). **Am. J. Vet. Res.**, v.34, n.10, p.1309-20, 1973.

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

HOSKINS, J.D., BARTA, O., ROTHSCHMITT, J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.183, n.9, p.1011-12, 1983.

HUA, P., YUHAI, M., SHIDE, T., YANG, S., BOHAI, W., XIANGRUI, C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiol. Immunol.**, v. 44, n. 9, p. 737-9, 2000.

HUXSOLL, D.L., HILDEBRANDT, P.K., NIMS, R.M., WALKER, J.S. Tropical canine Pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.157, n.11, p.1627-32, 1970.

- HUXSOLL, D.L., AMYX, H.L., HEMELT, I.E., HILDEBRANDT, P.K., NIMS, R.M., GOCHENOUR, W.S. Laboratory studies of Tropical Canine Pancytopenia. **Exp. Parasitol.**, v.31, p. 53-9, 1972.
- JAIN, N. C. Hematologic techniques. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. 4 ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, p.20-86
- KAKOMA, I., CARSON, C.A., RISTIC, M., STEPHENSON, E.M., HILDEBRANDT, P.K., HUXSOLL, D.L. Platelet migration inhibition as a indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. **Infect. Immun.**, v.20, p.242-47, 1978.
- KAKOMA, I., CARSON, C.A., RISTIC, M. Direct and indirect lymphocyte participation in the immunity and immunopathology of Tropical Canine Pancytopenia – A review. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.3, p.291-98, 1980.
- KAVINSKI, L.C. et al. Ocorrência de um caso de erliquiose canina em Curitiba – PR. **Rev. Set. Ciênc. Agr.**, v.3, p.291-98, 1980.
- KEYSARY, A., WANER, T., ROSNER, M., WANER, 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. **Vet. Parasitol.**, v.62, n.3/4, p.331-40, 1996.
- KORDICK, S. K., BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B. C.; SOUTHWICK, K.L.; COLITZ, C.M.; HANCOCK, S.I; BRADLEY, J.M.; RUMBOUGH, R. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 8, p. 2631-2638, 1999.
- KUHEN, N. F., GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Illinois, v. 186, n. 4, p. 355-8, 1985.
- LEWIS Jr., G.E., RISTIC, M., SMITH, R.D., LINCILN, T., STEPHENSON, E.H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, v.32, n.12, p.1953-55, 1977.
- LOVERING, S. L., PIERCE, K. R. ADAMS, L. G. Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, p. 1266-1271, 1980.
- MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal) Comunicação pessoal, 1993.
- MAEDA, K., MARKOWITZ, N., HAWLEY, R.C.; RISTIC, M.; COX, D.; McDADE, J.E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **N. Engl. Med.** v.316, p.853-56, 1987.
- MALETTA, C. H. M. **Epidemiologia e Saúde Pública**. Livraria Atheneu, São Paulo, 186 p, 1988.
- McBRIDE, J. W., CORSTVET, R. E., GAUNT, S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G.Y.; OSBURN, B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.** V. 8, p. 441-447, 1996.
- McBRIDE, J. W., CORSTVET, R. E., BREITSCHWERDT, E. B., WALKER, D. H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infections with recombinant proteins. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 315-22, 2001
- MEINKOTH, J.H., HOOVER, J.P., COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; LINK, J. Ehrlichiosis in a dog with seizures and non regenerative anemia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.195, n.12, p.1754-55, 1989.
- NYINDO, M.B.A., RISTIC, M., HUXSOLL, D.L., SMITH, A.R. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agente *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, v.32, p.1651-58, 1971.

PADDOCK, C.D., SUCHARD, D.P., GRUMBACH, K.L., HADLEY, W.K., KERSCHMANN, R.L., ABBEY, N.W., DAWSON, J.E., ANDERSON, B.E., SIMS, K.G., DUMLER, J.S. Brief report: Fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. **N. Engl. J. Med.** v.329, p. 1164-67, 1993.

PIERCE, K.R., MARRS, G.E., HIGHTOWER, D. Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. **Am. J. Vet. Res.**, v.38, n.11, p.1821-25, 1977.

RANGEL, M. C. F. Calculo de población canina en las áreas metropolitanas de la ciudad de Mexico, determinación de sus condiciones de atención y destino. **Veterinaria**, Mexico, v. 11, n. 1, p. 36, 1980.

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

RIKIHISA, Y., YAMAMOTO, S., KWAR, J., IQBAL, Z., KOCIBA, G., MOTT, J., CHICHANASIRIWITHAYA, W. C-Reactive protein and alpha-1-acid glycoproteins levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.4, p.912-27, 1994.

RISTIC, M., HUXSOLL, D.L., WEISIGER, R.M., HILDEBRANDT, P.K., NYINDO, M.B., Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infect. Immun.**, v.6, p.226-31, 1972.

ROBINSON, G. W. Characterization of several canine populations by age, breed and Sex. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 151, n. 8, p. 1072-1078, 1967.

SILVA, J. A. **Características da população canina e felina de Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil.** Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1980 (Disseratação, Mestrado)

SMITH, R.D., SELL, D.M., STEPHENSON, E.H., RISTIC, M.R., HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from symbiotic rickettsia. **Am. J. Vet. Res.**, v.37, n.2, p.119-26, 1976.

STOCKHAM, S.L., SCHMIDT, D. A., TYLER, J. W. Canine granulocytic ehrlichiosis in dogs from Central Missouri: a possible cause of polyarthritis. **Vet. Med. Rev.**, v. 6, p. 3-5, 1985.

TROY, G.C., FORRESTER, S.D. Canine Ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat.**, Philadelphia: W:B: Saunders, p.48-59, 1990.

TROY, G.C., VULGAMOTT, J.C., TURNWALD, G.H. Canine Ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Denver, v.16, p.181-7, 1980.

VALLI, V.E.O. The Hematopoietic System: Ehrlichiosis. In: JUBB, K.V.F. et al. **Pathology of Domestic Animals.** San Diego: Academic Press Inc., cap.2, p.195-6, 1993.

WADDLE, J.R., LITTMAN, M.P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring Canine Ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Denver, v.24, n.6, p.615-20, 1988.

WALKER, J.S., RUNDQUIST, J.D., TAYLOR, R., WILSON, B.L.; ANDREW, M.R., BARK, J., HOGGE, H.L., HUXSOLL, D.L., HILDEBRANDT, P.K., NIMS, R.M. Clinical and clinicopathologic findings in Tropical Canine Pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.157, n.1, p.43-55, 1970.

WANER, T., HARRUS, S., WEISS, D.J., BARK, H., KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.48, n.1/2, p.177-72, 1995.

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. **Vet. Parasitol.**, v.69, n.3/4, p.307-17, 1997.

WANER, T., STRENGER, C., KEYSARY, A. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, n. 3, p. 240-46, 2000.

WEISER, M.G. et al. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.27, n.1, p.84-88, 1991.

WEISS, E. The biology of rickettsiae. **A. Rev. Microbiol.**, v.36, p.345-70, 1982.

WEN, B., RIKIHISA, Y. MOTT, M. J., GREENE, R., KIN, H.Y., ZHI, N., COUTO, G.C., UNLER, A., BARTSCH, R. Comparison of Nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WOLDEHIWET, Z., RISTIC, M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals.** Pergamon Press, 427p, 1993.

WOODY, B.J., HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.21, n.1, p. 75-98, 1991.