

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Ehrlichia canis*  
em cães do Município de Patos, Estado da Paraíba

SAMUEL FREITAS DE AQUINO  
(Graduando)

2009



Universidade Federal  
de Campina Grande

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Ehrlichia canis*  
em cães do Município de Patos, Estado da Paraíba

Nome do Autor:  
Samuel Freitas de Aquino

Orientador:  
Dr. Sérgio Santos de Azevedo

Área de concentração:  
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Patos, PB  
Abril de 2009

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA DA UFCG - CAMPUS DE PATOS

A657s

2009

Aquino, Samuel Freitas de.

Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Ehrlichia canis* em cães do Município de Patos, Estado da Paraíba/ Samuel Freitas de Aquino.

53 p.

Inclui Bibliografia.

Orientador (a): Sérgio Santos de Azevedo

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Erliquiose canina. 2 - Zoonoses I – Título.

CDU: 614

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

SAMUEL FREITAS DE AQUINO  
(Graduando)

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário

APROVADA EM 08 / 04 / 2009

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

---

Prof. Dr. Clebert José Alves

---

Prof. Dr. Albério Antônio de Barros Gomes

## DEDICATÓRIA...

Dedico este trabalho aos meus familiares,  
especialmente meus pais José Augusto e  
Eliuda, minha irmã Élide e minha  
namorada Cindery, pelo apoio recebido

## AGRADECIMENTOS...

Agradeço a Deus, principal responsável por  
mais essa vitória em minha vida;

Aos meus pais pela confiança que sempre  
tiveram em mim;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Santos de  
Azevedo que forneceu orientações seguras,  
guiando meu caminho;

Ao Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar - UFMT-  
pelo suporte laboratorial;

À Anielle e todos que participaram das coletas  
das amostras utilizadas no estudo;

Aos meus professores e colegas,  
pela caminhada solidária;

## SÚMÁRIO

	Pág
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Histórico.....	12
2.2. Etiologia.....	13
2.3. Hospedeiros.....	14
2.4. Patogenia.....	15
2.5. Sinais Clínicos.....	17
2.5.1. Fase aguda.....	17
2.5.2. Fase sub-clínica.....	18
2.5.3. Fase crônica.....	19
2.6. Alterações Hematológicas.....	20
2.7. Lesões.....	20
2.8. Transmissão.....	21
2.9. Diagnóstico.....	22
2.8.1. Achados clínico-patológicos.....	23
2.8.2. Sorologia.....	23
2.8.3. Diagnóstico Molecular.....	24
2.10. Tratamento.....	25
2.11. Prevenção.....	26
2.12. Importância em Saúde Pública.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Animais.....	30
3.2. Amostragem.....	30
3.3. Colheita de sangue.....	30
3.4. Questionário epidemiológico.....	31
3.5. Diagnóstico sorológico da Erliquiose.....	31
3.5.1. Técnica Utilizada.....	31
3.5.1.1. Confeção das lâminas de Imunofluorescência Indireta.....	31
3.5.1.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	32
3.6. Análise de fatores de risco associados à soropositividade para E.canis.....	32
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÕES.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXO.....	50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Distribuição da população de cães atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo sexo e faixa etária, no período de julho de 2007 a junho de 2008..... 33
- Tabela 2. Distribuição da população de cães reagentes e não reagentes para *Ehrlichia canis* atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo a faixa etária, no período de julho de 2007 a junho de 2008..... 34
- Tabela 3. Distribuição da população de cães reagentes para *E. canis* atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo o título de anticorpos, no período de julho de 2007 a junho de 2008..... 35
- Tabela 4. Análise univariada com a distribuição de possíveis fatores de risco associados à infecção por *E. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, no período de julho de 2007 a junho de 2008..... 36
- Tabela 5. Fatores de risco para a infecção por *E. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, no período de julho de 2007 a junho de 2008, determinados por regressão logística múltipla..... 36

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição da população de cães reagentes e não reagentes contra antígenos de *Ehrlichia canis* a Reação de imunofluorescência Indireta (título  $\geq 40$ ) atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo a faixa etária, no período de julho de 2007 a junho de 2008..... 33
- Figura 2. Distribuição da população de cães reagentes para *E. canis* atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo o título de anticorpos, no período de julho de 2007 a junho de 2008..... 34

## RESUMO

Com o objetivo de determinar a soroprevalência da infecção por *Ehrlichia canis*, bem como identificar fatores de risco associados à infecção, foi realizado um inquérito sorológico em 109 cães atendidos no Hospital Veterinário/Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR)/Universidade Federal de Campina Grande(UFCG), Campus de Patos, Estado da Paraíba, Nordeste Brasileiro. Para o diagnóstico sorológico da erliquiose, foi utilizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando-se a amostra Jaboticabal de *E. canis* como antígeno. Soros que apresentaram títulos de anticorpos  $\geq 40$  foram considerados positivos. Das 109 amostras, 79 foram positivas, resultando numa prevalência de 72,48% (IC 95% = 63,10% – 80,60%). Animais que tiveram contato com cães (*odds ratio* = 3,59; IC 95% = 1,41 – 9,12), contato com açudes (*odds ratio* = 8,39; IC 95% = 1,01 – 69,87) e com algum acesso à rua (*odds ratio* = 6,24; IC 95% = 1,28 – 30,39) estiveram mais expostos ao risco de infecção.

Palavras-chave: Erliquiose, cães, *Ehrlichia canis*, soroprevalência, fatores de risco.

## ABSTRACT

Aiming to determine the seroprevalence of *Ehrlichia canis* infection, as well as to identify risk factors associated to infection, a serological survey was conducted in 109 dogs assisted at the Hospital Veterinário/Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR)/Universidade Federal de Campina Grande(UFCG), Campus de Patos, Paraíba state, Northeastern Brazil. For the serological diagnosis of ehrlichiosis, the indirect fluorescent antibody test (IFAT) using the Jaboticabal strain of *E. canis* as antigen, was carried out. Sera presenting antibody titers  $\geq 40$  were considered positive. Of the 109 samples, 79 were positive, resulting in a seroprevalence of 72.48% (95% CI = 63.10% – 80.60%). Animals that had contact with dogs (odds ratio = 3.59; 95% CI = 1.41 – 9.12), contact with dams (odds ratio = 8.39; 95% CI = 1.01 – 69.87) and with some access to the street (odds ratio = 6.24; 95% CI = 1.28 – 30.39) were more exposed to risk of the infection.

Key words: Ehrlichiosis, dogs, *Ehrlichia canis*, seroprevalence, risk factors.

## 1 INTRODUÇÃO

A erliquiose é uma doença infecciosa severa causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*, que possui ampla distribuição mundial com prevalência elevada e de alta morbidade e mortalidade em regiões de clima quente (MCBRIDE et al., 2001; COHN et al., 2003; IRWIN, 2006).

Desde 1932 foram identificadas, em diversas partes do mundo, várias espécies de organismos intracelulares obrigatórios, pertencentes ao gênero *Ehrlichia*. Inclusões celulares eram, até então, as principais evidências da existência desses microorganismos, que mesmo atualmente não têm sua epidemiologia completamente elucidada (EGENVALL et al., 2000).

Rotineiramente, o diagnóstico definitivo de erliquioses é baseado em achados hematológicos, bioquímicos e sorológicos (MCBRIDE et al., 2001). A infecção se caracteriza por diferentes alterações clínicas, distribuindo-se nas fases aguda, subclínica e crônica. Os sinais clínicos geralmente são oriundos de hiperplasia linforreticular disseminada e das alterações hematológicas, muitas vezes com hipoplasia medular na fase crônica (MOREIRA et al., 2003; MORAES et al., 2004).

Segundo Couto (1998) a transmissão entre animais se faz pela inoculação de sangue proveniente de um cão contaminado para um cão sadio, pelo intermédio do carrapato. No entanto, a infecção também poderá ocorrer no momento de transfusões sanguíneas, através de agulhas ou outros utensílios contaminados. A anemia no cão pode ocorrer como resultado de grandes infestações, uma vez que o carrapato se alimenta do sangue do animal. Porém não é necessário uma grande quantidade de carrapatos para que esta doença seja transmitida.

É uma doença observada numa ampla variedade de raças, porém, animais da raça Pastor Alemão desenvolvem uma apresentação mais severa, devido a sua maior susceptibilidade à infecção em relação a outras raças, no entanto, o motivo pelo qual ocorre essa maior susceptibilidade ainda não está claro (HARRUS et al., 1997; ALMOSNY et al., 2002). Por outro lado, animais mestiços parecem ter uma resistência mais elevada às infecções por erliquias (HARRUS et al., 1997).

A primeira cidade brasileira a relatar ocorrência de casos de erliquiose canina foi Belo Horizonte, MG, em 1973. Posteriormente casos foram descritos no Rio de Janeiro, RJ e Santa

Maria, RS (1985) e Curitiba, PR (1988) (ALMOSNY et. al., 2002; MOREIRA et al., 2003). Atualmente há relatos de casos em todo território brasileiro, entretanto existem diferenças no desenvolvimento de sinais clínicos entre as regiões (ALMOSNY et. al., 2002; AGUIRRE et al., 2006).

Morais et al. (2004) mencionam que aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias no Brasil apresentaram anticorpos contra Ehrlichia canis.

O aumento na população canina associado à relação afetiva/emocional do homem com o cão determina a importância desse estudo, já que o cão pode ser responsável pela transmissão de várias doenças, dentre elas a Erliquiose, refletindo assim implicações em saúde pública.

Com o presente trabalho, buscou-se esclarecer alguns aspectos desta importante doença, já que o conhecimento da severidade da infecção, dos fatores de risco envolvidos e das estirpes circulantes é de extrema importância para o estabelecimento da epidemiologia regional desta doença e o aprimoramento de medidas preventivas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A erliquiose canina foi descrita pela primeira vez na Argélia em 1935, por Donatien e Lestoquard, que observaram organismos nas células mononucleares circulantes de cães infestados por carrapatos, o vetor dessa doença. Estes organismos foram chamados inicialmente de *Rickettsia canis*. Posteriormente, em 1945, foi renomeado como *Ehrlichia canis*, em homenagem a Paul Ehrlich, por Moshkovski (HARRUS et al., 1997; ALMOSNY et. al., 2002; COHN et al., 2003). Casos de erliquiose canina foram descritos posteriormente em países como Uganda e Nigéria (ALMOSNY et. al., 2002).

