



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JOSIANE MOREIRA ROCHA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia* sp. A PARTIR DE EXAMES CLÍNICOS,
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ALTERADOS EM CÃES NO MUNICÍPIO DE
ILHÉUS, BAHIA**

ILHÉUS, BAHIA
Fevereiro de 2014

JOSIANE MOREIRA ROCHA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia* sp. A PARTIR DE EXAMES CLÍNICOS,
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ALTERADOS EM CÃES NO MUNICÍPIO DE
ILHÉUS, BAHIA**

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal à
Universidade Estadual de
Santa Cruz.

Área de Concentração: Clínica
e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Amauri Arias
Wenceslau

ILHÉUS, BAHIA

Fevereiro de 2014

R672

Rocha, Josiane Moreira.

Diagnóstico molecular de Ehrlichia sp. a partir de exames clínicos, hematológicos e bioquímicos alterados em cães no município de Ilhéus, Bahia / Josiane Moreira Rocha. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

66f. : il.; anexos.

Orientador: Amauri Arias Wenceslau.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências e apêndice.

1. Cão – Doenças – Ilhéus, BA. 2. Ehrlichia. 3. Carrapatos transmissores de doenças. 4. Animais domésticos – Parasito. I. Título.

CDD 636.70896

JOSIANE MOREIRA ROCHA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia* sp. A PARTIR DE EXAMES CLÍNICOS,
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ALTERADOS EM CÃES NO MUNICÍPIO DE
ILHÉUS, BAHIA**

Ilhéus, 27 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o. Amauri Arias Wenceslau (Orientador)
Universidade Estadual de Santa Cruz

Prof^a. Dr^a Renata Santiago Alberto Carlos
Universidade Estadual de Santa Cruz

Prof^o. Dr^o. Paulo Luíz Souza Carneiro
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/ DCB

ILHÉUS, BAHIA

Fevereiro, 2014

DEDICATÓRIA

A todos que contribuíram financeiramente, intelectualmente, filantropicamente, laboratorialmente ao desenvolvimento desta pesquisa: orientador, professores, colegas, familiares, amigos, proprietários de cães, animais; e aos que contribuirão.

AGRADECIMENTOS

À Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz e à CAPES, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Professor Amauri Arias Wenceslau, pela orientação e pelo apoio.

Aos Professores pelos ensinamentos, correções e pelo apoio recebido durante todo período.

Aos colegas e amigos, pelo empenho, dedicação, resenhas, convívio, aprendizados, auxílio e incentivo.

Aos familiares que amo incondicionalmente.

Aos animais que participaram da pesquisa.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia* sp. A PARTIR DE EXAMES CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ALTERADOS EM CÃES NO MUNICÍPIO DE ILHÉUS, BAHIA

RESUMO

Foram analisados 558 cães do município de Ilhéus, Bahia. Os cães foram submetidos aos exames físicos, hematológicos e bioquímicos. Foram triadas 304 amostras que apresentaram alterações clínicas, hematológicas compatíveis com a infecção por *Ehrlichia* sp. e em seguida as amostras foram submetidas à investigação molecular e parasitológico pela observação de inclusões intracitoplasmáticas ou mórulas em monócitos. Para o diagnóstico direto em lâmina a coloração Panótico® foi utilizada e na molecular na identificação de gênero foram utilizados os *primers* ECC e ECB; a metodologia Nested-PCR com os primers ECAN5 e HE3 caracterizou a espécie *Ehrlichia canis*. Um número de 260 amostras revelaram-se positivas através da investigação molecular. Pela visualização direta em lâmina pelo diagnóstico parasitológico direto coincidiram todas as 88 amostras de inclusões com o diagnóstico molecular. As alterações clínicas inespecíficas e suspeitas representaram 91,65% dos casos da infecção por *Ehrlichia* sp. Além disso, neste total, em cerca de 30% também foram visualizadas mórulas/ inclusões intracitoplasmáticos em monócitos. Após exame hematológico verificou-se diferença significativa entre animais infectados e não infectados nos parâmetros hematócrito, e hemácia indicando anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia, além de elevação da concentração de proteína total. Apesar da avaliação bioquímica manterem-se na normalidade, os valores de ALT e Ureia apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre animais infectados e não infectados. Os dados indicam que estes parâmetros são fortes indicativos de infecção por *Ehrlichia* sp. em cães oriundos de áreas endêmicas.

Palavras Chaves: *Nested-PCR*, trombocitopenia, Erliquiose, *Canis familiaris*, carrapatos.

MOLECULAR DIAGNOSIS *Ehrlichia* spp. FROM CLINICAL CHANGES, HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RANGE IN DOGS IN ILHÉUS CITY, BAHIA.

ABSTRACT

558 dogs were analyzed in the city of Ilheus, Bahia. The dogs were subjected to physical, haematological and biochemical tests. Were screened 304 samples with clinical, hematological changes consistent with infection with *Ehrlichia* sp. and then the samples were subjected to molecular and parasitological research by observing intracytoplasmic inclusions or morulae in monocytes. For the diagnosis right into blade was used Panótico® coloring. For molecular diagnostic identification of *Ehrlichia* ECC and ECB primers were used ; the nested PCR methodology with ECAN5 and He3 primers characterized the species *Ehrlichia canis*. A number of 260 samples were positive by molecular studies. By direct visualization in blade by cytological diagnosis coincided all 88 samples of inclusions with the molecular diagnosis. The suspects nonspecific clinical conditions represented 91.65% of the cases of infection by *Ehrlichia* sp. Furthermore, in total around 30% were also visualized morulae / intracytoplasmic inclusions in monocytes. After hematology, there was a significant difference between infected and uninfected animals in hematocrit parameters, and red cell indicating normocytic normochromic anemia and thrombocytopenia, and elevated total protein concentration. Despite the biochemical evaluation to remain in the normal range, ALT and Urea values showed statistically significant differences between infected and uninfected animals. The data indicate that these parameters are indicative of severe infection with *Ehrlichia* sp. in dogs from endemic areas.

Key words : Nested-PCR , thrombocytopenia , Ehrlichiosis , *Canis familiaris*, ticks

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de cães amostrados em bairros no município de Ilhéus, Bahia...	34
Tabela 2. Hematologia canina referência de normalidade	36
Tabela 3. Valores médios da avaliação hematológica e bioquímicos dos 558 cães do município de Ilhéus.	43
Tabela 4. Valores médios e desvios-padrão (dp) dos exames hematológicos de 304 cães positivos e negativos para Ehrlichia sp. no município de Ilhéus, Bahia.	46
Tabela 5. Valores médios e desvios-padrão (dp) dos exames hematológicos de 304 cães positivos e negativos para Ehrlichia sp. no município de Ilhéus, Bahia.	47
Tabela 6. Análise dos fatores de risco associado com a presença de Ehrlichia sp. em 304 cães selecionados no município de Ilhéus, Bahia.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ALT	Alanina Aminotransferase
µm	micrômetro
10 ³ cel./ µL	1000 células por microlitro
10 ³ cel.	1000 células
µL/%	microlitro, por cento
g/dL	grama por decilitro
pg	picograma
%	percentual
UI/L	Unidade Internacional por litro
U	Unidade
g/dL	grama por decilitro
bp	pares de bases nitrogenadas
mg/Kg	miligrama por quilograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
mL	Microlitro
°C	Graus Celsius
TE	Tampão de Extração
SDS	Dodecilssulfeto de Sódio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
rpm	Rotações por minuto
mM	MiliMolar
P.A.	para análise
M	Molar
ng/µL	nanogramas por microlitro
taqPCR	Taq DNA polimerase
dNTP's	desoxiribonucleotídeos Trifosfatada (ribonucleotídeos: Adenosina, Citidina, Guanosina, Timidina)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	miliMolar
nPCR	NestedPCR

pM picoMol

UI Unidade Internacional

$\times 10^6$ cel./ μ L milhão de células por microlitro

DP desvio-padrão

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ocorrência Mundial de Eriiquiose Monocítica Canina, segundo Bayer HealthCare® em 2013.....	21
Figura 2. Distribuição dos bairros no município de Ilhéus, Bahia, onde foram coletadas amostras de sangue dos cães. Fonte: GoogleMaps.....	35
Figura 3. Animais que apresentaram sinais clínicos sugestivos para ehrlichiose durante a coleta das amostras no município de Ilhéus.	44
Figura 4. Frequência relativa dos principais achados clínicos em cães selecionados para os diagnósticos molecular e parasitológico para Ehrlichia sp.	44
Figura 5. Detecção de DNA de Ehrlichia canis em sangue de cães. C1 =Marcado molecular de peso molecular [1Kb] (invitrogen®) DNA, C2= controle positivo, C3= controle negativo, C4 e C8 = amostra negativa, C5 a C7e C9 = amostra positiva....	48
Figura 6: Visualização de Mórulas de Ehrlichia canis em Monócitos e Vacúolos em citologia de ponta de orelha em cães. Coloração com Panótico Rápido. Fonte: Arquivo Pessoal.	48

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	VI
AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO.....	VIII
<i>ABSTRACT</i>	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XIII
INTRODUÇÃO	XVI
OBJETO GERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
REVISÃO DE LITERATURA	19
HISTÓRICO.....	19
ETIOLOGIA	19
EPIDEMIOLOGIA	20
CICLO BIOLÓGICO.....	21
RESPOSTA IMUNE.....	23
SINAIS CLÍNICOS	24
DIAGNÓSTICOS	26
EXAMES HEMATOLÓGICOS	27
EXAMES BIOQUÍMICOS.....	29
SOROLÓGICO	30
PARASITOLÓGICO.....	31
MOLECULAR	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
LOCAL.....	34
ANIMAIS.....	34

COLETA	35
ANALISE HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA.....	36
SELEÇÃO DOS CÃES PARA PCR	37
DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....	38
EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	38
DIAGNÓSTICO MOLECULAR	39
NESTED-PCR	39
SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	40
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
MULTIVARIADA	41
RESULTADOS	42
SINAIS CLÍNICOS	42
HEMOGRAMA.....	45
BIOQUÍMICO	45
DIAGNÓSTICO MOLECULAR E PARASITOLÓGIO.....	47
ANÁLISE MOLECULAR DOS CARRAPATOS	48
FATORES DE RISCO.....	49
DISCUSSÕES.....	50
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE I	61
ANEXO I.....	64
ANEXO II.....	65

INTRODUÇÃO

Em ambientes urbanos e rurais o desenvolvimento de doenças infecciosas emergentes está em destaque, entre elas, as infecções por *Ehrlichia sp.* tem despertado interesse veterinário devido à ubiquidade, ao aumento do número de casos, ocorrência de sinais inespecíficos, número de óbitos, mas também pela importância epidemiológica de potencial zoonótico, assim como associação com carrapatos em cães domiciliados.

O gênero *Ehrlichia sp.* foi reclassificado por Dumler et al., (2001), sendo que o agente etiológico da Eriquiose Monocítica Canina pertence à espécie *Ehrlichia canis* (Anaplasmataceae: Rickettsiales). Esta enfermidade predomina em regiões tropicais e subtropicais de quase todos os continentes, e o ciclo biológico está associado aos carrapatos de hábitos nidícolas da espécie *Rhipicephalus sanguineus*.

Alguns testes diagnósticos são mais eficazes na prática clínica em relação a outros, entretanto o diagnóstico padrão ouro não foi estabelecido.