O primeiro caso de erliquiose relatado e descrito nas Américas ocorreu em 1957, na região das Antilhas Holandesas. Tratava-se de uma infecção associada à *Babesia canis* (ALMOSNY et. al., 2002).

Em 1963, houve o primeiro relato de caso da doença nos EUA, no Estado de Oklahoma, identificada através de inclusões celulares no esfregaço sangüíneo de um cão portador de babesiose (RIKIHISA, 1991; ALMOSNY et. al., 2002).

Entre os anos de 1968 e 1969, durante a guerra do Vietnã, diversos cães militares dos EUA e Inglaterra foram acometidos por uma doença caracterizada como síndrome hemorrágica de início súbito e etiologia desconhecida. Denominações diversas como síndrome hemorrágica idiopática, doença do cão rastejador e pancitopenia tropical canina foram propostas (ALMOSNY et. al., 2002).

Em 1969 foi descrita uma doença hemorrágica em cães nativos de Singapura e cães militares na Tunísia (RIKIHISA, 1991; ALMOSNY et. al., 2002).

Apenas no final da década de 1960 estabeleceu-se que o agente etiológico responsável era *E. canis*, classificada como *Rickettsia*. Anteriormente considerava-se que este organismo estava envolvido apenas no desencadeamento de doenças brandas, exceto em filhotes, de forma que novas investigações surgiram para definir o papel do agente (ALMOSNY et. al., 2002).

Posteriormente infecções de cães e equinos foram atribuídas à *E. canis* e outras espécies de *Ehrlichia* (COHN et al., 2003). Entretanto, somente na década de 1980, com o

reconhecimento da erliquiose como possível doença zoonótica fatal, foram intensificadas as pesquisas para caracterização do organismo e definição da patofisiologia do agente (COHN et al., 2003; PADDOCK e CHILDS, 2003).

Em Israel, *E. canis* teve sua ocorrência relacionada à presença do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, vetor do agente causador da doença (ALMOSNY et al., 2002; LOFTIS et al., 2006).

A primeira cidade brasileira a relatar ocorrência de casos de erliquiose canina foi Belo Horizonte, MG, em 1973. Posteriormente casos foram descritos no Rio de Janeiro, RJ, Santa Maria, RS (1985) e Curitiba, PR (1988) (ALMOSNY et al., 2002; MOREIRA et al., 2003).

Atualmente há relatos de casos em todo território brasileiro, entretanto existem diferenças no desenvolvimento de sinais clínicos entre as regiões (ALMOSNY et al., 2002; AGUIRRE et al., 2006).

## 2.2 Etiologia

Essa doença é causada por um grupo de microrganismos, gram negativos, intracelulares obrigatórios e pleomórficos, os quais parasitam células brancas circulantes de várias espécies de animais domésticos e silvestres, inclusive o homem (RIKIHISA, 1991; COHN, 2003).

As espécies do gênero *Ehrlichia* foram primeiramente agrupadas de acordo com suas características de tropismo celular. De acordo com esse sistema, eram divididas em formas monocíticas (*E. canis* e *E. ristici*), formas trombocíticas (*E. platys*) e formas granulocíticas (*E. ewingii* e *E. equi*) (DUMLER et al., 2001; COHN et al., 2003; PADDOCK e CHILDS, 2003). As limitações desse sistema logo se tornaram evidentes, pois as infecções ocorriam em mais de um tipo celular, comprovando que o tropismo celular não é absoluto (COHN et al., 2003; PADDOCK e CHILDS, 2003).

A reclassificação dos organismos se deu com o advento das técnicas de biologia molecular, agrupando novamente as espécies através da comparação de homologia das seqüências ribossomais (DUMLER et al., 2001; INOKUMA et al., 2005).

Suas similaridades permitiram o agrupamento dos patógenos e sua reclassificação, cujas maiores implicações resultaram na realocação de algumas espécies do gênero *Ehrlichia*, família *Rickettsiaceae*, para a família *Anaplasmataceae*. Portanto, os gêneros que atualmente constituem a família *Anaplasmataceae* são *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* (PADDOCK e CHILDS, 2003; INOKUMA et al., 2005; AGUIRRE et al., 2006).

O gênero *Ehrlichia* atualmente compreende cinco espécies válidas: *Ehrlichia canis*, *E. chafeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. Ruminatum* (DUMLER et al., 2001). Uma possível sexta espécie foi identificada recentemente por Shibata et al. (2000) no Japão, onde foi isolada de carrapatos *Ixodes ovatus*, sendo designada como *Ehrlichia* OIE.

Membros do mesmo gênero possuem marcada reação cruzada em testes sorológicos, enquanto essas reações entre cada gênero são mínimas (DUMLER et al., 2001; COHN et al., 2003).

No Brasil a única espécie descrita até o momento é *E. canis*, responsável pela erliquiose monocítica canina, doença considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas, onde abundam populações do carrapato vetor *R. sanguineus* (LABRUNA & PEREIRA, 2001). Esta espécie conhecida como carrapato marrom do cão ou carraça é de grande importância por ser cosmopolita, tendo como hospedeiros principais os cães (GROVES et al., 1975). Segundo Labruna & Pereira (2001) esse artrópode habita ambientes urbanos e tem hábitos nidícolas, vivendo em tocas, ninhos, e até mesmo em esconderijos nos cães. Preferem se fixar nas regiões do pescoço, orelhas, espaços interdigitais e dorso.

### 2.3 Hospedeiros

A *E. canis* foi a primeira *Ehrlichia* a ser descrita como patógeno de importância veterinária, sendo os cães os principais hospedeiros. Canídeos selvagens podem atuar como reservatórios do agente etiológico em questão, tendo sido demonstrada infecção natural em um chacal (*Lycaon pictus*), e experimental em um coiote, com *E. canis* e *B. canis* (ALMOSNY et al., 2002). Segundo Dawson et al. (1991), a mórula da *Rickettsia* responsável pela erliquiose humana nos EUA, assemelha-se bastante àquelas vistas em células infectadas por *E. canis*.

*E. chaffensis* foi o primeiro patógeno do gênero *Ehrlichia* a ser relatado como causador de doenças em humanos na América do Norte. O patógeno cursa com sintomatologia inespecífica, podendo provocar a morte se não for corretamente tratado (COHN et al., 2003; PADDOCK e CHILDS, 2003). Trata-se de um agente endêmico à espécie *Odocoileus virginianus* (*White-tailed deer*), veado típico dos EUA, causando a erliquiose monocítica em humanos, enquanto agentes ainda não completamente caracterizados causam a erliquiose granulocítica humana (PANCIERA et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003).

Considerado um patógeno emergente, *E. chaffensis* provoca infecções especialmente importantes em pacientes imunodeprimidos. Diversos trabalhos ressaltam sua importância em relação a pacientes HIV positivos que desenvolvem quadros frequentemente fatais (PADDOCK e CHILDS, 2003). Animais jovens são naturalmente mais susceptíveis às infecções por esses agentes, pois seu sistema imune ainda não está completamente desenvolvido (ALMOSNY et. al., 2002; PADDOCK e CHILDS, 2003).

Cães são susceptíveis a infecções experimentais por *E. chaffensis* e *E. sennetsu* como descrito por Misao & Kobayashi em 1956 (ALMOSNY et. al., 2002), com demonstrações de infecção moderada a inaparente (COHN et al., 2003; PADDOCK e CHILDS, 2003).

É possível que os carrapatos *Amblyomma americanus* e *Dermacentor variabilis* sejam vetores de *E. chaffensis* nos EUA (ALMOSNY et. al., 2002).

Segundo Andereg e Passos (1999) foram identificados gatos na África do Sul que possuíam anticorpos anti- *E. canis*, assim os gatos podem também atuar como reservatório desse agente. Andereg e Passos (1999) alegam que outros mamíferos, como os roedores, também podem servir como reservatórios, justificando a característica epizootica da erliquiose canina.

## 2.4 Patogenia

O desenvolvimento desta rickettsia inclui três estágios, incluindo corpúsculo elementar, corpúsculo inicial e mórula. Individualmente, o organismo é chamado de corpúsculo elementar, apresentando aspecto geralmente de cocos ou elipses, entretanto, o pleomorfismo é bastante freqüente (MCBRIDE et al., 2001; ALMOSNY et. al., 2002).

A infecção ocorre de forma semelhante aos demais membros do gênero *Ehrlichia*, ocorrendo quando carrapatos infectados alimentam-se e sua secreção salivar é inoculada no local da picada. O vetor na transmissão da erliquiose é o carrapato *R. sanguineus*, conhecido também como carrapato marrom ou vermelho dos cães (HARRUS et al., 1997; ALMOSNY et. al., 2002). Acredita-se que a transmissão se dá durante a fase ninfal e por adultos do artrópode (ALMOSNY et. al., 2002).

Há comprovações de que nenhum carrapato fêmea (teleógina) dessa espécie é capaz de transmitir a *E. canis* para sua progênie, assim como não há evidências do microorganismo no ovário de carrapatos infectados experimentalmente. Esses estudos evidenciam que o *R. sanguineus* é o vetor da erliquiose canina, mas não o reservatório do agente. Depois de infectado, carrapatos transmitem a *Rickettsia* por 155 dias (ALMOSNY et. al., 2002).

O ciclo biológico da *E. canis* nos carrapatos inicia-se quando o mesmo alimenta-se do sangue de cães durante as primeiras semanas após a infecção do animal. O microorganismo se multiplica nos hemócitos e células da glândula salivar do carrapato, penetrando no trato digestivo, promovendo sua infecção. Apesar de se saber que os estágios de vida do agente no carrapato são os mesmos descritos nos cães, o ciclo biológico do agente não está completamente descrito (ALMOSNY et. al., 2002; COHN et al., 2003).

Os corpúsculos elementares do parasita penetram nas células do hospedeiro (monócitos no caso da *E. canis*) através de fagocitose, entretanto, não ocorre fusão fagolisossomal nas células infectadas e os corpúsculos elementares desenvolvem-se, então, no interior desses fagossomos (ALMOSNY et. al., 2002).

A replicação do organismo se dá por fissão binária e após três a cinco dias um pequeno número de estruturas compactas formadas pelos corpúsculos elementares é observado como inclusões pleomórficas (corpúsculos iniciais) (ALMOSNY et. al., 2002).

Após um período de desenvolvimento no interior dos vacúolos (sete a doze dias) os corpúsculos iniciais se desenvolvem, adquirindo a forma de mórula, que é característica desse gênero. A visualização da mórula no interior das células mononucleares ocorre, geralmente, durante os períodos febris (ALMOSNY et. al., 2002; COHN et al., 2003).

Embora ocorram normalmente no interior de células mononucleares de cães, as mórulas podem ser ocasionalmente encontradas no interior de linfócitos e até mesmo neutrófilos (HUXSOLL et al., 1970). É comum que se encontre mais de uma mórula no

interior dos mononucleares infectados. A célula se rompe, liberando esses corpúsculos constituintes da mórula que infectam outra célula que acaba por se romper, iniciando-se, assim, um novo ciclo infeccioso. Essa liberação ocorre por lise ou exocitose (ALMOSNY et. al., 2002).

Acredita-se que as mórulas aproximem-se das membranas citoplasmáticas das células hospedeiras, alterando a sua morfologia, além de promoverem diminuições nos níveis de cálcio (ALMOSNY et. al., 2002).

O agente *E. canis* possui predileção por células encontradas na micro-circulação dos pulmões, rins e meninges de cães, sendo a epistaxe causada por hemorragias características dos pulmões ou mucosa nasal (ALMOSNY et. al., 2002).

Na fase crônica da erliquiose, elas disseminam-se pelo organismo, instalando-se nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e linfonodos, onde se multiplicam em macrófagos e linfócitos, resultando em hiperplasia linforeticular, ocasionando aumento de volume dos órgãos envolvidos (ALMOSNY et. al., 2002).

Células mononucleares infectadas disseminam-se para outros órgãos, onde aparentemente interagem com células endoteliais de vasos de pequeno calibre, induzindo vasculite ou resposta inflamatória perivascular após a migração para o tecido subendotelial (ALMOSNY et. al., 2002).

## 2.5 Sinais Clínicos

A Erliquiose ocorre tipicamente em três fases: aguda, subclínica e crônica (PANCIERA et al., 2001; MCBRIDE et al., 2001).

### 2.5.1 Fase aguda

A fase aguda ocorre após um período de incubação que varia entre 8 e 20 dias e perdura por 2 a 4 semanas. É caracterizada principalmente por hipertermia (39,5 - 41,5 °C), anorexia, perda de peso e astenia. Menos frequentemente observam-se outros sinais inespecíficos como secreção nasal, anorexia, depressão, petéquias hemorrágicas, epistaxe,

hematúria, ou ainda edema de membros, vômitos, sinais pulmonares e insuficiência hepato-renal (DAVOUST, 1993).

É comum que a erliquiose não seja diagnosticada primariamente, pois sinais clínicos inespecíficos como febre, corrimento óculo-nasal, letargia, anorexia, depressão, poliúria, polidipsia, esplenomegalia e linfadenopatia generalizada são sinais clínicos inespecíficos. Além disso, muitos pacientes sobrevivem à fase aguda e permanecem na fase subclínica (ALMOSNY et. al., 2002; COHN et al., 2003).

Caso o animal possua um sistema imune eficiente, ocorre uma forma crônica assintomática, o que caracteriza o "portador são". Caso contrário, ocorre reagudização com amplificação do quadro sintomatológico, podendo levar o animal a morte (DAVOUST, 1993).

Na hematologia observa-se freqüentemente uma trombocitopenia entre 10 a 20 dias pós infecção, em conseqüência da destruição imunológica periférica das plaquetas. Em alguns casos temos também uma leucopenia progredindo para leucocitose e, raramente, observa-se uma anemia aplástica (GREGORY e FORRESTER, 1990).

Os exames bioquímicos mostram uma hiperbilirrubinemia principalmente por betaglobulinemia, assim como um aumento das enzimas TGP, fosfatase alcalina e das bilirrubinas, indicando comprometimento hepático (ANDEREG e PASSOS., 1999).

### 2.5.2 Fase sub-clínica

A fase subclínica da erliquiose, durante a qual o animal permanece aparentemente saudável, está associada à persistência do organismo (mantido nas células mononucleares do baço), concomitantemente à elevação dos títulos de anticorpos séricos (aparecimento de sete a 21 dias após a infecção). O título elevado de anticorpos reflete a ineficiente e exuberante resposta imune, incapaz de eliminar o organismo. Associa-se às manifestações mais severas da fase crônica da erliquiose, dentre elas a síndrome da hiperviscosidade e as glomerulonefrites (ALMOSNY et. al., 2002; COHN et al., 2003).

Nesta fase podem ser encontradas algumas complicações como depressão, hemorragias, edema de membros, perda de apetite, palidez de mucosas, ocasionalmente observa-se hifema, hemorragia sub-retinal, uveíte, descolamento de retina e cegueira

(WOODY e HOSKINS, 1991). Devido a deposição de imunocomplexos, alguns cães poderão apresentar glomerulonefrite (CODNER e FARRUS-SMITH, 1986).

Achados hematológicos desse estágio da doença podem assemelhar-se aos encontrados na fase aguda, incluindo trombocitopenia, anemia arregenerativa e resposta leucocitária variável e hipergamaglobulinemia (COHN et al., 2003).

A duração dessa fase depende da imunocompetência dos cães. Aqueles imunocompetentes são capazes de eliminar o microorganismo, caso contrário, pode ocorrer o desencadeamento da fase crônica da doença (ALMOSNY et. al., 2002).

### 2.5.3 Fase crônica

A fase crônica da doença caracteriza-se pela apresentação de sinais clínicos inespecíficos: perda de peso, letargia, anorexia, além de tendências a sangramentos espontâneos (petéquias, equimoses, epistaxe, hematuria, hematoquesia). Além disso, a persistente estimulação antigênica promove hipergamaglobulinemia, podendo resultar em doenças glomerulares imunomediadas (glomerulonefrite ou síndrome nefrótica), acompanhadas de pancitopenia. Pode ocorrer uveíte e sintomatologia nervosa (ataxia, parestia, deficiências proprioceptivas e nistagmo) (COHN et al., 2003).

A fase crônica da erliquiose assume as características de uma doença auto-imune. Geralmente nesta fase o animal tem os mesmos sinais da fase aguda, porém atenuados; encontrando-se apático, caquético e com susceptibilidade aumentada a infecções secundárias, em consequência do comprometimento imunológico (COUTO, 1998). Alguns animais podem apresentar episódios subsequentes de sangramento por diversos meses, ocasionando a morte (HUXSOL et al., 1970).

Co-infecções (babesiose, hepatozoonose ou infecções oportunistas) são bastante comuns e dificultam a diferenciação de sinais clínicos e achados laboratoriais, muitas vezes exacerbando a sintomatologia da doença (ALMOSNY et al., 2002).

Os exames laboratoriais indicam anemia aplástica, concomitante a monocitose, linfocitose e leucopenia (GREGORY e FORRESTER, 1990).

Em alguns estudos realizados com cães esplenectomizados ficou evidenciado que esses apresentavam sintomas mais brandos que os cães não esplenectomizados, sugerindo que o

baço tem importante papel na patogenia da erliquiose monocítica, produzindo mediadores e outras substâncias capazes de atuar na patogenia da doença, envolvendo mecanismos imunes (ALMOSNY et al., 2002).

## 2.6 Alterações Hematológicas

As anormalidades hematológicas mais freqüentemente observadas em infecções naturais são anemia não regenerativa, trombocitopenia e leucopenia (ALMOSNY et al., 2002). O número de leucócitos comumente varia durante a fase aguda, podendo diminuir em decorrência da indução de seqüestro destes por mecanismos imunológicos (MOREIRA et al., 2003) e, nesse caso, a linfocitopenia e eosinopenia são conseqüências diretas (WADDLE & LITTMAN, 1987). O número de monócitos pode variar consideravelmente, sendo um achado freqüente e indicativo da possibilidade de erliquiose, mesmo antes da observação de mórulas (PAGANI et al., 2000).

Assim como nas infecções naturais (ALMOSNY et al., 2002), nas infecções experimentais por *E. canis* os achados hematológicos mais comuns são anemia arregenerativa, leucopenia e trombocitopenia, sendo a anemia normocítica normocrômica observada na segunda semana pós-inoculação e agravada na terceira semana (CASTRO et al., 2004), e a trombocitopenia encontrada em todas as fases da doença (OLIVEIRA et al., 2000). Pode haver leucopenia entre três a quatro semanas pós-inoculação, com queda no número de neutrófilos segmentados, eosinófilos e linfócitos, com discreto aumento de monócitos (CASTRO et al., 2004).

## 2.7 Lesões

À necropsopia, cães em fase aguda poderão apresentar miocardite intersticial, agregação subendotelial de células mononucleares nos vasos sangüíneos pulmonares, hiperplasia reticuloendotelial multifocal no fígado, proliferação difusa de células reticuloendoteliais na polpa vermelha do baço e células linforeticulares na polpa branca,

linfocitose e plasmocitose perivascular no rim, adenomegalia, hiperplasia linforeticular das zonas paracorticais dos linfonodos, medula óssea normal ou com hiperplasia celular e aumento dos megacariócitos e da relação granulócitos/eritrócitos (HILDERBRANDT et al., 1973).

Já nos quadros crônicos, observa-se a presença de hemorragia em diversos órgãos, linfadenopatia generalizada, edema de membros e hipoplasia medular (BUHLES et al., 1975).

## 2.8 Transmissão

Almosny e Massard (2002) descrevem que a transmissão da *Ehrlichia canis* pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* ocorre quando o mesmo está sugando o sangue do hospedeiro e a secreção de suas glândulas salivares contamina o local da picada. Segundo Almosny e Massard (2002), o *Rhipicephalus sanguineus* é o vetor, mas não o reservatório da erliquiose canina. Labruna e Pereira (2001) mencionam que essa espécie é o vetor natural da *Ehrlichia canis*, agente etiológico da Erliquiose canina.

O carrapato contamina-se ao ingerir leucócitos infectados, daí então a *E. canis* multiplica-se nos hemócitos e nas células da glândula salivar, propiciando, portanto, a transmissão transtadial. Em contra partida, a transmissão transovariana provavelmente não ocorre (WOODY e HOSKINS, 1991; ANDEREG e PASSOS, 1999;)

O cão é infectante apenas na fase aguda da doença, quando existe uma quantidade importante de hemoparasitas no sangue. O carrapato poderá permanecer infectante por um período de aproximadamente um ano, visto que a infecção poderá ocorrer em qualquer estado do ciclo. (WOODY e HOSKINS, 1991).