A visualização de inclusões intracitoplasmáticas e mórulas em monócitos são possíveis por exame parasitológico direto ao microscópio óptico. O exame molecular reduz o tempo para o diagnóstico, pois detecta a infecção já no período pré-patente, já que pode ser aplicado em todas as fases da infecção, auxiliando no diagnóstico precoce além de também ser específico e aplicado na determinação da espécie.

Os parâmetros clínicos permitem monitorar o paciente avaliando as alterações como trombocitopenia, anemia e, junto às alterações em exames bioquímicos fornecem o estado clínico e prognóstico da enfermidade nos cães infectados.

Carrapatos *R. sanguineus*, contaminados durante o repasto sanguíneo em cães infectados, tornam-se hospedeiros invertebrados e potenciais transmissores horizontais e transestadiais desta infecção por *E. canis* que são inoculados nos cães a partir da hematofagia e, quando fagocitados pelos monócitos de cães multiplicam-se por divisão binária. Além da exposição de hospedeiros a ambientes com os vetores, há contaminação pelo contato através de transfusão sanguínea a partir de sangue doadores infectados, mas de menor importância epidemiológica.

Diante dos três diferentes estágios clínicos da enfermidade nos cães infectados, é na fase aguda que há visualização de mórulas em monócitos

periféricos. Este exame coincide com o aparecimento de sinais clínicos inespecíficos como a febre, perda de apetite e de peso, petéquias, lacrimejamento nos cães, isso após 20 dias em período pré-patente.

Na fase subclínica, os sinais são imperceptíveis, mas a infecção pode durar entre cinco meses até anos sem desenvolver sintomas. A fase crônica apresenta o pior prognóstico evidenciado por depressão de medula óssea e sinais mais severos, e, quase sempre desencadeando óbito devido, principalmente, à pancitopenia.

A prevalência de *E. canis* em cães varia de acordo com a sensibilidade da técnica diagnóstica aplicada, sendo que estudos de prevalência usando diversas técnicas diagnósticas apontam que cães já foram ou estão expostos ao *Ehrlichia sp.* entre 7,8% e 53% em diversas regiões do Brasil. O Nordeste apresenta soroprevalência entre 14% e 43%.

A detecção molecular a partir do *gene 16S rRNA* identifica a espécie *E. canis* a principal que acomete os cães, sendo considerado um método de diagnóstico muito eficiente.

Sabendo-se que ocorrem no município de Ilhéus, Bahia, a erliquiose monocítica canina objetivou-se a investigação molecularmente da infecção por *Ehrlichia sp.* e *E. canis* em cães domiciliados e correlacionar os sinais clínicos e os dados dos exames laboratoriais dos animais.

OBJETO GERAL

Avaliar e caracterizar *Ehrlichia* sp. em cães domiciliados com alterações em exames clínicos, hematológicos e ou bioquímicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detecção de *Ehrlichia* sp., por meio do diagnóstico molecular em cães domiciliados do município de Ilhéus, Bahia;
- Verificar a ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães positivos para gênero utilizando a técnica Nested-PCR;
- Comparar as metodologias: Nested-PCR e teste parasitológico direto para *E. canis*;
- Correlacionar às alterações observadas nos exames hematológicos e bioquímicos com a positividade para *Ehrlichia* sp.

REVISÃO DE LITERATURA

HISTÓRICO

Antes mesmo que a determinação do agente e a predileção pelas células monocitárias fossem estabelecidas, a denominação da enfermidade era inerente aos sinais clínicos como pancitopenia tropical canina, síndrome hemorrágica idiopática, febre hemorrágica, tifo canino e, outras vezes, pela função ou predisposições que os cães desenvolviam e que eram denominadas como, por exemplo, moléstia do cão farejador, e então identificaram presença de microrganismos denominando-a inicialmente rickettsiose canina e posteriormente, erliquiose monocítica canina (CARLOS et al., 2005).

A erliquiose é descrita como doença infecciosa cujos agentes causam sofrimento e morte em animais e humanos (CARLOS et al., 2011). A erliquiose monocítica canina cujo agente etiológico foi inicialmente descrita como *Rickettsia canis* no início da década de 40 na Argélia por Donatien e Lestoquard, (1935), sofreu reclassificação, aceita atualmente como *Ehrlichia canis* (Anaplasmataceae: Rickettsiales) por Dumler et al., (2001).

A repercussão mundial da espécie *Ehrlichia canis* ocorreu durante a guerra do Vietnã (1965-1975), em que diversos cães da raça Pastor Alemão apresentaram sinais graves incluindo pancitopenia e óbitos (ALMOSNY, et al. 2002). No Brasil, o primeiro relato de erliquiose monocítica canina foi realizado em Minas Gerais, 10 anos após o primeiro relato na América (COSTA et al., 1973; ALMOSNY, et al. 2002).

ETIOLOGIA

Confirmando-se após estudos parasitológicos e, de técnicas mais específicos como sorológicas e moleculares, a erliquiose, abrange as doenças infecciosas provocadas pelas diversas espécies de *Ehrlichia* sp., envolvidas com os principais acometimentos em cães. A erliquiose monocítica canina, que se refere à presença de mórulas em monócitos, corresponde à fase aguda e, cuja principal espécie relacionada é *E. canis*, apesar de a *E. chaffeensis*

também serem parasitas intracelulares de macrófagos (CARLOS et al., 2005; HARRUS et al., 2011).

Denominações como riquetsiose canina, tifo canino, síndrome hemorrágica idiopática, febre hemorrágica canina e moléstia do cão rastreador são atribuídos em decorrência dos sinais clínicos observados e que são comumente relatados na literatura referindo-se à infecção em cães por microrganismos do gênero *Ehrlichia sp.* (DUNN et al., 2001; ALMOSNY, et al. 2002; HARRUS et al., 2002).

Ehrlichia canis são microrganismos pequenos que apresentam entre 0,5 a 10 µm, pleomórficos, imóveis, gram-negativos, intracelulares obrigatórios (BEER, 1988; DUMLER et al., 2001; HARRUS, WANER et al, 2011). Por serem intracelulares estritas, o cultivo *in vitro* só é possível utilizando-se células especiais da linhagem de macrófagos de cães (DUNN, 2001; NAKAGHI et al., 2008).

Após verificado que uma subespécie de *Ehrlichia canis* podem acometer seres humanos, confirmados a partir de isolados e por meio de análises sorológicas e moleculares na Venezuela, a importância desta, no cenário mundial foi alterada, passou a ser considerada emergente e, necessário que o vetor *R. sanguineus* fosse monitorado (MCDADE et al., 1990; UNVER et al., 2001; ALMOSNY et al., 2002; DANTAS-TORRES et al., 2006).

EPIDEMIOLOGIA

Em quase todos continentes já foram identificadas *E. canis* em monócitos de cães, como pode ser visualizado na Figura 1. Quanto à distribuição mundial, determinadas regiões são consideradas enzoóticas, ou seja, pelo menos 50% dos cães foram expostos a *E. canis* (KAKOMA et al., 1994; HARRUS et al. 1997a.; DAGNONE et al., 2003; FONSECA et al., 2013).

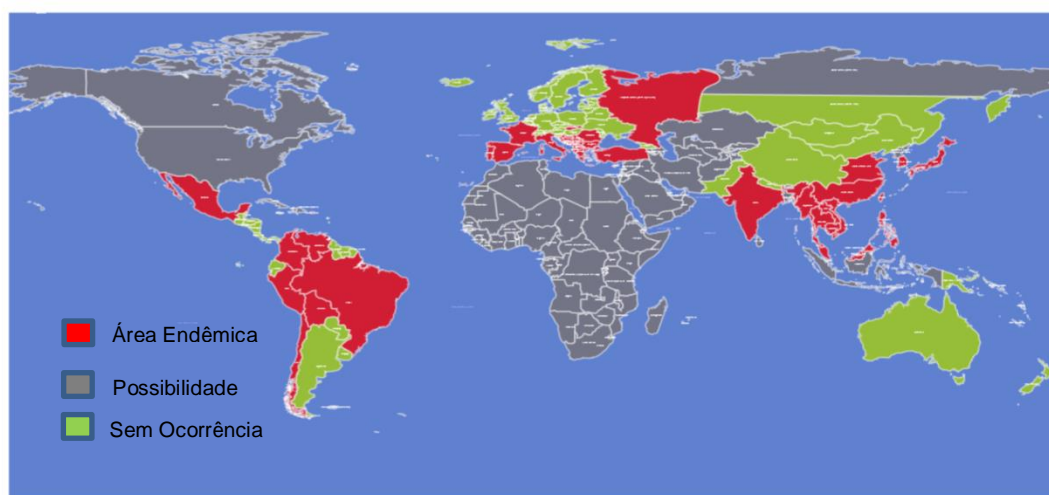
Os fatores de risco associados à Erliquiose em cães são influenciados pelo clima, exposição aos carrapatos, ainda que não seja visualizado adultos – mesmo porque há transmissão em todos estádios, ou seja, tanto o ambiente e hábitos dos cães como acesso à rua, mas também transfundidos (UNVER et al., 2001; PEREZ et al., 2006; CARLOS et al., 2011). Ambos os sexos, as

diversas faixas etárias, diferentes raças dos cães são susceptíveis à enfermidade, apesar de alguns apresentarem intensidade de acometimento variável (NAKAGHI *et al.*, 2008; CARLOS *et al.*, 2011; SALES *et al.*, 2012).

Estudos de prevalência usando diversas técnicas diagnósticas de *Ehrlichia sp.* em cães apontaram resultados que variaram entre 7,8% e 53% nas diversas regiões do Brasil (CARLOS *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2013). Diagnóstico parasitológico direto em lâminas, ou seja, a visualização das mórulas nos monócitos variam entre 1% a 15,3% em diversas regiões no Brasil (CARLOS *et al.*, 2011; SALES *et al.*, 2012).

No Nordeste os resultados de prevalência sorológica para o gênero *Ehrlichia sp.* encontraram-se entre 14% e 43% (BULLA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2008; CARLOS *et al.*, 2011 VIEIRA *et al.*, 2011).

A sorologia foi utilizada como diagnóstico de *Ehrlichia sp.* e detectou 43% de animais soropositivos no município de Ilhéus, Bahia (CARLOS *et al.*, 2011). Em outro trabalho, no mesmo município, o diagnóstico molecular (NestedPCR) verificou que 10,7% das amostras de sangue total dos cães estavam positivas (Carvalho *et al.*, 2008).



Fonte:

Copyright Bayer HealthCare AG: Europe February 2013, Asia Pacific March 2013, North America August 2012, Latin America May 2009

Figura 1. Ocorrência Mundial de Eriquiose Monocítica Canina, segundo Bayer HealthCare® em 2013.

CICLO BIOLÓGICO

A espécie *Ehrlichia canis* apresenta transmissão associada entre artrópodes, carrapatos que apresentam hábito nidícola, heteroxenos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, epidemiologicamente adaptados à transmissão horizontal e transtadial aos cães (DUMLER et al., 2001; ALMOSNY et al., 2002; HARRUS et al., 2011).

No momento que *R. sanguineus* entra em contato com sangue infectado durante o hematofagia, torna-se infectado com *Ehrlichia* sp. que se multiplicam por divisão binária e, estes realizam percurso intestino aparelho bucal. Neste local, os carrapatos podem ser capazes de infectar outros animais inoculando o microrganismo no local da picada (DAVOUST et al., 1999; DAGNONE et al., 2003; CARLOS et al., 2011; HARRUS et al., 2011).