Segundo Corrêa e Corrêa (1992) os carrapatos passam por quatro estágios evolutivos em seu ciclo de vida: ovo, larva, ninfa e adulto. O mesmo autor menciona que assim que a larva nasce do ovo, ela se alimenta no hospedeiro por alguns dias, quando então faz a ecdise ou troca de pele para o próximo estágio evolutivo, a ninfa; que após se alimentar por alguns dias no hospedeiro realiza uma nova ecdise, neste caso para o adulto, diferenciados entre machos e fêmeas, alimentam-se no hospedeiro por alguns dias, copulam e após alimentação a

fêmea realiza uma única postura de ovos, quando então morre. Os mesmos são infectantes durante a fase ninfa e também adultos.

As principais áreas do corpo dos cães que o *Rhipicephalus sanguineus* parasita são a cabeça, o pescoço, o dorso, as orelhas e os espaços interdigitais (LABRUNA e PEREIRA, 2001)

Como não existem hospedeiros intermediários, transfusões sanguíneas de um doador infectado para um cão susceptível também pode transmitir a doença (ANDEREG e PASSOS, 1999). Almosny e Massard (2002) relatam que a transmissão para o carrapato ocorre de maneira mais efetiva, no período de dois a três semanas após a infecção do cão devido ao maior número de células parasitadas nesta fase.

Estudos demonstraram que nenhum carrapato fêmea infectado transmitiu a *Ehrlichia canis* para sua progênie, assim como não foi possível detectar o microorganismo no ovário de carrapatos infectados experimentalmente. (ALMOSNY e MASSARD, 2002).

Andereg e Passos (1999) descrevem que os cães que se recuperam da doença permanecem portadores, podendo manter a infecção por períodos superiores a 5 anos, apesar do número de parasitos circulantes no sangue de cães com infecção crônica ser menor do que naqueles com infecção aguda acredita-se que seja um número suficiente para infectar o carrapato que então transmite a doença.

Segundo Almosny (2002) infecções experimentais são possíveis através da inoculação subcutânea, intravenosa, intraperitoneal de sangue ou emulsão de órgãos. Canídeos selvagens podem atuar como reservatórios do agente etiológico em questão, tendo sido demonstrada infecção natural em um chacal (*Lycaon pictus*), e experimental em um coiote, com *E. canis* e *Babesia canis*.

## 2.9 Diagnóstico

Não há um teste único para diagnosticar essas doenças. Ao contrário, o diagnóstico é alcançado através da combinação de indicadores clínicos e hematológicos, evidências sorológicas e confirmação molecular.

Colônias de coloração púrpura, contendo grânulos cocóides, presentes em monócitos e neutrófilos de cães foram primeiramente descritas por Neitz & Thomas em 1938 (ALMOSNY et al., 2002). A maior parte das inclusões citoplasmáticas permanece visível por apenas três dias, dificultando o diagnóstico (EGENVALL et al., 1997).

Infelizmente a detecção de membros da família Anaplasmataceae é extremamente difícil, pois são bactérias fastidiosas intracelulares e seu isolamento e caracterização necessitam de laboratórios equipados com sofisticados aparelhos (INOKUMA et al., 2005).

Antes do desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), o diagnóstico das doenças transmitidas pelos carrapatos era dependente de isolamento em cultura celular, análises sorológicas utilizando ELISA, técnicas de imunofluorescência indireta e western immunoblotting (RIKIHISA, 1991; MAGGI et al., 2006).

### 2.9.1 Achados Clínico-patológicos

A infecção pode ser acompanhada de algum grau de trombocitopenia, anemia arregenerativa (moderada a severa), contagem de leucócitos totais variável (diminuída, normal ou elevada) e hiperglobulínia devido a, mais comumente, gamopatia policlonal, porém, também é possível que a gamopatia seja monoclonal, quando deve-se tomar cuidado para que não seja diagnosticada erroneamente como mieloma múltiplo (HARRUS et al., 1997).

Outras anormalidades bastante frequentes dizem respeito à bioquímica sérica, incluindo hipoalbuminemia, elevação da atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA), alanina amino transferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), além de concentrações elevadas de creatinina e uréia. Animais com infecções crônicas, cursando ou não com glomerulonefrites, podem manifestar proteinúria (EGENVALL et al., 1998; COHN et al., 2003).

Aspirados de medula óssea revelam uma citologia alterada, com elevação no número de células plasmáticas associada a hiperplasia (sugestiva de infecções crônicas) ou hiperplasia de outros elementos medulares (infecções agudas ou crônicas) (COHN et al., 2003).

Os infiltrados inflamatórios meningiais são geralmente caracterizados por células monocíticas, linfocíticas e plasmocitárias, distribuídas focalmente ou disseminadamente pela pia-aracnóide, entretanto as células presentes em maior quantidade são os monócitos (PANCIERA et al., 2001).

### 2.9.2 Sorologia

As técnicas sorológicas são as mais rotineiramente empregadas como testes confirmatórios de diagnóstico para infecções por Rickettsias (EGENVALL et al., 1998; COHN et al., 2003).

O princípio dos testes é detectar não o organismo em si, e sim, os anticorpos reativos (COHN et al., 2003; MAGGI et al., 2006).

Esses testes não são totalmente confiáveis, pois a detecção de títulos positivos em áreas endêmicas não é evidência suficiente para garantir que o animal está doente. Outra questão a ser levada em consideração é que animais que são infectados podem eliminar o agente, entretanto os títulos de anticorpos permanecem por bastante tempo, assim, pode-se chegar a resultados falsos positivos. Da mesma forma, títulos negativos não eliminam a possibilidade de infecção, pois o animal pode estar montando sua resposta a infecção ou ainda cessado de produzir anticorpos, como ocorre com animais extremamente debilitados (COHN et al., 2003; MAGGI et al., 2006).

Outra consideração é que anticorpos gerados por estímulo de uma espécie podem ou não reagir com outras espécies (reação cruzada). Espécies classificadas dentro do mesmo gênero possuem, por exemplo, reações cruzadas extremamente fortes, entretanto é esperado que uma reação sorológica mais intensa ocorra em resposta ao organismo que realmente está causando a infecção, todavia, as reações cruzadas não estão relacionadas à proteção cruzada (RIKIHISA, 1991; MAGGI et al., 2006).

Os testes mais comumente utilizados são a imunofluorescência indireta (IFI), na qual os títulos são considerados positivos a partir de 1:40, e testes de ELISA. Técnicas de Western blotting são úteis na diferenciação sorológica de espécies de Ehrlichia e podem ser realizadas em associação com testes sorológicos a fim de obter resultados mais precisos (EGENVALL et al., 1998; COHN et al., 2003; EDDLESTONE et al., 2006).

### 2.9.3 Diagnóstico molecular

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utiliza *primers*, que por definição são pequenos segmentos de nucleotídeos capazes de se ligar a áreas conservadas de DNA do

organismo testado, amplificando uma região do mesmo e, dessa forma, permitindo sua identificação (COHN et al., 2003).

O diagnóstico pode ser feito utilizando *primers* gerais, que selecionam regiões comuns a todos os organismos incluídos no mesmo gênero, ou específicos, que selecionam regiões específicas do DNA de um único organismo. A combinação desses *primers*, utilizando-se primeiramente o geral, a fim de pré-selecionar as amostras positivas para quaisquer parasitas pertencentes ao mesmo gênero, e a seguir utilizar os específicos para a espécie que se procura, é prática bastante freqüente no diagnóstico de hemoparasitoses (MARTIN et al., 2005; MAGGI et al., 2006). Estudos comprovam a maior eficiência dessa prática em relação à utilização unicamente do *primer* geral, pois além de detectar um maior número de amostras positivas, a utilização do *primer* específico detecta a persistência da infecção por períodos mais longos (maior sensibilidade e especificidade) (EGENVALL et al., 2000; MARTIN et al., 2005).

Resultados de PCR podem ser negativos para amostras de sangue devido à retirada de células contaminadas da circulação (*clearance*), sem, contudo, debelar a infecção (EDDLESTONE et al., 2006).

Eddlestone et al. (2006) descreveram a realização de PCR em fragmentos do baço e aspirados de medula óssea, constatando infecção mesmo nos períodos em que os resultados de PCR de amostras sangüíneas eram negativas.

O DNA de algumas espécies de *Ehrlichia* foi detectado por períodos superiores a seis meses utilizando *primers* específicos, além disso, as amostras permaneceram positivas, mesmo quando eram consideradas negativas pelo esfregaço sangüíneo ou pelas condições dos pacientes (EGENVALL et al., 2000).

A utilização de PCR direto detecta o DNA de organismos no sangue e tecidos, porém não fornecem dados quantitativos, razão pela qual a realização de TaqMan PCR (maior sensibilidade e precisão na quantificação do DNA encontrado) é utilizada com bastante freqüência (EDDLESTONE et al., 2006; MAGGI et al., 2006).

## 2.10 Tratamento

O objetivo do tratamento é prevenir a manutenção da doença pelos portadores são (DAVOUST, 1993). Para tanto, diversos fármacos podem ser utilizados no tratamento da erliquiose, entre eles estão: a oxitetraciclina, o cloranfenicol, o imidocarb, a tetraciclina e a doxiciclina.

Destas, a doxiciclina constitui a droga de eleição no tratamento da erliquiose em todas as suas fases. A droga é bem absorvida com rapidez quando administrada por via oral. A distribuição é ampla pelo coração, rins, pulmões, músculo, fluido pleural, secreções brônquicas, bile, saliva, fluido sinovial, líquido ascítico e humores vítreo e aquoso. A doxiciclina é mais lipossolúvel e penetra nos tecidos e fluidos corporais melhor que o cloridrato de tetraciclina e a oxitetraciclina. A eliminação da droga se dá primariamente através das fezes por vias não biliares, na forma ativa. A sua vida média no soro em cães é de 10-12 horas e a "*clearance*" de cerca de 1,7 mL/kg/min. A droga não se acumula em pacientes com disfunção renal e por isso pode ser usada nesses animais sem maiores restrições (BARTSCH e GREENE, 1996).

Na literatura, existem várias indicações de dosagens e tempo de duração do tratamento da erlichiose utilizando-se a doxiciclina. Os critérios para o tratamento variam de acordo com a precocidade do diagnóstico, da severidade dos sintomas clínicos e da fase da doença que o paciente se encontra quando do início da terapia. Bartsch e Greene (1996) recomendam nas fases agudas, a dosagem de 5 mg/kg ao dia durante 7 a 10 dias e nos casos crônicos 10 mg/kg ao dia durante 7 a 21 dias.

A eficácia da doxiciclina no tratamento da erliquiose na dose de 10 mg/Kg/dia em dose única foi demonstrada por vários autores (HOSKINS, 1991).

O tratamento pode durar de 3 a 4 semanas nos casos agudos e até 8 semanas nos casos crônicos. A doxiciclina deverá ser fornecida 2 a 3 horas antes ou após a alimentação para que não ocorram alterações na absorção (WOODY e HOSKINS, 1991).

Alguns autores recomendam prolongar o tratamento por mais de 6 semanas nos casos de erliquiose sub clínica (HARRUS et al., 1997), caso contrário existe a possibilidade da permanência do agente no animal (IQBAL et al., 1994). Porém, segundo Beaufilet et al. (2002),

tratamentos curtos com doxiciclina são capazes de negativar PCR de amostras sanguíneas, eliminando completamente os agentes causadores da infecção.

Freqüentemente deverá ser fornecido um tratamento de suporte, principalmente nos casos crônicos. Assim, deve-se corrigir a desidratação com fluidoterapia, as hemorragias devem ser compensadas pela transfusão sanguínea. Terapia a base de glicocorticóides e antibióticos pode também ser utilizada nos casos em que a trombocitopenia for importante e nos casos de infecções bacterianas secundárias (ANDEREG e PASSOS, 1999).

O prognóstico depende da fase em que a doença for diagnosticada e do início da terapia. Quanto antes se inicia o tratamento nas fases agudas, melhor o prognóstico. Nos cães no início da doença observa-se melhora do quadro em 24 a 48 horas, após o início da terapia (WOODY e HOSKINS, 1991).

## 2.11 Prevenção

A prevenção da doença tem um caráter de suma importância nos canis e nos locais de grande concentração de animais. Devido a inexistência de vacina contra esta doença (MACÊDO et al. 2008), a prevenção é realizada através do controle do vetor da doença: o carrapato. Para tanto, produtos acaricidas ambientais e de uso tópico são eficazes desde que seja realizado o manejo correto.

Todo animal que entre em uma propriedade ou canil, deve ser mantido em quarentena e tratado para carrapatos. Caso seja positivo para *Erlíquia*, deverá ser tratado antes de ingressar na criação, sendo que nas áreas endêmicas, o fluxo de cães deve ser mínimo e quando ocorrer, recomenda-se tratar o animal com doxiciclina por um período de 1 mês (DAVOUST, 1993).

Com efeito, Woody e Hoskins. (1991) propõem o tratamento de animais provenientes de áreas endêmicas de difícil controle de carrapatos, com doses terapêuticas de doxiciclina por mais de uma geração do carrapato transmissor, fazendo com que haja uma diminuição drástica das infecções por *Erlíquia*.

Deve se instaurar um sistema de identificação sorológica dos animais positivos, com o intuito de tratá-los o mais rápido possível, minimizando a amplitude das fontes de infecção, que correspondem aos animais assintomáticos (DAVOUST, 1993).

## 2.12 Importância em Saúde Pública

Há evidências de erliquiose em quase todas as espécies, inclusive humana, já sendo considerada uma zoonose, isto é, pode provocar a mesma doença no homem (INOKUMA et al., 2005). No entanto, existe a necessidade de estudos mais aprofundados a fim de se conhecer a real fisiopatologia da doença, formas de transmissão e vetores envolvidos no processo.

A infecção no homem é conhecida como febre da carraça, e ocorre se o mesmo for picado por uma carraça portadora, e não pelo simples contato com o cão infectado (INOKUMA et al., 2005).

No Brasil, as riquetsioses em humanos vêm ocorrendo na Região Sudeste, causadas pelo agente *Rickettsia rickettsii*, a principal riquetsiose que acomete o homem no país (GALVÃO et al., 2002). Com a utilização de técnicas moleculares, demonstrou-se que muitos casos de erliquiose em humanos estavam associados à infecção por *E. chaffeensis*, agente da erliquiose monocitotrófica humana (EMH). *E. canis* e *E. chaffeensis* apresentam características morfológicas e moleculares semelhantes, distinguíveis apenas por testes moleculares específicos (DAWSON et al., 1991). Mais recentemente, Unver et al. (2001) demonstraram que as amostras de *E. canis*, isoladas de casos humanos de erliquiose da Venezuela, foram detectadas em cães e carrapatos *R. sanguineus* naquele país, sugerindo os autores, o alto potencial de transmissão de *E. canis* do cão para o homem.

Segundo Labruna e Pereira (2001) as espécies de erliquias associadas à doença, no homem, são transmitidas no país pelo carrapato marrom do cão, da espécie *R. sanguineus*. Depois que o indivíduo é infectado, os sintomas da doença surgem, em média, 10 dias depois, podendo se manifestar sob duas formas:

- Erlichiose monocítica humana – Os sintomas principais são febre, dores musculares, dor de cabeça, falta de apetite, vermelhidão da pele, náuseas, vômitos, diarreia,

faringite, tosse, diarreia, dor abdominal e confusão mental. Em mais da metade dos casos, apresenta uma erupção maculopapular ou petequiral, podendo ser confundida com a febre macular das Montanhas Rochosas. Estima-se que somente um terço dos infectados fiquem doentes. A imunidade do indivíduo diminui, o que facilita o surgimento de infecções oportunistas. Assim, o paciente pode ficar curado de uma pneumonia, por exemplo, mas logo em seguida ele contrai outra doença, porque as defesas do seu organismo estão debilitadas (MOREIRA et al., 2003)

- Erlichiose granulocítica humana – Os sintomas iniciais se assemelham ao de um quadro gripal, com febre, calafrios, náuseas e vômitos, aumento dos gânglios e dor de cabeça. A doença é de grau moderado a grave se não for tratada. Exames laboratoriais podem levar o médico a confundir a doença com algum tumor (MOREIRA, 2003).

Além dos sinais clínicos, a realização de exames laboratoriais ajuda na elucidação do diagnóstico da doença. Os resultados mais contundentes evidenciam redução do número de glóbulos brancos (leucopenia), a redução do número de plaquetas (trombocitopenia); uma coloração para granulócitos evidencia grumos de bactérias no interior dos glóbulos brancos, as enzimas hepáticas evidenciam o aumento da transaminase (MOREIRA, 2003)

### 3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em cães atendidos no Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), bem como identificar fatores de risco associados à infecção.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, PB, no período de julho de 2007 a junho de 2008.

### 4.2 Amostragem

Para o cálculo do número de animais utilizados, foram considerados os seguintes parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto; e (c) nível de confiança, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (NOORDHUIZEN et al., 1997; THRUSFIELD, 1995):

$$n = \frac{Z^2 \times P(1 - P)}{d^2}$$

Onde:

$n$  = número de animais a serem utilizados

$Z$  = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95%

$P$  = prevalência esperada de 50% (maximização da amostra)

$d$  = erro absoluto de 10%

De acordo com esses parâmetros, a amostra estipulada para o estudo é de 96 animais. Por motivo de segurança, foram utilizados 109 animais.

### 4.3 Colheita de sangue

A colheita de sangue foi efetuada por punção da veia cefálica utilizando-se escalpes descartáveis de tamanho 21 ou 23, dependendo do animal, e seringas descartáveis de 10 mL. Foram excluídos apenas animais com menos de seis meses de idade.

As amostras de sangue foram colocadas em tubos de vidro individuais, identificadas e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório, aonde foram centrifugadas e estocadas a -20°C para posterior realização do diagnóstico sorológico da infecção por *E. canis*.

#### 4.4 Questionário epidemiológico

Os proprietários dos cães responderam a um questionário epidemiológico, o qual encontra-se em anexo ao trabalho. Este questionário foi elaborado de modo a fornecer dados com o intuito de verificar a ausência ou presença de algumas práticas e condições que atuem como possíveis fatores de risco para a erliquiose canina. As informações obtidas com os questionários foram inseridas em um formulário eletrônico elaborado com o programa Microsoft Access<sup>®</sup>. Antes da digitalização, todos os questionários foram examinados para a verificação de sua integridade.

#### 4.5 Diagnóstico sorológico da Erliquiose

##### 4.5.1 Técnica Utilizada

A técnica utilizada foi a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a qual será descrita a seguir.

##### 4.5.1.1 Confeção das lâminas de Imunofluorescência Indireta

As lâminas foram confeccionadas conforme descrito por Ristic (1972). Monocamadas de células DH82, inoculadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, apresentando 80-90% de infecção, foram desprendidas da garrafa com auxílio de raspadores apropriados (Corning<sup>®</sup>). A suspensão de células foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em Solução Tampão Fosfatada (PBS; pH 7,2; 0,0084M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0018M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,147M NaCl), para obtenção de uma concentração de 10.000 células por ml. Adicionou-se 10µl da solução em cada orifício de lâminas

apropriadas para a imunofluorescência, sendo secadas em temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas em acetona por 10 minutos e depois estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### 4.5.1.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros dos cães foram diluídos a 1:40 (HARRUS et al., 1997; MCBRIDE et al., 2001) em PBS pH 7,2 e aplicados às lamínas com antígeno fixado, sendo incubados por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  em câmara úmida. Em seguida, foi feita lavagem de 10 minutos em PBS 7,2. Após a secagem em temperatura ambiente, foi adicionado o conjugado de coelho anti-IgG de cão (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) na diluição de 1:1000. Novamente as lâminas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e lavadas. Após a secagem, aplicou-se Glicerina pH 8,5 em cada lâmina e estas foram examinadas em microscópio de epifluorescência OLIMPUS®. As amostras consideradas positivas foram sucessivamente diluídas na razão dois, para obtenção do título final. Os soros controles positivo e negativo foram provenientes de um recente estudo de infecção experimental com o isolado Jaboticabal (HASEGAWA, 2005).