O comportamento heteroxeno permite que os *R. sanguineus*, após mudança de estádios, sejam capazes de infestarem diferentes cães, dando então início a um novo ciclo, após a inoculação de saliva contendo *E. canis* (BUHLES et al., 1975; KAKOMA et al., 1994; BIRCHARD et al., 1998; HARRUS et al., 2011).

A transmissão transovariana ainda não foi comprovada nesse vetor artrópode (DAVOUST et al., 1999).

Não há consenso quanto ao fato da visualização de animais infestados por carrapatos estarem predispostos ao *E. canis*, visto que o percentual *R. sanguineus* no estágio adulto encontram-se positivos entre 2,3 a 6,2%, o que pode indicar a atuação dos outros estágios na perpetuação do ciclo (AGUIAR et al., 2007; SANTOS et al., 2011).

Além disso, a importância dos carrapatos *R. sanguineus* se dá porque permanecem infectantes por até 155 dias, mesmo em condições ambientais adversas, além de apresentarem hábitos nidícolas, e serem heteroxenos (BUHLES et al., 1975; KAKOMA et al., 1994; HARRUS et al., 2011).

Há evidências moleculares de que *E. canis* foram identificados em *Dermacentor* spp. e *Ixodes* spp., porém, este fato não os tornam vetores da infecção para os cães (ETTINGER et al., 2004; CARLOS et al., 2011).

O ciclo no hospedeiro vertebrado tem início após inoculação da saliva contaminada do carrapato, ou ainda de forma iatrogênica, por transfusão, inoculação subcutânea de sangue contaminado (BUHLES et al., 1975; KAKOMA et al., 1994; HARRUS et al., 2011).

RESPOSTA IMUNE

Quanto à imunidade, os estudos da resposta frente à infecção por *E. canis* são escassos em cães, mas atribui-se boa parte dos sinais clínicos à liberação de mediadores da inflamação como as citocinas, secreção de defensinas ou radicais livres de oxigênio e com isso há resposta inflamatória e, desencadeamento de sinais inespecíficos vinculados (GRASSMÊ et al., 2001; SANCHEZ et al., 2013).

O mecanismo de defesa desempenhado pelos monócitos é a fagocitose e, após a fusão dos fagossomos com os lipossomos há uma inativação da multiplicação das partículas o que incluem as bactérias, e, frente a este mecanismo de defesa às *E. canis* inibem esta fusão, e, permanecem multiplicando-se nos monócitos de cães, este processo é interrompido principalmente quando é ativada e há apoptose das células mononucleares (SALES, 2012; SANCHEZ et al., 2013).

A partir da fagocitose há liberação de mediadores da inflamação como as citocinas, secreção de defensinas ou radicais livres de oxigênio, mas vinculados com isso, os sinais inespecíficos ocorrem relacionados à resposta inflamatória (GRASSMÊ et al., 2001; SANCHEZ et al., 2013). A monocitose é um resultado recorrente na infecção e, por isso, cogita-se a hipótese de que estas bactérias controlem a apoptose de monócitos e, portanto, o processo de liberação de mediadores inflamatórios continua ativado (DAVOUST et al., 1999; HARRUS et al., 1999).

Ainda quanto a influencia de outras células relacionadas com o sistema imune, associam-se a infecção em fase aguda por *E. canis* com a indução de gamaglobulina monoclonal e, como consequências variados acometimentos em toda orbita ocular (Harrus et al., 2002; Vieira et al. 2011).

Verificaram que a disfunção plaquetária e monocitária são principais causa da patogênese ocular, esta disfunção somada à paraproteinemia promovem, entre outros sinais, opacidade de retina, aumento de pressão oncótica, uveítes atingindo a retina, conjuntivites, além de glaucoma secundários, induzidos pela hiperviscosidade dos fluidos oculares, o que

podem incluir gamopatia monoclonal em decorrência de hiperprodução plasmocitária (HARRUS *et al.*, 2002; ACCETTA 2008).

Em regiões endêmicas há focos de carrapatos no ambiente dos cães, que podem reinfetar-se e apresentarem quadro agudo recidivo de erliquiose monocítica canina, já que não há resposta imune persistente e, além disso, até o momento não há vacinas comerciais capazes de debelar a infecção, o que pode indicar que a via de ativação da memória e IgG não são eficazes no combate à infecção (DAGNONE *et al.*, 2001; ACCETTA 2008).

SINAIS CLÍNICOS

A infecção por *Ehrlichia sp.* pode desencadear sinais clínicos inespecíficos, após período pré-patente, que chega a durar entre 8 até 21 dias (HARRUS *et al.*, 1997a).

As denominações inerentes aos sinais clínicos como pancitopenia tropical canina, riquetsiose canina, tifo canino, síndrome hemorrágica idiopática, febre hemorrágica, erliquiose monocítica canina são comuns e, outras vezes, a enfermidade recebe nome inerente à atividade que os cães desenvolvem como, por exemplo, moléstia do cão farejador (CARLOS *et al.*, 2005).

Após infecção experimental definiu-se que esta enfermidade pode ser dividida em fases clínicas distintas: aguda e crônica, e também na subclínica, esta última apresenta sinais discretos ou quase sempre imperceptíveis ao exame físico (DAGNONE *et al.*, 2003; MENESES *et al.*, 2008; SHIPOV *et al.*, 2008; CARLOS *et al.*, 2011).

Os sinais clínicos estão geralmente ligados com a resposta de defesa à infecção, desencadeando sinais de inflamação, tendo os sinais associados à ineficácia ou ao descontrole da resposta imune no combate à infecção (GRASSMÊ *et al.*, 2001; SANCHEZ *et al.*, 2013).

Os primeiros sinais observados na fase aguda estão relacionados à mudança comportamental alimentar (apatia, anorexia, perda de peso) e, outros sinais como febre e aumento de órgãos foram observados tais como fígado, linfonodos e baço (CARLOS *et al.*, 2011). Nesta fase ainda, os sinais podem variar de moderados a severos, mas também, muitos destes são inespecíficos

e podem estar relacionados à outros agentes infecciosos como *Babesia* spp., e *Leishmania* spp., (MENESES et al., 2008; CARLOS et al., 2011).

Ainda na fase aguda, as alterações ao exame físico relacionadas à disfagia ou comportamento alimentar apresentam frequências variáveis como apatia (89,2%) e anorexia/ hiporexia (72,9%), mas outros sinais como vômito, corrimento muconasal e, outros não menos importantes, também são relatados na infecção por *Ehrlichia* sp. (SHIPOV et al., 2008)

Sinais como lacrimejamento muco-seroso e mucopurulento, uveíte, edema de córnea e podendo levar à glaucoma secundário e passaram a ter maior destaque, devido a constante observação (KOMNENOU, et al., 2007; SANTARÉM et al. 2008; DANIEL et al., 2010; VIEIRA et al., 2011)

Os sinais que ocorrem eventualmente são: emaciação e edemas periféricos e intersticiais, hepatomegalia, pneumonia, apatia, caquexia, equimoses, poliartrites, hematúria, edema, e hemorragias em conjuntiva e gengiva, estas alterações ocorrem como resultado de trombocitopenia e lesão de endotélio vascular (HILDEBRANDT et al., 1973; REARDON et al., 1981; VALLI 1993; HARRUS et al., 1998a).

A epistaxe nos casos de infecção por *E. canis*, é restrita em casos críticos cuja contagem de trombócitos está abaixo de 25.000/mm³, em diversos relatos (CASTRO et al., 2004; BORIN et al., 2009; HARRUS et al., 2011). Outros autores relacionam a epistaxe à fase crônica de Erliquiose em cães (VIEIRA et al., 2011).

Além disso, após o período agudo há persistência de palidez (HARRUS et al., 1997b; HARRUS et al., 1997; ETTINGER et al., 2004), mas, sob tratamento adequado, a cura ocorre para a maioria dos animais, porém alguns evoluem à fase subclínica.

Na fase subclínica, ou seja, casos assintomáticos em cães infectados experimentalmente verificam-se trombocitopenia, associada com altos títulos de anticorpos contra *E. canis*, e cuja infecção levam até 5 anos sendo que a presença do parasito são detectados sorológico ou molecular, porém não há consenso quanto ao tratamento nesta fase (HARRUS et al., 2002; DAGNONE et al., 2003; BULLA et al., 2004; BORIN et al., 2009).

Durante a fase subclínica, a trombocitopenia é vista como sinal mais marcante, e em 45% dos casos a contagem pode estar abaixo de 140.000/ μ L.,

mesmo não necessariamente acompanhada por anemia e leucopenia (HARRUS et al., 1998b; HARRUS et al., 2001; ACCETTA 2008; HARRUS et al., 2011).

A trombocitopenia, quase sempre está relacionada à pancitopenia hipoplásica e, também anemia arregenerativa na fase crônica, provocando um quadro mais severo e quase sempre terminal (HARRUS et al., 1997a).

A fase crônica apresenta duração variável e, nesta fase é maior o número de casos fatais e, as principais alterações são a pancitopenia, lesões hepáticas, renais e o óbito, também podem ser verificadas alterações no perfil bioquímico, mas os animais apresentam baixa parasitemia, o que torna cães potencialmente portadores e com diagnóstico falso negativo pelo diagnóstico parasitológico direto (BUHLES et al., 1975; BIRCHARD et al., 1998; KAKOMA et al., 1994; HARRUS et al., 1999; STICH et al., 2002 SANTARÉM et al. 2008).

Na fase crônica a pancitopenia pode ocorrer devido ao comprometimento da medula óssea (ETTINGER et al., 2004), e em presença de infecções secundárias ou hemorragias em decorrência de trombocitopenia, torna neste casos o prognóstico obscuro (HARRUS et al., 1997a; HARRUS et al., 1997b; ETTINGER et al., 2004; BORIN et al., 2009).

DIAGNÓSTICOS

Ehrlichia sp. provocam alterações clínicas inespecíficas e, por isso, são necessários testes diagnósticos complementares à suspeita clínica como: exames hematológico (ACCETTA 2008; BORIN et al., 2009; SILVA et al., 2011), bioquímicos (SANTAREM et al., 2008), investigação sorológicas (CARLOS et al., 2011), parasitológico (BORIN et al., 2009) e moleculares (HARRUS et al., 2011), sendo imprescindíveis para compreensão dos efeitos inerentes à infecção, e como consequência, para avaliação do prognóstico (SHIPOV et al., 2008).

Alguns destes exames sorológicos apresentam resultados cruzados com outras doenças infecciosas como Leishmaniose, Babesiose e Leptospirose, mas estas doenças também podem ocorrer concomitantes à Erliquiose, o que torna o diagnóstico difícil, mas a trombocitopenia pode ser usada como teste

diagnóstico diferencial (HARRUS *et al.*, 1998; DUNN *et al.*, 2001; KATAOKA *et al.*, 2006; HARRUS *et al.*, 2011).

A presença de inclusões intracitoplasmáticas por citologia e indícios moleculares é comum a partir de amostras de sangue, mas também foram verificadas em órgãos como baço e fígado (MYLONAKIS, *et al.*, 2003; BORIN *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; CARLOS *et al.*, 2011).

Visto que as técnicas moleculares (PCR) necessitam de quantidade suficiente de DNA bacteriano (IQBAL *et al.*, 1994). Também é possível verificar o DNA extraído dos carrapato ou sangue total de cães (KAKOMA *et al.*, 1994; IQBAL *et al.*, 1994; HARRUS *et al.*, 1997a; DAGNONE *et al.*, 2003; BULLA *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2013).

EXAMES HEMATOLÓGICOS

Os exames hematológicos são imprescindíveis para a definição do prognóstico de Erliquiose, permitem avaliar indiretamente alterações medulares como: aplasia de medula óssea, tempo de coagulação, anemia, anisocitose e policromasia em hemácias (BUHLES *et al.*, 1974; DUNN *et al.*, 2001; ACCETTA 2008) e pancitopenia (KATAOKA *et al.*, 2006). Após um ano do tratamento, todos os parâmetros sanguíneos voltam à normalidade, é o que demonstram exames hematológicos (ACCETTA 2008).

A trombocitopenia deve-se ao aumento da taxa de sequestro de plaquetas circulantes realizado por órgãos linfóides que ocorre junto com as células infectadas por *E. canis*. Já o consumo se deve por microlesões em epitélio vascular causadas pelo agente e ativação de fatores de coagulação e mediadores de inflamação e, conseqüente diminuição dos trombócitos (BUHLES *et al.* 1975; DUNN *et al.* 2001; ETTINGER *et al.* 2004).

A trombocitopenia imunomediada ($<160 \times 10^3$ cel.) é um achado laboratorial recorrente em todas as fases clínicas e quando há suspeitas, frequentemente é associado à Erliquiose (BORIN *et al.*, 2009; CARLOS *et al.*, 2011; SALES *et al.*, 2012). Na fase aguda, os resultados trombocitopênicos, aproximam-se aos valores de referência para espécie canina (180 a $620 \times 10^3 \mu\text{L}$ cel.) e, podem estar acompanhados por anemia normocítica normocrômica, que pode ser aferido pelo hemograma completo e também pode haver presença de poucos

metarrubricitos ou eritrócito imaturos circulantes, mas quase nunca há alterações quanto ao volume de hemoglobina ou na forma das hemácias (CASTRO et al., 2004; ACCETTA 2008; CARLOS et al., 2011).

Durante a fase subclínica, a trombocitopenia é vista como sinal mais marcante, e pode ser resultado diferencial em relação à outras infecções, além disso, em 45% dos casos a contagem está abaixo de 140.000 cel./ μ L., mesmo não acompanhada por anemia e leucopenia (HARRUS et al., 1998b; HARRUS et al., 2001; (ACCETTA 2008; HARRUS et al., 2011).

A trombocitopenia, quase sempre está relacionada à pancitopenia hipoplásica e, também anemia arregenerativa na fase crônica, provocando um quadro mais severo e quase sempre terminal (HARRUS et al., 1997a). Ainda fase crônica, pancitopenia tropical canina, a anemia é arregenerativa, frequentemente verificada por hemácias disformes e velhas e valores alterados em volume de hemoglobina e concentração glomerular de hemácias (ACCETTA 2008; BORIN et al., 2009).

A trombocitopenia em decorrência de erliquiose pode alterar os valores de uréia e ALT, isso ocorre pela diminuição dos reparos feitos por microlesões em capilares hepáticos que provocam micro-hemorragias, necrose ou colestase no fígado de cães (ZAVALA et al., 2007; SANTAREM et al., 2008).

A monocitose é um resultado recorrente na infecção e, por isso, cogita-se a hipótese de que estas bactérias controlem a apoptose de monócitos pela via indireta de ativação de proteases, desencadeadas por células T auxiliares antígenos-específicas (DAVOUST et al., 1999; HARRUS et al., 1999; SANCHEZ et al., 2013).

Alterações em contagens de eosinófilos são verificadas com mais frequência na fase aguda (ACCETTA 2008). A monocitose acomete mais da metade de cães trombocitopenicos e, para alguns autores é significativamente importante durante a pancitopenia tropical canina, já na fase aguda verifica-se hiperplasia megacariocítica (ACCETTA 2008).

Já na fase crônica, a pancitopenia tropical canina, a anemia arregenerativa com hemácias disformes e velhas e, valores alterados em volume de hemoglobina e a concentração glomerular de hemácias são alterações recorrentes (ACCETTA 2008; BORIN et al., 2009).

Os valores encontrados na contagem específica de leucócitos por Accetta (2008) constata que as alterações são frequentes, porém podem variar de acordo com a fase que a enfermidade se encontra, por exemplo, há eosinopenia presente em mais da metade de cães acometidos, assim como anemia que ocorrem em cães trombocitopênicos infectados (ACCETTA 2008; BORIN et al., 2009).

Principalmente em infecções graves, há desvio de neutrófilo para esquerda, resultado do aumento de consumo, além de eosinopenia, em decorrência de glicocorticoide endógeno promovendo o consumo (Borin *et al.*, 2009). A anemia arregenerativa e, regenerativas são verificadas, e tornam-se importantes em situações de coinfeção, ou, na evolução crônica (Harrus *et al.*, 2002).

EXAMES BIOQUÍMICOS

Na mensuração da uréia é possível avaliar o funcionamento hepático e a taxa de filtração glomerular (KERR et al., 2003). Quando aumentados, os valores da ureia indicam quadros de anorexia ou, alteração no comportamento alimentar em decorrência do consumo das reservas e, ou perdas de tecidos corporais ativação metabolismo de nitrogênio nos animais (MEYER et al., 1995; SANTARÉM et al., 2008; KANEKO et al., 2008; HARRUS et al., 2011).

A creatinina é produto do metabolismo proteico, que avalia a função renal, já que a filtração ocorre em taxas constantes e onde não há reabsorção (KANEKO et al., 2008).

Os parâmetros bioquímicos são usados como complemento diagnóstico da Erliquiose, sendo possível avaliar e monitorar o estado clínico do animal, cujas alterações ocorrem frequentemente nas fases crônica e aguda (KANEKO et al., 2008; SANTAREM et al., 2008). Animais com Erliquiose podem apresentar valores médios dentro do padrão em diversos estudo (KANEKO et al., 1997; MYLONAKIS et al., 2004; SANTARÉM et al., 2008).

O aumento concomitante dos valores de ALT e uréia na erliquiose está associado à disfunção na atividade hepática ou à taxa de filtração glomerular (ZAVALA et al., 2007).

Os valores da alanina aminotransferase (ALT) encontram-se aumentados durante a fase aguda, apesar de animais infectados também apresentam valores normais (KANEKO et al., 1997; MYLONAKIS et al., 2004; SANTAREM et al., 2008).

A trombocitopenia em decorrência de erliquiose pode alterar os valores de uréia, isso ocorre pela diminuição dos reparos feitos por microlesões em capilares hepáticos que provocam micro-hemorragias, necrose ou colestase no fígado de cães (ZAVALA et al., 2007; SANTAREM et al., 2008).

SOROLÓGICO

A sorologia é a mais difundida técnica diagnóstica na prática clínica, porém a especificidade produzida pela resposta cruzada dificulta a interpretação dos resultados, principalmente pode ocorrer entre as diferentes espécies de *Ehrlichia sp.* (WANER et al. 2011; AL IZZI et al., 2013).

Na sorologia, a imunofluorescência indireta (RIFI) é o teste considerado padrão ouro para o diagnóstico de Erliquiose por apresentar alta sensibilidade para gênero *Ehrlichia sp.*, muitas vezes são utilizados para estudos epidemiológicos e na contraprova usado para exclusão de animais doadores de sangue (IQBAL et al., 1994; ETTINGER et al., 2004; ACCETTA 2008; HARRUS et al., 2011).

Algumas revisões apontam que as titulações persistentes podem indicar a presença da infecção de riquetsioses, e neste caso deve-se tratar o animal, entretanto a sorologia em si não pode ser usada como único critério para o diagnóstico da infecção, sendo necessárias avaliação do estado físico e alterações hematológicas características, não descartando a aplicação de exames mais específicos (WANER et al. 2011).

A manutenção de *E. canis* em cultura de células de macrófagos permite a produção e cultura isolada destes microrganismos aplicados como controles positivos ou, para sensibilização de placas sorológicas de RIFI (IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 2011). Células pluripotentes de camundongo da linhagem dos macrófagos (J774.A1™) também foram capazes de manter viáveis *E. canis* isoladas em Israel segundo Keysary et al., (2001).

A aquisição de equipamentos, estrutura para execução da técnica de manutenção de células em cultivo e o alto custo podem restringir esta técnica sorológicas à pesquisa (BULLA et al., 2004; ETTINGER et al., 2004; SANTAREM et al., 2008).

Outras técnicas sorológicas comerciais foram sendo desenvolvidas com sensibilidade satisfatória, mas variável, é o caso de SNAP 4Dx, e outros Ensaio imuno - adsorvente ligado a enzima (ELISA), Dot-ELISA, Western immunoblotting, dentre outros (NAKAGHI et al., 2008; HARRUS, 2011; AL IZZI et al., 2013), e que também há reações cruzadas com outros agentes infecciosos, como por exemplo, *Anaplasma spp.*, sendo necessárias confirmação por exames complementares e diferenciais como moleculares (HARRUS et al., 2001; ETTINGER et al., 2004; WANER et al., 2011 AL IZZI et al., 2013).

Mas apesar da boa sensibilidade dos diversos testes sorológicos, os mesmos não permitem a distinção quanto à exposição prévia, e de animais sem infecção ou animais doentes, além da especificidade baixa, que dificulta a interpretação dos resultados (IQBAL et al., 1994; WANER et al., 2011; HARRUS et al., 2011).

PARASITOLÓGICO

A técnica de identificação direta de hemoparasitos em lâminas a partir de sangue periférico foi descrita por Neitz e Thomas (1938), e, permite a observação de inclusões intracitoplasmáticas ao microscópio óptico (MCDADE et al., 1990; CADMAN et al., 1994; DAVOUST et al., 1999; BORIN et al., 2009).

As inclusões intracitoplasmáticas ou mórulas podem ser verificadas principalmente na fase aguda da Eriquiose, ou seja, coincide com o início dos sinais clínicos em cães (MCDADE et al., 1990; DAVOUST et al., 1999; BORIN et al., 2009; SALES et al., 2012).

Essa técnica apresenta como desvantagem baixa sensibilidade estimada em 66%, isso ocorre devido a variação da parasitemia no desenvolvimento da enfermidade sendo indicada, preferencialmente, durante a fase aguda (CADMAN et al., 1994; BORIN et al., 2009; DUARTE et al., 2013).

MOLECULAR

A técnica molecular (PCR) é um método aplicado como ferramenta epidemiológica, pela sensibilidade, pode ser aplicada na identificação de similaridade, isso porque as sequencias depositadas são comparáveis a partir de programação computacional, o BLAST, definindo a espécie envolvida na infecção (FONSECA et al., 2013). Podem auxiliar no diagnóstico precoce de infecções (STICH et al., 2002) e, com isso, aplicar um tratamento adequado, tornando o prognóstico favorável com chances de recuperação sem sequelas (DAGNONE et al., 2003; ETTINGER et al., 2004).