#### 4.6 Análise de fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis*

A análise de possíveis fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* foi efetuada com os dados coletados com os questionários epidemiológicos aplicados aos proprietários. As variáveis independentes (possíveis fatores de risco) foram categorizadas e codificadas, deixando-se a categoria de menor risco com o menor código (LATORRE, 2004). Esta categoria de menor risco é considerada a referência para a comparação com as demais categorias.

A análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, cada variável independente foi cruzada com a variável dependente (condição do animal – soropositivo ou soronegativo), de modo que aquelas que apresentaram um valor de  $p \leq 0,2$  pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado (ZAR, 1999), foram selecionadas e oferecidas para a análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (HOSMER e LEMESHOW, 2000), para a definição de um modelo que melhor identificasse os fatores de risco. O nível de significância adotado na

análise múltipla foi de 5%. O ajuste do modelo final foi verificado pelo teste de Hosmer e Lemeshow, pelo qual um  $p \geq 0,05$  indica que o modelo está ajustado. Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 13.0 for Windows.

## 5 RESULTADOS

Foram examinadas, para anticorpos anti-*E. canis*, 109 amostras de cães atendidos no Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, PB. A tabela 1 apresenta a distribuição da população canina amostrada segundo o sexo e a idade.

Tabela 1. Distribuição da população de cães atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo sexo e faixa etária, no período de julho de 2007 a junho de 2008.

Idade (meses)	Número de cães (%)		
	Machos	Fêmeas	Total
06 a 12	17 (58,6)	12 (41,4)	29 (26,6)
12 a 24	11 (45,8)	13 (54,2)	24 (22,0)
24 a 48	11 (64,7)	6 (35,3)	17 (15,6)
48 a 72	11 (57,9)	8 (42,1)	19 (17,4)
Acima de 72	13 (65,0)	7 (35,0)	20 (18,4)
Total	63 (57,8)	46 (42,2)	109 (100,0)

Das 109 amostras examinadas, 79 apresentaram anticorpos anti-*E. canis*, obtendo-se uma prevalência de 72,48% (IC 95% = 63,10% – 80,60%) (Figura 1).

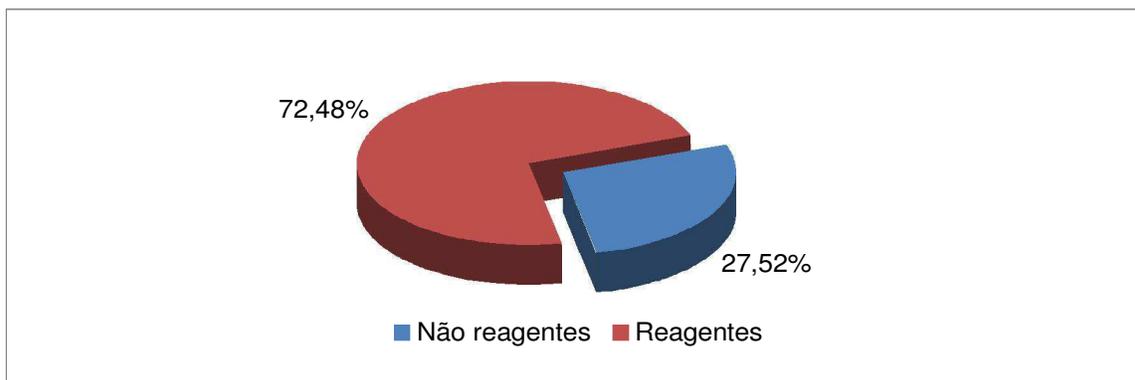


Figura 1. Distribuição da população de cães reagentes e não reagentes contra antígenos de *Ehrlichia canis* a Reação de imunofluorescência Indireta (título  $\geq 40$ ) atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo a faixa etária, no período de julho de 2007 a junho de 2008.

Em relação à faixa etária, foi observado aumento da frequência de reações positivas, conforme o aumento da idade (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição da população de cães reagentes e não reagentes para *Ehrlichia canis* atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo a faixa etária, no período de julho de 2007 a junho de 2008.

Faixa etária (meses)	Número de cães (%)		
	Amostrados	Não reagentes (%)	Reagentes (%)
06 a 12	29	10 (34,5)	19 (65,5)
12 a 24	24	8 (33,3)	16 (66,7)
24 a 48	17	4 (23,5)	13 (76,5)
48 a 72	19	4 (21,1)	15 (78,9)
Acima de 72	20	4 (20,0)	16 (80,0)
<b>Total</b>	<b>109</b>	<b>30 (27,52)</b>	<b>79 (72,48)</b>

Os títulos de anticorpos variaram de 40 a 81.920. A figura 2 e a tabela 3 apresentam as frequências obtidas segundo o título de anticorpos.

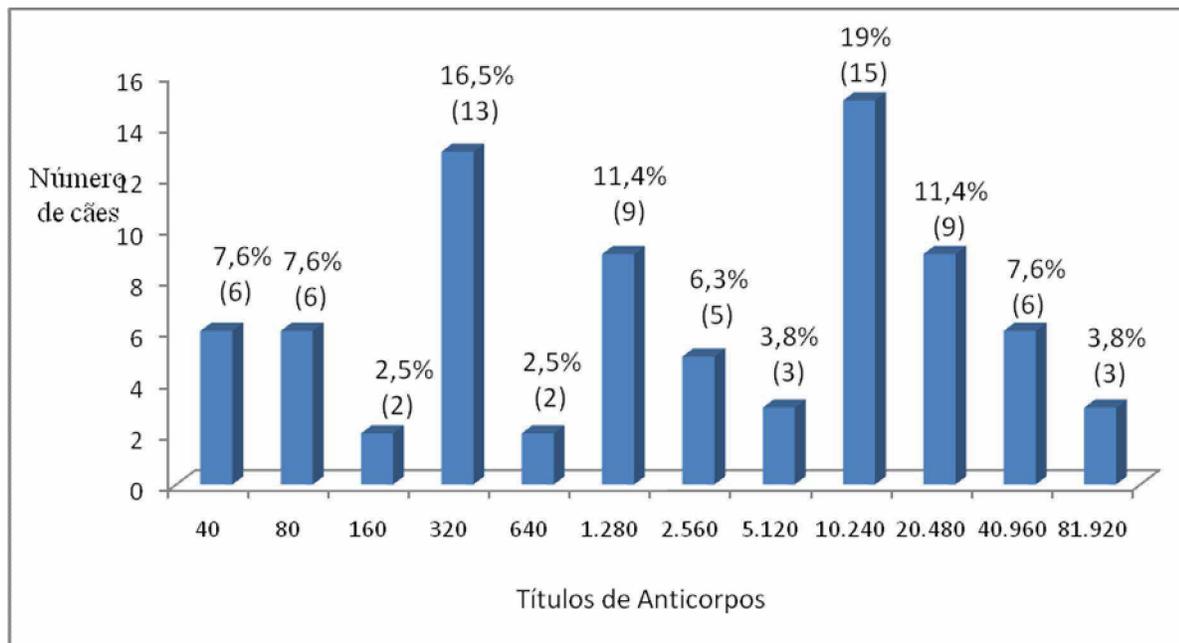


Figura 2. Distribuição da população de cães reagentes para *E. canis* atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo o título de anticorpos, no período de julho de 2007 a junho de 2008.

Tabela 3. Distribuição da população de cães reagentes para *E. canis* atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, segundo o título de anticorpos, no período de julho de 2007 a junho de 2008.

Títulos	Cães	
	Reagentes	%
40	06	7,6
80	06	7,6
160	02	2,5
320	13	16,5
640	02	2,5
1.280	09	11,4
2.560	05	6,3
5.120	03	3,8
10.240	15	19,0
20.480	09	11,4
40.960	06	7,6
81.920	03	3,8
Total	79	100

Os resultados da análise de fatores de risco associados à soropositividade para *E. canis* estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. Na análise univariada, as variáveis mais associadas à ocorrência de infecção foram: tipo de criação, contato com outros animais, contato com cães e contato com açude.

Na análise multivariada, as variáveis apontadas como fatores de risco pela regressão logística múltipla foram contato com cães, contato com açudes e criação semi domiciliar/solta (Tabela 5). O modelo final apresentou um bom ajuste (Teste de Hosmer e Lemeshow:  $\chi^2 = 2,596$ ;  $p = 0,458$ ).

Tabela 4. Análise univariada com a distribuição de possíveis fatores de risco associados à infecção por *E. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, no período de julho de 2007 a junho de 2008.

Variáveis	Sorologia para <i>Ehrlichia canis</i>				P
	Positiva		Negativa		
	N	%	N	%	
<b>Tipo de criação</b>					
Domiciliar	59	67,8	28	32,2	0,057
Semi-domiciliar/Solto	20	90,9	2	9,1	
<b>Contato com outros animais</b>					
Não	21	60,0	14	40,0	0,076
Sim	58	78,4	16	21,6	
<b>Contato com cães</b>					
Não	25	58,1	18	41,9	0,013
Sim	54	81,8	12	18,2	
<b>Contato com açudes</b>					
Não	63	68,5	29	31,5	0,037
Sim	16	94,1	1	5,9	

Tabela 5. Fatores de risco para a infecção por *E. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário/CSTR/UFCG, Campus de Patos, PB, no período de julho de 2007 a junho de 2008, determinados por regressão logística múltipla.

Fatores de risco	Odds ratio	IC 95%	P
Contato com cães	3,59	1,41 – 9,12	0,007
Contato com açudes	8,39	1,01 – 69,87	0,049
Criação semi-domiciliar/solta	6,24	1,28 – 30,39	0,023

Teste de Hosmer e Lemeshow:  $\chi^2 = 2,596$ ;  $p = 0,458$

## 6 DISCUSSÃO

Vários estudos realizados em cães no Brasil referiram a ocorrência de anticorpos anti-*E. canis*. Aguiar (2006) verificou uma soropositividade de 31,2% em 314 cães do município de Monte Negro, RO. Albernaz et al., (2007) examinaram 1.576 cães oriundos da cidade de Campos dos Goytacazes, RJ, e encontraram prevalência de 13,89%. Bergmann et al., (2007) encontraram 6,3% de positividade em 86 cães da cidade de Pelotas, RS. Macêdo et al. (2001) examinaram amostras sanguíneas de 219 cães da cidade de Natal, RN e encontraram prevalência de 26,82%. Fernandes et al. (2008), no período de setembro de 2002 a maio de 2008, avaliaram 55 cães atendidos no Hospital Veterinário Universidade Anhembi Morumbi em São Paulo, SP e dentre esses animais 24 (44%) foram soropositivos. Oyafuso et al. (2002) encontraram uma prevalência de 23 % em 71 cães na região Norte do Paraná.

Em outros países, os valores de prevalência encontrados variaram de zero a 50% na América do Norte (MURPHY et al., 1998), dois a 20% na Europa (PUSTERLA et al., 1998), 30% em Israel (BANETH et al., 1996) e 32 a 68% no continente africano (DAVOUST et al., 1993; MATHEWMAN et al., 1993; NDIP et al., 2005). Em trabalho realizado na Austrália, Mason et al. (2001) verificou ocorrência de infecção em 2% dos cães testados. O resultado encontrado no presente trabalho aponta um valor de prevalência muito alto (72,48%; IC 95% = 63,10% – 80,60%) quando comparados a valores obtidos em outros trabalhos conduzidos no Brasil e no mundo, o que pode ser justificado pelo clima da região. Keefe et al. (1982) referiram que cães situados em zonas tropicais e subtropicais apresentam maiores frequências de infecção por *E. canis*. Além do fato de que as amostras avaliadas foram de animais da rotina de atendimento do HV, o qual buscavam atendimento clínico por motivo de alguma enfermidade, podendo assim ter alguma associação com a alta prevalência.

No presente estudo foi observado aumento da frequência de anticorpos anti-*E. canis* conforme o aumento da idade dos cães, embora não tenha ocorrido diferença uma significativa ( $P > 0,05$ ). Resultados diferentes foram evidenciados por Faierstein et al. (2008), que em estudo da ocorrência de erliquiose canina durante 12 meses no município de Aracaju, SE, observaram uma maior prevalência em cães jovens. De fato, em animais jovens, principalmente com idade inferior a um ano, o sistema imunológico ainda está em formação, o que pode facilitar a infecção por *E. canis*. No entanto, animais mais velhos apresentam

maiores chances de entrar em contato com o agente em função da idade. Some-se a isso o fato de que animais jovens são mantidos pelos seus proprietários a maior parte do tempo sob regime domiciliar e com cuidados especiais, dessa forma diminuindo a exposição ao vetor. Essa maior prevalência em cães mais velhos também foi observado por Conde et al. (2007) em estudo conduzido em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Paulista (UNIP), em Campinas, SP.

A prevalência de anticorpos anti-*E. canis*, quando avaliada segundo o sexo, não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ). O sexo parece não ter importância epidemiológica na infecção por *E. canis*, conforme relatado por Baneth et al. (1996).

Na análise multivariada, o contato com cães foi apontado como fator de risco para a infecção por *E. canis* (*odds ratio* = 3,59; IC 95% = 1,41 – 9,12). Esse dado é muito plausível uma vez que a transmissão da doença se dá de forma indireta pelo contato de um cão sadio com um cão infectado através do carrapato, que se contaminou ao realizar repasto sanguíneo no animal infectado. Com isso, o contato entre cães predispõe maiores chances de infecção, principalmente quando ocorre contato com cães de rua ou de vida livre, que são os maiores propagadores da doença, já que não são submetidos a nenhum tratamento ou medida de prevenção no combate ao vetor.

Outra condição apontada como fator de risco pela regressão logística múltipla foi o manejo do tipo solto ou semi-confinado (*odds ratio* = 6,24; IC 95% = 1,28 – 30,39). Isso evidencia que animais com algum acesso à rua estão mais expostos ao risco de infecção em decorrência de maiores chance de contato com carrapatos infectados. O contato com açude também foi apontado como fator de risco para a infecção por *E. canis* (*odds ratio* = 8,39; IC 95% = 1,01 – 69,87). Esse fato pode ser explicado pela predileção do carrapato transmissor por ambientes úmidos. Em estudo preliminar com cães, Aguiar (2004) discutiu a possibilidade da movimentação dos cães urbanos em ambientes rurais, principalmente porque muitos produtores rurais residem na cidade, e freqüentemente levam os cães às áreas rurais, e vice-versa. É bem provável que a movimentação de cães entre os diferentes ambientes e a presença da infestação pelo carrapato *R. sanguineus* nestes cães contribuíram para a ocorrência da infecção nos cães da zona rural, e que conseqüentemente tiveram contato com açudes.

O presente trabalho é o primeiro a descrever a ocorrência de cães soropositivos para *E. canis* com uma prevalência tão elevada, o que levanta preocupações do ponto de vista de

saúde pública, uma vez que a doença pode ser transmitida para os seres humanos. É necessário a conscientização dos proprietários de cães acerca da adoção de medidas de prevenção da doença, principalmente no tocante ao controle de carrapatos, bem como a realização de testes diagnósticos para a detecção de animais com infecção subclínica, com o objetivo de diminuir a prevalência da infecção e, conseqüentemente, bloquear a transmissão do agente aos seres humanos.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a Erliquiose canina está presente na casuística do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no município de Patos, PB. A prevalência de anticorpos anti-*E. canis* foi muito elevada, o que reforça a necessidade de adoção, por parte dos proprietários, de medidas de prevenção da doença com o objetivo de diminuir a prevalência da infecção e, conseqüentemente, bloquear a transmissão do agente aos seres humanos.

Os fatores de risco associados à ocorrência de erliquiose canina identificados no presente trabalho foram o contato com cães, contato com açudes e criação do tipo solta ou semi-confinada, sendo importante a correção desses fatores com o objetivo de se prevenir a exposição dos animais ao risco de infecção.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Leptospira* spp em bovinos da zona rural do município do Monte Negro, Rondônia: Estudo de possíveis fatores de risco. 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

AGUIAR, D.M. Aspectos epidemiológicos da Erliquiose canina no Brasil. Dissertação (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da universidade de São Paulo. 17p. São Paulo, 2006

AGUIRRE, E., TESOURO, M.A., RUIZ, L., AMUSATEGUI, I., SAINZ, A. Genetic Characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in Dogs in Spain. J. Vet. Med., v.53, p.197-200, 2006.

ALBERNAZ, A.P., MIRANDA, F.J.B., MACHADO, J.A., FAJARDO, H.V. Erliquiose Canina Em Campos Dos Goytacazes, Rio De Janeiro, Brasil. Ciência Animal Brasileira, v. 8, n. 4, p. 799-806, out./dez. 2007

ALMOSNY, N.R.P. Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses. 135p. Rio de Janeiro, 2002.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. et al. Hemoparasitose em pequenos animais domésticos e como zoonose. Rio de Janeiro: L F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. Cap. 1, p. 14-56.

ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose canina-revisão. Clínica Veterinária. n.18, p.31-38, 1999.

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A.; WEINSTER, S.; KEYSARI, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. *Veterinary Record*, v. 138, n. 11, p. 257-259, 1996.

BARTSCH, R.C.; GREENE, R.T. Post-Therapy antibody titers in dogs with Ehrlichiosis: Follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or Doxycycline. *J. of Veterinary Internal Medicine*, vol.10 n.4, p.271-274, 1996.

BEAUFILS, J.P., INOKUMA, H., MARTIN-GRANEL, J., JUMELLE, PH., BARBAULTJUMELLE, M., BROUQUI, P. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. *Revue Méd. Vét.*, v. 153, n. 2, p. 85-90, 2002.

BERGMANN, L.K., SILVA, P.L.S., BULLING, V.M., SILVA, S.P., BERSELLI, M., CAMPELLO, A., COIMBRA, H., ANTUNES, T. Á., MENDES, T.C., KRAUSE, E., NOBRE, M.O. Prevalência de Babesiose e Eriquiose Canina em cães atendidos no Hospital de clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Pelotas, RS. XVI Encontro de Iniciação Científica, pesquisa e responsabilidade ambiental, Pelotas, RS, 2007.

BUHLES Jr, W.C.; HUXSOLL, D.L.; HILDERBRANDT, P.K.- Tropical canine pancytopenia: Role of aplastic anaemia in the pathogenesis of severe disease. *J. Comp. Path.*, 85: 511-21, 1975.

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

CODNER, E.L.; FARRUS-SMITH, L.L. Characterisation of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *J. of Am. Vet. Ass.* 189 (1): 47-50, 1986.

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

CONDE, C.; SCIAMMARELLA, E.; BELOTTI, F.T.C. Estudo da ocorrência de erliquiose em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758), atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Paulista – UNIP - Campinas. 2007.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Outras Rickettsioses. In: *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. Rio de Janeiro: Ed. Medsi, 1992. Cap. 48, p. 477-484.

COUTO, C.G. Doenças Rickettsiais In: BIRCHARD, SHERDING, *Manual Saunders: Clínica de pequenos animais*. Ed. Roca: 139-42, 1998

DAWSON, J.E., ANDERSON, B.E., FISHBEIN, D.B., SANCHEZ, J.L., GOLDSMITH, C.S., WILSON, K.H., DUNTLEY, C.W. Isolation and Characterization of an *Ehrlichia* sp. From a Patient Diagnosed with Human Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n. 2, p. 2741-2745, dec, 1991.

DAVOUST, B. – Canine ehrlichiosis, *Point Vét.*, 25 (151): 43-51, 1993.

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, P.J., DASCH, G.A., PALMER, G.H., RAY, S.C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p. 2145-2165, 2001.

EDDLESTONE, S.M., GAUNT, S.D., NEER, T.M., BOUDREAUX, C.M., GILL, A., HASCHKE, A., CORSTVET, R.E. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. *Experimental Parasitology*, n. 115, p. 205-210, 2006.

ENGENVALL, A.E., HEADAMMAR, A.A., BJÖERSDORFF, A. I. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Veterinary Record*, n.140, p. 222-226, 1997.

EGENVALL, A., BJÖERSDORFF, A., LILLIEHÖÖK, I., ENGVALL, E. O., KARLSTAM, E., ARTUSSON, K., HEADAMMAAR, A., GUNNARSSON, A. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Veterinary Record*, v. 143, p. 412-417, 1998.

EGENVALL, A., LILLIEHÖÖK, I., BJÖERSDORFF, A., ENGVALL, E. O., KARLSTAM, E., ARTUSSON, K., HELDTANDER, M., GUNNARSSON, A. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Veterinary Record*, v. 12, p. 186-190, February, 2000.