Diversos *primers* específicos para *Ehrlichia canis* já foram testados e comparados entre si (IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 2011). A maior sensibilidade na identificação taxonômica da espécie *Ehrlichia canis* ocorreu por meio de nPCR (Nested PCR) (IQBAL et al., 1994; BULLA et al., 2004; HARRUS et al., 1997a)

Apesar disso, esse método pode apresentar erros durante a sua execução e, produzindo resultados falsos negativos, como quando há baixa quantidade de DNA do parasito na amostra, impossibilitando a amplificação do fragmento (IQBAL et al., 1994; BULLA et al., 2004).

O *gene 16S rRNA* é frequentemente utilizado para identificação do gênero *Ehrlichia* spp. (IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 1997b; BULLA et al., 2004; FONSECA et al., 2013), e, em relação aos demais e, permite a classificação precisa de taxonomia por auxílios, deste *gene 16SrRNA*, que está relacionado à enzima citrato sintetase (*gltA*), de baixa variação mutagênica pois o produto do Nested-PCR diferem quanto ao peso molecular dos demais (STICH et al., 2002; MYLONAKIS et al., 2003; DUMLER, et al., 2001; HARRUS et al., 2011; DUARTE et al., 2013).

O *primer* direto *ECC* (5'AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC3') e o *primer* reverso *ECB* (5'CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA3'), são responsáveis pela amplificação do fragmento do *gene 16S rRNA*, que produzem um *amplicon* com 478bp, associada à enzima citrato sintetase (*gltA*), de baixa variação mutagênica e permite identificar o gênero *Ehrlichia* sp. (DAWSON et al., 1994; MURPHY et al 1998; DUMLER, et al., 2001; DUARTE et al., 2013). O *primer* direto *ECAN5* (5'CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA3') descrito por

Anderson et al., (1992), e o *primer* reverso *HE3* (5'TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT3') por Murphy et al., (1998), produzem um *amplicon* com 389pb e permite identificar *Ehrlichia canis* (BULLA et al., 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL

O município de Ilhéus está localizado sob a latitude 14°47'S. e longitude 39°02'W, distribuído em 1.760 Km², na microrregião de Ilhéus-Itabuna, na Costa do Cacau, representante típico de bioma Mata Atlântica, com temperatura média anual de 28°C e pluviosidade média anual de 1500 a 2000mm. Tem uma população de cães de, aproximadamente, 20.000 animais, estimados a partir da população humana de 184.616 habitantes, conforme IBGE, 2012.

ANIMAIS

Foram coletadas amostras entre os meses de março a agosto de 2013, no total de 558 cães distribuídos por 12 bairros do município na Figura 2. É apresentada a distribuição dos pontos de coleta no município de Ilhéus. Para o cálculo da amostras levou-se em consideração o número estimado de cães no município (20.000), prevalência esperada definida em 30% para *Ehrlichia sp.* a partir de resultados de soroprevalência (CARLOS *et al.*, 2005), confiabilidade de 95% e 5% de erro, resultando em número amostral de 320 cães, por meio do programa Epi Info 2002.

Tabela 1. Número de cães amostrados em bairros no município de Ilhéus, Bahia.

BAIRROS	SIGLA	Nº.	ANIMAIS SELECIONADOS POR BAIRRO
TEOTÔNIO VILELA	B1	50	26
OLIVENÇA	B2	24	18
Nª SENHORA DA VITÓRIA	B3	61	38
SALOBRIHO	B4	53	32
HERNANI SÁ	B5	62	37

BANCO VITÓRIA	DA	B6	38	26
MALHADO BARRA		B7	54	22
ALTO CONQUISTA	DA	B8	21	10
		B9	43	23
IGUAPE		B10	55	25
PONTAL		B11	43	15
NELSON COSTA		B12	54	32
TOTAL			558	304

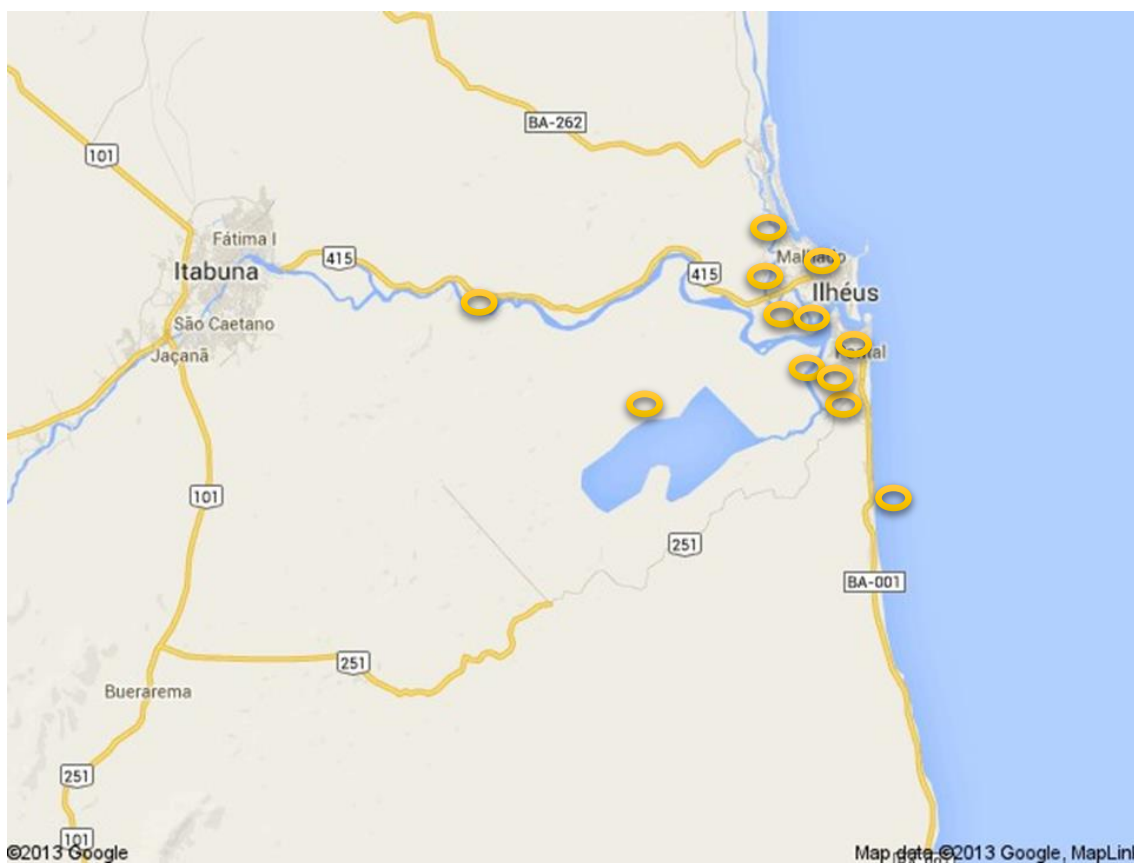


Figura 2. Distribuição dos bairros no município de Ilhéus, Bahia, onde foram coletadas amostras de sangue dos cães. Fonte: GoogleMaps.

COLETA

Foi aplicado um questionário aos proprietários dos cães para obter informações sobre os fatores de risco, o modelo encontra-se no Apêndice I. Os

cães passaram por avaliação clínica e contidos procedeu-se a coleta de 5 a 10 mL de sangue, através das veias cefálica ou jugular. O sangue foi acondicionado em tubos com e sem anticoagulante (EDTA®) e mantidos em caixas isotérmicas com gelo até o processamento. Também foram coletadas amostras de sangue de capilar periférico de ponta de orelha segundo Neitz e Thomas (1938), para observação parasitológica direta em lâmina corada por kit Panótico™, (BORIN et al., 2009).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê que regulamenta o uso de animais em pesquisa da UESC, n. 018/12 em 24/07/2012.

ANALISE HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA

O hemograma foi realizado no sangue com anticoagulante (EDTA®) contendo 5mL, a contagem automática foi realizada pelo equipamento ABCVet – Animal Blood Counter (HORIBA®), e, kit Pack ABXVet (HORIBA®), segundo orientações do fabricante.

A contagem específica de leucócitos, além da automática, foi realizada manual em lâmina de vidro coradas com kit Panótico Rápido® ao microscópio óptico (Primo Star - Zeiss®) em objetivo de 40x.

Para a mensuração protéica utilizou-se o método do refratômetro descrito por Jain (1986).

Os parâmetros de normalidade hematológicas foram consideradas segundo Weiss et al., (2000), como segue na Tabela 2. Para a contagem de plaquetas foi adotado a normalidade entre 160 cel./10³µL e 500cel./10³µL. A trombocitopenia foi atribuída à contagem como parâmetro do equipamento ABCVet – Animal Blood Counter (HORIBA®).

Tabela 2. Hematologia canina referência de normalidade

Eritrograma	Weiss et al., (2000)
	Eritrócitos (x10 ⁶ /µL)
Hemoglobina (g/dL)	12,0 – 18,0

Hematócrito (%)	37 – 55
<hr/>	
CMH (pg)	
<hr/>	
CMHC(g/dL)	
<hr/>	
Leucograma	
<hr/>	
Leucócitos Totais (mm ³)	6.000 – 17.000
Neutrófilos (μL/%)	3.000 – 11.500/60 - 77
Linfócitos (μL/%)	1.000 – 4.800/12 – 30)
Eosinófilos (μL/%)	150 – 1.250/2 – 10
Monócitos (μL/%)	150 – 1.350/3 – 10
Plaquetas (X10 ³ μL)	200 – 500
<hr/>	

O sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 1300g, por 10 minutos e, forneceu o soro utilizados nas análise bioquímicas. Foram analisadas as enzimas séricas Alanina aminotransferase (ALT)(*kit* LabTest Transaminase Pirúvica™), a uréia (*kit* Uréia UV™ LabTest), e a creatinina (*kit* Creatinina™ LabTest), realizada seguindo recomendações do fabricante, no equipamento Bio 2000 (Bioplus®). Os parâmetros de normalidade bioquímicos para espécie canina foram considerados segundo sugerido por Kaneko *et al.*, (1997), Uréia (20-60mg/dL), Creatinina (0,5-1,5mg/dL), ALT(20-100UI/L)

SELEÇÃO DOS CÃES PARA PCR

A partir dos dados obtidos no hemograma e na avaliação clínica dos animais foram identificados 304 cães que apresentaram alterações sugestivas para a infecção por *Ehrlichia* sp. Esses cães, suspeitos, foram inclusos nas análises parasitológica e molecular.

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Foi realizada a leitura em estiraço de sangue periférico em busca das inclusões intracitoplasmáticas características de erliquiose e possível de verificação em lâmina de vidro coradas com kit Panótico Rápido®, conforme orientação do fabricante e analisadas em microscópio óptico (Primo Star - Zeiss®) em objetivo de 100x.

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As extrações do DNA total do sangue foram realizadas em todas as amostras de sangue dos cães selecionados com suspeita de infecção por *Ehrlichia* sp.

As amostras foram centrifugadas a 1300g por 10 minutos para obtenção da papa de leucócitos. O material foi transferido para microtubos estéreis. O procedimento foi repetido para aumentar eficácia da técnica obtendo mais células.

As amostras foram lisadas com tampão de extração (Tris 20 mM, EDTA 50 mM, 5µg/mL de proteinase K e SDS 1%) mantidas a 60°C por 80 minutos. Para recuperação do DNA foi utilizado fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 (Invitrogen®), centrifugadas a 16.000g por 10 minutos. O DNA foi precipitado com etanol 100% e Acetato de amônio 5M, eluído com água ultra pura e mantido a -20°C.