FAIERSTEIN, C.C.; SILVA, E.P.; FEBRÔNIO, A.M.B. Notas sobre a Erliquiose canina no município de Aracajú, SE (2006-2007). *Biologia Geral Experimental*, v.02, n.08, p.5-7, 2008.

FERNANDES, P. V. B.; JERICÓ, M. M.; LOPES, P. A.; MOREIRA, M. A. B.; SULTANUM, C. A. R.; ZORZI, V. B.; GONZALEZ, R.; ROLAN, R. T.; KAJIHARA, K. Comparação entre os métodos sorológicos Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico de erliquiose canina em 55 animais. *Caderno de Saúde Publica*, v.18, n.06, 2008.

GALVÃO, M.A.M.; LAMONIER, J.A.; BONOMO, E.; TROPIA, M.S.; REZENDE, E.G.; CALIC, S.C.; CHAMONE, C.B.; MACHADO, M.C.; OTONI, M.E.A.; LEITE, R.C.; CARAM, C.; MAFRA, C.L; WALKER, D.H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do estado de Minas Gerais, Brazil. *Caderno de Saúde Publica*, v.18, n.06, p.1593-1597, 2002.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L., HUXSOLL, O.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). American Journal of Veterinary Research , 36 (7): 937-40, 1975.

GREGORY, C e FORRESTER, S..O. *Ehrlichia canis*, *E. equi*, *E. risticii* infections. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W.B. Saunders: 404-14, 1990.

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. Veterinary Record, v. 141, n. 14, p.360-363, 1997.

HASEGAWA, M.Y. et al. Evaluation of neutrophil oxidative metabolism in canine monocytic ehrlichiosis. Vet Clin Pathol, v.34, p. 213-217, 2005.

HILDERBRANDT, 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., 34 (10): 1309-20, 1973.

HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. Canine Practice, 16 (3): 13-21, 1991.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. Applied logistic regression. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375 p.

HUXSOLL, D.L., HILDEBRANDT, P.K., NIMS, R.M., AMYX, H.L., FERGUSON, J.A. Epizootiology of Tropical Canine Pancytopenia. Journal of Wildlife Disease, v. 6, p. 220-225, October, 1970.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other test for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol., 32 (7): 1658-63, 1994.

INOKUMA, H., OYAMADA, M., KELLY, P.J., JACOBSON, L.A., FOURNIER, P., ITAMOTO, K., OKUDA, M., BROUQUI, P. Molecular Detection of a New *Anaplasma* Species Closely Related to *Anaplasma phagocytophilum* in Canine Blood from South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2934-2937, June, 2005.

IRWIN, P.J. Canine Vector-Borne Disease in Australasia. International CVBD Symposium. P. 8-14, UK, 18 a 20 de abril. 2006.

KEEFE, T.J.; HOLLAND, C.J.; SALYER, P.E.; RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.181, n.3, p.236-238, 1982.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, n. 30, p.24-32, 2001.

LATORRE, M. R. D. O. Medidas de risco e regressão logística. In: MASSAD, E.; MENEZES, R. X.; SILVEIRA, P. S. P.; ORTEGA, N. R. S. Métodos quantitativos em medicina. Barueri: Manole, p. 337-350, 2004.

LOFTIS, A.D., REEVES, W.K., SZUMLAS, D.E., ABBASSY, M.M., HELMY, I.M., MORIARITY, J.R., DASH, G.A. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp. Appl. Acarol*, n. 40, p. 67-81, 2006.

MACÊDO, C.S.C.; ALVES, N.D. ; CAMACHO, B. G. L.; PEREIRA, R.H.M.A.; CARMO, A.L. ; FARIA, J.A. ; ALENCAR, L.P. ; MELO, R.S. ; FEIJÓ, F.M.C. ; DINIZ, A.N. Levantamento da Erliquiose Canina no município de Natal, Rio Grande Do Norte, 2008.

MAGGI, R.G., DINIZ, P.P., CADENAS, M.H., BREITSCHWERDT, E.B. The Use of Molecular Diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. International CVBD Symposium. P. 8-14, UK, 18 a 20 de abril. 2006.

MARTIN, A.R, BROWN, G. K., DUNSTAN, R. H., ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Experimental Parasitology* 109, p.176-180, (2005).

MASON, R.J.; LEE, J.M.; CURRAN, J.M.; MOSS, A.; VAN DER HEIDE, B.; DANIELS, P.W. Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centres of northern Australia. *Australian Veterinary Journal*, v.79, n.8, p559-562, 2001.

MATHEWMAN, L.A.; KELLY, P. J.; MAHAN, S. M.; SEMU, D.; TAGWIRA, M.; BOBADE, P. A.; BROUQUI, P.; MASON, P.R.; RAOULT, D. Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently health dogs in Zimbabwe. *Journal of the South African veterinary association*, v.64, n.3, p.111-115, 1993.

MCBRIDE, J. W., CORSTVET R. E., BREITSCHWEDT, E.B., WALKER, D.H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection with Recombinant Proteins. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 315-322, Jan, 2001.

MORAIS, H.A., ALMOSNY, N.R.P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados com *Ehrlichia* spp. *Clinica Veterinária*, Ano IX, n.48, p. 28-30, janeiro/ fevereiro, 2004.

MOREIRA, S.M., BASTOS, C.V., ARAUJO, R.B. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec*, abr. 2003, vol. 55, no. 2, p. 141-147.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WUITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serological survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology*, v.79, p.325-339, 1998.

NDIP, L.M., NDIP, R. N.; ESEMU, S. N.; DICKMU, V. L.; FOKAM, E. B.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Veterinary Microbiology*, v. 111, n. 1-2, p. 59-66, 2005.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOF, C. M.; GRAAT, E. A. M. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen: Wageningen Press, 1997. 445 p.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C.T.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO, M.B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by “DOT ELISA” in naturally infected dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 9, n.1, p.1-6, 2000.

OYAFUSO, M.K.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H.S.A. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 23, n. 1, p. 71-74, jan./jun. 2002.

PADDOCK, C.D.; CHILDS, J.E. *Ehrlichia chaffensis*: a Prototypical Emerging Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 1, p. 37-64, jan, 2003.

PAGANI, F.; RODRIGUES, L.M.; PINTO, A.R.S.; GOMES, F.A.; MENDONÇA, R. B.; ALMOSNY, N.R.P. Alterações hematológicas observadas em casos de *Ehrlichiose* canina: estudo retrospectivo. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 7, n. suplemento, p. 108-108, 2000.

PANCIERA, R.J., EWING, S.A., CONFER, A.W. Ocular Histopathology of *Ehrlichia* Infections in the Dog. *Vet. Pathol*, v. 38, p. 43-46, 2001.

PUSTERLA, N., PUSTERLA, J.B.; DEPLAZES, P.; WOLFENSBERGER, C.; MÜLLER, W.; HÖRAUF, A.; REUSCH, C.; LUTZ, H. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of Canine Granulocytic Ehrlichia Infection in Dog in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.12, p.3460-3462, 1998.

RIKIHISA, Y. The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiological Reviews*, v.04, n.03, p. 286- 308, 1991.

RISTIC, M. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect Immun*, v.6, p.226-231, 1972.

SHIBATA, S.I.; KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; FUJITA, H.; WATANABE, Y.; SUTO, C.; ITO, T. New Ehrlichia espécies closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from Ixodes ovatus ticks in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 1331-1338, 2000.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 2. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995. 479p.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.8, p.2788-2793, 2001.

ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, p.663,1999.

WADDLE, J.R; LITTMAN, M.P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 24, n. 6, p. 615-620, 1987.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of the dog. *Veterinary Clinical North America: Small animal practice*, 21 (1): 45-98, 1991.

## ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE PATOS

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

<b>1. DADOS DO PROPRIETÁRIO</b>			
Nome:			
Endereço:			N°:
	Bairro:	CEP:	
	Telefone:		
Grau de escolaridade:	<input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> 1º grau incompleto <input type="checkbox"/> 1º grau completo <input type="checkbox"/> 2º grau incompleto <input type="checkbox"/> 2º grau completo <input type="checkbox"/> 3º grau incompleto <input type="checkbox"/> 3º grau completo		
Porque motivo trouxe o animal?			
<b>2. DADOS DO ANIMAL</b>			
Nome:			
Sexo: <input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea			
Idade : <input type="checkbox"/> 6 – 12 meses <input type="checkbox"/> 12 – 24 meses <input type="checkbox"/> 24 – 48 meses <input type="checkbox"/> 4 – 6 anos <input type="checkbox"/> acima de 6 anos			
Raça: <input type="checkbox"/> Sem raça definida <input type="checkbox"/> Com raça definida Qual?			
O animal apresentou alguma vez orquite (MACHOS)? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Já sofreu casos de abortamento? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Nos partos aconteceram casos de natimortos? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
<b>3. MANEJO</b>			
Tipo de criação: <input type="checkbox"/> Domiciliar <input type="checkbox"/> Semi-domiciliar <input type="checkbox"/> Solto			
Alimentação : <input type="checkbox"/> Ração comercial <input type="checkbox"/> Alimento preparado em casa <input type="checkbox"/> Restos de comida			
Tem contato com outros animais? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Se tem, quais são? <input type="checkbox"/> Cães <input type="checkbox"/> Bovinos <input type="checkbox"/> Equídeos <input type="checkbox"/>			

Silvestres	<input type="checkbox"/> Gatos	<input type="checkbox"/> Caprinos/ovinos	<input type="checkbox"/> Suínos
Qual o ambiente onde o animal é criado?	<input type="checkbox"/> terra	<input type="checkbox"/> cimento	<input type="checkbox"/> terra/cimento
É realizada limpeza ou desinfecção do local?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Com que frequência?	<input type="checkbox"/> Diária	<input type="checkbox"/> Semanal	<input type="checkbox"/> Quinzenal
	<input type="checkbox"/> Mensal		
Qual o destino dos materiais de abortamento?	<input type="checkbox"/> Não faz nada	<input type="checkbox"/> Enterra/Queima	<input type="checkbox"/> Joga no lixo
	<input type="checkbox"/> Alimenta outros animais		
O animal tomou alguma vacina? Se sim, quais?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Costuma passear com o animal?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Quando viaja, leva-o junto?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Há quanto tempo viajou? Local:			
4. OUTRAS INFORMAÇÕES			
Ocasionalmente, há ratos em sua residência?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
O animal tem contato com açudes?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	

OBRIGADO!