O DNA de cada amostra foi quantificado em NanoDrop2000 (ThermoScientific®) para determinar as concentrações obtidas na extração e padronização da reação de PCR.

Para a extração de DNA de carrapatos foi acrescentado ao protocolo, descrito anteriormente, apenas um choque térmico nas amostras dos carrapatos.

Estes carrapatos foram colocados em tubos tipo *eppendorf*® e, permaneceram durante 30 minutos no freezer na temperatura de 80°C negativos, em seguida, foram introduzidos em recipiente contendo água a

100°C, durante 5 minutos e, posteriormente, macerados com auxílio de bastão de vidro.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para detecção de *Ehrlichia* sp. foram utilizados os *primers* *ECC* e *ECB* (DAWSON et al., 1994;1996), que amplificam um fragmento de 478pb do *gene* *16S rRNA*. As reações foram padronizadas para o volume de 25µL, sendo 3,0µL de DNA [100ng] genômico, *primers* *ECC* e *ECB* [0,4mM], dNTP [0,2mM], MgCl₂ [3,0mM], tampão da TaqPCR™ [10mM] e 2,5 U *Taq DNA Polymerase*™ (Invitrogen®). Ao volume final foi acrescentado água ultrapura tamponada (Invitrogen®).

O programa para o termociclador foi utilizado considerou uma desnaturação inicial de 3 min. a 94°C; em seguida 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min. seguido de anelamento a 68°C por 1 min. e 30 s., e, extensão a 72°C por 1 min. e 30 s., e, um passo final a 72°C, durante 5 min.

NESTED-PCR

Para detecção de fragmentos de região conservada e específicos da espécie *Ehrlichia canis* foram utilizados os *primers* *HE3* e *ECAN5* (ANDERSON et al., 1992; MURPHY et al., 1998) cujo *amplicon* apresenta aproximadamente 389pb.

As reações foram estabilizadas para o volume de 25µL, sendo 100ng do produto da primeira PCR, 10pmol de cada *primers*, dNTP [0,2mM], MgCl₂ [2,5mM], 1x tampão da TaqPCR™ [10mM] e 1,25 U *Taq DNA Polymerase*™ (Invitrogen®), e 8,25µL de água ultrapura tamponada (Invitrogen®). A temperatura dos *primers* durante a desnaturação foi de 94°C por 1 min., seguida 35 ciclos de anelamento a 58°C por 2 min. a e extensão a 72°C por 1 min. e 30 s., e, um último passo de 5 min. para extensão final a 72°C.

Foi utilizado água ultrapura™ (Invitrogen®) como controle negativo, e DNA de *E. canis* obtido de animal parasitado e confirmado por sequenciamento como controle positivo.

Os produtos obtidos da PCR passaram por eletroforese em cuba horizontal em gel de agarose ultrapura™ (Invitrogen®) [1,5%], diluído em TAE™ (Invitrogen®) [20%] e, corados com Brometo de Etídio [2%] e, foram revelados em fotodocumentador.

SEQUENCIAMENTO DE DNA

Foram selecionadas, aproximadamente, seis amostras de animais positivos para *E. canis*, com e sem sintomas clínicos para sequenciamento e verificação da diversidade genética.

O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Como controle negativo foi utilizado apenas água ultrapura™ (Invitrogen®).

Os DNAs-molde [45 ng] foram marcados utilizando-se os respectivos *primers* ECAN5 [3,2 pmol] e HE3 [3,2 pmol] e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em 10 µL de volume final. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos seguido de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. O programa *BLAST* ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) foi usado para comparação e análise das seqüências obtidas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram avaliados os dados da inspeção física, e fatores de risco referentes à enfermidade, o histórico do animal, junto aos resultados hematológicos. Foram calculadas frequências, médias e desvios padrão dos parâmetros principais, através de planilha do Epi Info 2002.

MULTIVARIADA

A análise multivariada das 304 amostras selecionadas quanto aos fatores de risco e fatores associados a doença nos animais como: presença de anemia, alterações plaquetárias e bioquímicas utilizando o teste de Qui-quadrado e exato de Fisher com nível de significância de 5% no programa EpiInfo 7.0. Também foi utilizada a regressão logística para as variáveis com $p \leq 0,2$, também no programa Epiinfor 7.0(CDC) e um valor de $p < 0.05$ foram considerados significativo. A análise quantitativa dos dados foi realizada para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, como $p \leq 0,05$ no programa SAS.

RESULTADOS

Neste estudo foram coletadas amostras de 558 cães em 12 bairros do município de Ilhéus, Bahia. Foram selecionadas 304 amostras para investigação molecular e parasitológica de animais que apresentaram alterações na avaliação clínica (67 cães) e, alterações hematológicas, como anemia (88 cães) e trombocitopenia (239 cães), todas estas alterações sugestivas para infecção por *Ehrlichia* sp. Alguns cães tinham mais de uma alteração.

Considerando os dados dos exames hematológicos (hematimetria, plaquetometria e leucometria), o principal critério de inclusão dos animais na investigação molecular e parasitológica foram as alterações em plaquetas, sendo incluídos animais trombocitopênicos que apresentaram contagem de plaqueta $< 160 \text{ cel./ mm}^3$ (valor sugerido pelo fabricante HORIBA®, como sendo de normalidade para a espécie) (Tabela 1).

SINAIS CLÍNICOS

Sessenta e sete cães apresentaram sinais clínicos sugestivo de erliquiose, desses, 61 (91,65%) foram positivos na análise molecular e 20 (29,85%) positivos para *Ehrlichia* sp. no exame de sangue periférico.

Após investigação molecular, as maiores frequências e sinais associados à erliquiose foram perda de peso, palidez em mucosa, e eritema (Figura 1 e 2). Um cão positivo foi observado com epistaxe.

Tabela 3. Valores médios da avaliação hematológica e bioquímicos dos 558 cães do município de Ilhéus.

Variáveis	Amostragem (n = 558)			Selecionados (n = 304)			Não Selecionados (n = 254)			p-value*
	Média	Desvio padrão	Variação (Min-Max)	Média	Desvio padrão	Variação (Min-Max)	Média	Desvio padrão	Variação (Min-Max)	
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	5,9527	1,24624	1,63 - 8,6	5,4586	1,331	1,63 – 8,6	6,544	0,801	4,1 – 8,53	<0,0001
Hematócrito (%)	40,381	22,65	11,2 – 60	36,637	9,46	11,2 – 59,6	44,86	5,699	27,8 - 60	<0,0001
Hemoglobina (g/dL)	13,90	4,77	3,6 - 101	12,518	3,19	3,6 – 20,8	15,19	1,976	9,3 – 21,1	<0,0001
Leucócitos (cel./ mm ³)	12339	5565,72	1400 – 37000	12361,51	5439,9	1400 – 37000	12312,27	4422,87	5016 - 28600	0.9080
Neutrófilos (cel./ mm ³)	8813,9	3946,56	1260 -31820	8781,97	4403,35	1260 - 31820	8851,5,	3319,87	2128 – 22932	0.8367
Linfócitos (cel./ mm ³)	2342,22	9935,57	102 – 10370	2466,35	1678,02	102 - 10370	2196,10	1334,16	228 - 9250	0.0392
Monócitos (cel./ mm ³)	402,48	381,16	0 – 2686	446,55	407,40	0 – 2376	350,60	340,51	0 – 2686	0.0039
Eosinófilos (cel./ mm ³)	819,55	1191,88	0 - 10830	731,73	946,32	0 – 7032	922,93	1418,91	0 – 10830	0.0601
Plaquetas (cel./ mm ³)	210,23	132,93	21 - 862	148,654	126,68	21 – 862	283,93	98,213	111 - 700	<0,0001
Proteína (g/ dL)	8,03	1,07	5,8 - 12,6	8,258	1,185	5,8 – 12,6	7,75	0,842	5,8 – 11	<0,0001
ALT (U/L)	47,49	33,49	10 - 268	42,41	30,48	10 – 260	53,61	35,78	17 – 268	<0,0001
Creatinina (mg/ dL)	0,983	0,324	0 - 2,7	1	0,30	0 – 2,4	0,963	0,346	0 – 2,7	0.1906
Ureia (mg/ dL)	38,20	22,22	10 - 267	37,58	25,388	10 – 267	38,95	17,60	12 - 152	0.4819

*Estatística realizada entre os grupos selecionando e não selecionados.

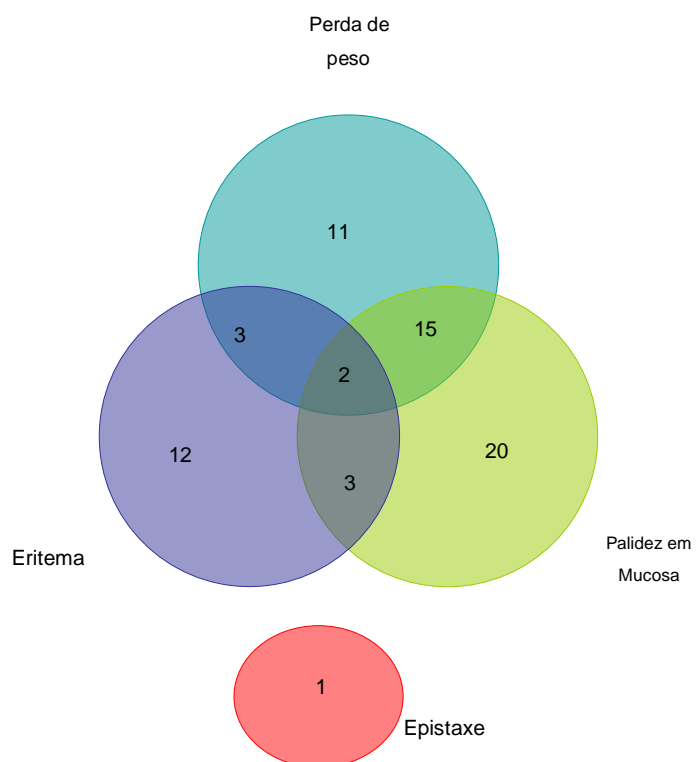


Figura 3. Animais que apresentaram sinais clínicos sugestivos para ehrlichiose durante a coleta das amostras no município de Ilhéus.

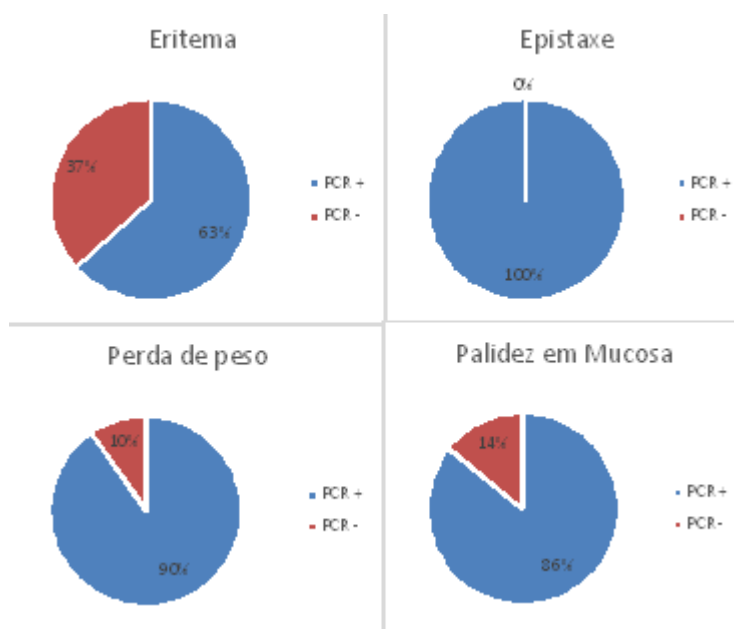


Figura 4. Frequência relativa dos principais achados clínicos em cães selecionados para os diagnósticos molecular e parasitológico para Ehrlichia sp.

HEMOGRAMA

Considerou-se como valores bioquímicos de normalidade para a espécie canina os sugeridos por Weiss et al., (2000), exceto a contagem de plaquetas (160 – 500cel./10³µL), utilizando os valores do contador automático.

Os resultados da Tabela 2 apresentam os dados hematológicos dos animais que foram triados e que passaram pela investigação de *Ehrlichia* sp. Foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de hematócrito, hemoglobina e contagem de plaquetas. Indicando que os animais infectados por *Ehrlichia* sp., tinham mais anemia e trombocitopenia que os animais negativos. A média da contagem de plaquetas e o hematócrito dos animais positivos estavam abaixo dos valores normais para a espécie.

BIOQUÍMICO

Considerou-se como valores bioquímicos de normalidade para a espécie canina os sugeridos por Kaneko, et al., (1997).

Foi verificado alteração significativa nos valores de Alanina Aminotransferase (ALT) e Uréia quando comparou-se cães positivos e negativos, porém todos os parâmetros bioquímicos mantiveram-se dentro das taxas de normalidade para a espécie canina (Tabela 3).

Foram verificados valores de Ureia alterados em 59 amostras e destas 46 (77,9%) amostras foram positivas na investigação molecular para *Ehrlichia* sp. Os valores da ALT estavam alterados em 43 amostras e destas 35 foram positivas para *E. canis*. Os valores de creatinina estavam superiores alterados em 23 amostras sendo positivas em 18 para *E. canis*..

Tabela 4. Valores médios e desvios-padrão (dp) dos exames hematológicos de 304 cães positivos e negativos para Ehrlichia sp. no município de Ilhéus, Bahia.

Variáveis	PCR +		PCR -		p-value
	Média	dp	Média	dp	
Hemácias (10⁶/mm³)	5,39	1,33	5,83	1,213	0.0422
Hematócrito (%)	36,04	9,33	40,14	9,62	0.0078
Hemoglobina (g/dL)	12,31	3,14	13,72	3,22	0.0067
Leucócitos (mm³)	12268,46	5450,43	12911,36	5344,335	0.4701
Neutrófilo (mm³)	8633,60	4513,60	9641,84	3583,20	0.1618
Linfócitos (mm³)	2490,27	1692,66	2327,70	1583,46	0.5544
Monócitos (mm³)	449,82	422,09	411,70	300,25	0.5674
Eosinófilos (mm³)	720,76	902,21	795,31	1168,58	0.6308
Plaquetas (mm³)	147,51	127,59	155,38	120,91	0.7042
Proteína (g/dL)	8,28	1,19	8,09	1,09	0.3253

Tabela 5. Valores médios e desvios-padrão (dp) dos exames hematológicos de 304 cães positivos e negativos para *Ehrlichia* sp. no município de Ilhéus, Bahia.

Bioquímica	PCR +		PCR -		p-value
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
ALT (UI/L)	38,97	24,26	56,63	51,77	0.0008
Creatinina (mg/dL)	0,998	0,296	1,011	0,331	0.7878
Uréia (mg/dL)	36,54	22,20	43,53	38,27	0.0964

DIAGNÓSTICO MOLECULAR E PARASITOLÓGICO

Considerando-se os 304 cães selecionados, 85,53% (260/304) foram positivos para *Ehrlichia* sp. e, para a espécie *Ehrlichia canis* foram verificados 78,28% (238/304) de amostras positivas pelo *Nested-PCR* (Figura 5).

Após a análise das lâminas de esfregaço sanguíneo foram identificados 84 cães (27,63%) positivos (Figura 6). Os resultados parasitológicos também sugerem presença de *Anaplasma* sp. em 3 amostras (0,98%) e, em 7 amostras (2,30%) foram encontrados merozoítas de *Babesia* sp.

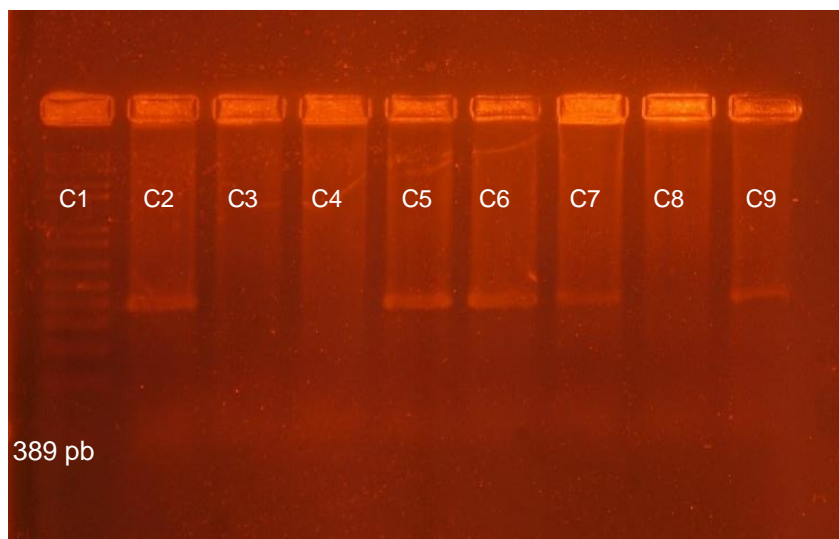


Figura 5. Detecção de DNA de *Ehrlichia canis* em sangue de cães. C1 =Marcado molecular de peso molecular [1Kb] (invitrogen®) DNA, C2= controle positivo, C3= controle negativo, C4 e C8 = amostra negativa, C5 a C7e C9 = amostra positiva.

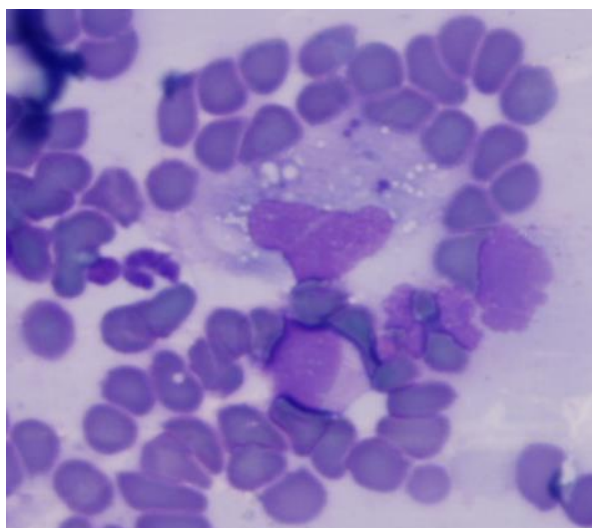


Figura 6: Visualização de Mórulas de *Ehrlichia canis* em Monócitos e Vacúolos em citologia de ponta de orelha em cães. Coloração com Panótico Rápido. Fonte: Arquivo Pessoal.

ANÁLISE MOLECULAR DOS CARRAPATOS

Do total de 65 amostras de carrapatos coletados e que passaram pela investigação molecular (PCR), apenas oito (12,3%) amostras foram positivas para *Ehrlichia canis*, e deste total três eram provenientes de animais negativos na PCR.

FATORES DE RISCO

Na análise dos fatores de risco associados à erliquiose nos animais estudados verificou-se que a variável sexo foi significativa, onde as fêmeas eram mais susceptíveis a infecção que os machos (Tabela 4).

Tabela 6. Análise dos fatores de risco associado com a presença de Ehrlichia sp. em 304 cães selecionados no município de Ilhéus, Bahia.

Variável	OR	CI 95%	p-value
Acesso à rua			
Sim	1,4373	0,6964 - 2,9667	0,3265
Não			
Sexo			
Feminino	<u>0,4694</u>	<u>0,2294 - 0,9606</u>	<u>0,0385</u>
Masculino			

DISCUSSÕES

O critério da seleção de cães para a investigação molecular e parasitológica foram baseados em animais trombocitopênicos, anêmicos, com epistaxe, apatia e emagrecimentos que segundo Bulla et al., (2004), Shipov et al., (2008) e Carlos et al. (2011), são alterações comuns a animais infectados por *Ehrlichia* sp.

Estes critérios clínicos e hematológicos de triagem revelaram-se eficientes e a investigação molecular detectou presença de DNA de *Ehrlichia* sp. (478bp) em 85,53% (260/304) e, para a espécie *Ehrlichia canis* (389bp) foram verificados em 78,28% (238/304).

Animais apenas com alterações hematológicas e sem alterações clínicas, nem visualização da bactéria em lâmina, ou seja, que se encontravam em fase subclínica de *Ehrlichia* sp., corresponderam à maioria dos animais infectados (199/260 – 76,5%), assim como identificados em estudos anteriores por Almosny et al., (2002); Bulla et al., (2004).

Estudos anteriores na mesma região (Carlos et al. 2007, Carvalho et al. 2008 e Carlos et al. 2011) apresentaram positividade bem inferiores, isso se justifica pela população escolhida, que no presente foi de animais suspeitos de ehrlichiose e os estudos anteriores foi uma população geral de cães. Neste estudo fez-se o uso de kits comerciais de extração de DNA e em capa leucocitária, o que aumenta a chance de se encontrar a bactéria (Iqbal et al., 1994).

Os animais que apresentaram alterações hematológicas tiveram como principais parâmetros alterados a anemia normocítica normocrômica e a trombocitopenia, assim como identificados por Almosny et al., (2002) e Carlos et al., (2011).

Outros trabalhos também verificaram que a pesquisa de *Ehrlichia* sp. é significativa em animais de áreas endêmicas e os parâmetros de trombocitopenia e anemia podem ser utilizados como indicativo da infecção, apesar da trombocitopenia ser significativa nas regiões sul e sudeste no Brasil, por Dagnone et al., (2003) e Bulla et al., (2004).

The hematological abnormalities identified in the present study (thrombocytopenia and anemia) were similar to those previously described by Rodriguez-Vivas et al. (2005), Borin et al. (2009) and M'Ghirbi et al. (2009). The effects of the mononuclear phagocytic system, cell lysis mediated by the complement system and suppression of erythropoiesis at the bone marrow may be the mechanisms responsible for the anemia relating to the disease (MOREIRA et al., 2003). *Ehrlichia canis* induces thrombocytopenia through destruction and consumption of platelets, increased hepatic or splenic platelets sequestration, decreased platelet production due to bone marrow hypoplasia (WOODY; HOSKINS, 1991) and production of antiplatelet antibodies (GAUNT et al., 2010).

Os resultados médios dos exames bioquímicos entre cães infectados por *Ehrlichia sp.* ficaram dentro da normalidade, semelhante aos relatados por Santarém, et al, (2008). Constatou-se aumento das proteínas sérica totais pelo refratrômetro, assim com verificado por Harrus et al.,(2002). Embora dentro da normalidade, os cães positivos tiveram diferenças significativas tanto nos resultados bioquímicos de ALT e Ureia quanto na concentração de proteínas séricas totais em relação aos não infectados assim como verificados por Zavala et al., (2007). Esses resultados podem ser justificados pelos mecanismos patogênicos, desencadeado pela trombocitopenia, bem como pela hiperglobulinemia que sugerem dano hepático e renal, interferindo na taxa de filtração glomerular e da pressão osmótica e microlesões em capilares hepático e renais de diversas intensidades (Harrus et al., 2002; Zavala et al., 2007; Santarém, et al, 2008).

Foi verificado parasitismo de *R. sanguineus* em do número pequeno de cães (41/304) no momento da coleta, porém vários outros cães tiveram históricos de carrapatos relatados pelos proprietários e, 70,72% dos cães fizeram uso de algum controle carrapaticida, o que mostra que a grande maioria dos cães tiveram o parasito em algum momento de sua vida. Sabe-se que *Ehrlichia* pode ficar no cão por um período de tempo longo (DANTAS-TORRES et al., 2006), o que também pode confirmar a cronicidade da infecção nestes cães.

Outro dado que deve ser considerado é que não houve diferença entre os bairros, mostrando casuística estável e revelando as mesmas condições climáticas e ambientais favorecendo a presença de carrapatos e a infecção dos cães. Também foi verificado resultado significativo para cães que habitavam área periféricas no estudo realizado por Carlos *et al.* (2011), e é provável que haja relação com o ambiente aberto ou manejo destes cães permitindo maior proximidade com o carrapato vetor e a infecção.

Para os fatores de risco analisados apenas sexo foi significativo, onde as fêmeas foram mais positivas, semelhante a Borin *et al.*, (2009) e Moreira *et al.* (2003), que atribuíram ao fato da maioria dos animais atendidos e investigados para a infecção corresponderem ao gênero feminino, o que inclui animais em fase aguda e, portanto a significância. Neste estudo, as fêmeas também corresponderam à infecção, o dado pode ter sido associado ao ponto de corte utilizado nos animais triados, isso pode significar que os machos acometidos com as alterações inespecíficas podem estar acometidos com outras enfermidades que não a infecção por *Ehrlichia* sp. Outra hipótese é quanto ao menor controle carrapaticida curativo nas fêmeas, o que pode indicar maior infestação, principalmente por estádios imaturos. Como quase sempre são imperceptíveis, os estádios imaturos também são responsáveis pela infestação, mas quase sempre é o estágio adulto, com a visualização de fêmeas ingurgitadas que estão mais relacionados com início do tratamento à infestação por proprietários não experientes em relação às doenças veiculadas por carrapatos, e este é um ponto que merece destaque para esta enfermidade.

CONCLUSÃO

Ehrlichia canis encontra-se presente na população canina estudada do município de Ilhéus, Bahia, Brasil. A Nested-PCR foi o método mais sensível, entre os testados, para a determinação da presença de *E. canis* em amostras de sangue de cães naturalmente infectados. O exame parasitológico direto (esfregaço em lâmina) é o método de menor eficiência para a detecção do parasita, mas eficiente na fase aguda da infecção.

A trombocitopenia mostrou-se como o parâmetro estatisticamente significativo e portanto de eleição, usado como teste diferencial no diagnóstico de erliquiose em cães naturalmente infectados. Os parâmetros bioquímicos (ALT, uréia e creatinina) diferiram entre cães positivos e negativos pra *E. canis*, mas permanecem dentro do parâmetro de normalidade para espécie.

Fêmeas diferem de machos em relação à detecção de infecção por *Ehrlichia* sp., o que pode estar associado ao menor controle carrapaticida nestas, ou mesmo que os parâmetros de triagem utilizados detectam machos acometidos por diferentes causas do foco deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCETTA, E. M. T., BOTELHO, G. G. ***Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) Trombocitopênicos da Região dos Lagos do Rio de Janeiro. (Dissertação), 2008.**

AGUIAR, D. M. SAITO, T. B., HAGIWARA., M. K , MACHADO, R.S., LABRUNA , M. B. Diagnóstico sorológico para erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural santa Maria**, v. 37, p. 798 – 802, 2007.

ALBERNAZ, A. P., MIRANDA, F. J. B., MELO JR, O. A., MACHADO, J. A. FAJARDO, H. V. Erliquiose Canina em Campos dos Goitacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.4, p. 799 – 806, 2007.

ALMOSNY, N. R. P. MASSARD, C.L. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses.**1ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, p.14-135, 2002.

AL IZZI, S.; MARTIN, D. S.; CHAN, R. Y.; LEUTENEGGER, C. M. “Babesia canis vogeli, Ehrlichia canis, and Anaplasma platys infection in a dog,” **Veterinary Clinical Pathology**, vol. 42, n. 4, p. 471–475, 2013.

ANDERSON, B.E., SUMNER, J.W., DAWSON, J.E., TZIANABOS, T., GREENE, C.R., OLSON, J.G., FISHBEIN, D.B., OLSEN RASMUSSEN, M., HOLLOWAY, B.P., GEORGE, E.H., AZAD, A.F. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, p. 775-780, 1992.

BEER, J. Doenças Infecciosas em Animais Domésticos, Segunda Edição ed., vol. 1, São Paulo, São Paulo: ROCA, 1988, pp. 418-420.

BIRCHARD, S. J. ; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais.** 1. ed. São Paulo, Roca. p. 139-142, 1998.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos de hematológicos e 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.

BULLA, C., KIOMI TAKAHIRA, R., PESSOA ARAUJO JR., J., APARECIDA TRINCA, L., SOUZA LOPES, R., WIEDMEYER, C.E., 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research** v. 35, p. 141–146, 2004.

BUHLES JR., W.C., HUXSOLL, D.L., RISTIC, M. Tropical Canine Thrombocytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to

Ehrlichia canis infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **Journal of Infectious Diseases**. v.130, p. 357–367, 1974.

BUHLES JR., W.C., HUXSOLL, D.L., HILDEBRANDT, P.K. Tropical Canine Pancitopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. **Journal of Comparative Pathology**. v.85, p. 511–521, 1975.

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 detectind antibodies to *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Record**, v. 135, p. 362, 1994.

CASTRO, M. B., MACHADO, R. Z., AQUINO, L. P. C. T. ALESSI, A. C., COSTA, M. T. Experimental Acute Canine Monocytic Ehrlichiosis: Clinicopathological and Immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, p.73 – 86, 2004.

CARLOS, R. S. A.; CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; ALMOSNY, N. R. P.; ALBUQUERQUE, G. R. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 210-214, 2011.

CARVALHO, F. S., Wenceslau, A. A. Carlos, R. S. A. e Albuquerque, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 657-662, 2008.

COSTA, J. O. .; BATISTA JÚNIOR, J. A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, P. M. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte - Brazil. **Arquivos Escola de Veterinária UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.

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

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 64- 67, 2006.

DAVOUST, B.; MICKAEL, B., PARZY, D. Apport du laboratoire au diagnostic de l'ehrlichiose monocyttaire canine **Revue Francaise des Laboratoires**, v. 310, p. 25-32, 1999.

DAWSON, J.E., STALLKNECHT, D.E., HOWERTH, E.W., WARNER, C., BIGGIE, K., DAVIDSON, W.R., LOCKHART, J.M., NETTLES, V.F., OLSOM, J.G., CHILDS, J.E Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**.v. 32, p. 2725-2728, 1994.

DAWSON, J.E., BIGGIE, K.L., WARNER, C.K., COOKSON, K., JENKINS, S., LEVINE, J.F., OLSON, J.G. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human disease, in dogs from southeast Virginia. **American Journal of Veterinary Research**. v. 57, p. 1175-1179, 1996.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 64- 67, 2006.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. "Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien," **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**. v. 28, p. 418-419, 1935.

DUARTE, S. C.; PARENTE, J. A. LINHARES, G. F. C. "DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE Ehrlichia canis EM CÃES DE GOIÂNIA, BRASIL," **Rev. Patol. Trop.**, vol. 42, n. 1, p. 30-41, 2013.

DUNN, J. K. **Tratado de medicina de pequenos animais** – São Paulo: Roca, p. 947 – 948. 2001.

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

ETTINGER, S. J. FELDMAN, E. C. **Tratado De Medicina Interna Veterinária Doenças do Cão e do Gato**. Guanabara Koogan Livro v. I e II, 2004

FONSECA, J.P., HIRSCH, C. e GUIMARÃES, A.M. Erliquiose monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. **PUBVET** , Londrina, V. 7, N. 8, Ed. 231, Art. 1529, Abril, 2013.

GAUNT, S. D. et al. Experimental infection and co-infection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 33, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-33>

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

HARRUS, S., WANER, T., BARK, H. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 198, n. 4. p. 431-444, 1997. b.

HARRUS, S., OFRI, R., AIZENBERG, I., WANER, T. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Parasitology**. v. 78, p. 155-160, 1998. a.

HARRUS, S., WANER, T., AIZENBERG, I., FOLEY, J.E., POLAND, A.M., BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, p. 73–76, 1998. B

S. HARRUS, R. OFRIA, I. AIZENBERGA E T. WANER, “Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by Ehrlichia canis infection,” **Veterinary Parasitology**, vol. 78, pp. 155-160, 1998a.

S. HARRUS, T. WANER, I. AIZENBERG E H. BARK, “Therapeutic Effect of Doxycycline in Experimental Subclinical Canine Monocytic Ehrlichiosis: Evaluation of a 6-Week Course,” **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 36, n. 7, p. 2140–2142, 1998b.

HARRUS, S., WANER, T., BARK, H., JONGEJAN, F., CORNELISSEN, A.W.C.A. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 2745–2749, 1999.

HARRUS S.; WANER, T Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**. v. 187, p. 292–296. 2011.

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

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

JAIN, N.C. (Ed.), 1986. **Hematologic techniques**. In: Schalm’s Veterinary Hematology, Lea & Ferbigger, Philadelphia, pp. 20–86.

KERR, M. G. “Hematologia e Bioquímica clínica,” em Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária - Bioquímica clínica e Hematologia, Segunda edição ed., São Paulo, Roca, **LIVRO**, pp. 01-94, 2003.

KATAOKA, A., SANTANA, A. E., SEKI, M. C. ALTERAÇÕES DO PROTEINOGRAMA SÉRICO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR

Ehrlichia canis. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, Vol. 22, nº2, 098-102, 2006.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic Animals**, 6.ed. San Diego: Academic Press, p.780 – 916, 2008.

KAKOMA, I.; HANSEN, R.D.; ANDERSON, B.E.; HANLEY, T.A.; SIMS, K.G.; LIU, L.; BELLAMY, C.; LONG, M.T.; BAEK, B.K. Cultural, molecular, and immunological characterization of etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 170-175, 1994.

KOMNENOU, A.A., MYLONAKIS, M.E., KOUTI, V., TENDOMA, L., LEONTIDES, L., SKOUNTZOU, E., DESSIRIS, A., KOUTINAS, A.F., OFRI, R. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. **Veterinary Ophthalmology**. v. 10, p. 137–142, 2007.

McDADE, J.E. Ehrlichiosis – a disease of Animals and Humans. **Journal of Infectious Disease**, v.161, p.609-617, 1990.

MENESES, I. D. S. S. SILVA, B. M. P., TEIXEIRA, C. M. M., GUIMARÃES, J. E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v.9, n.4, p. 770-776, 2008.

MEYER, D. J; COLES, E. H; RICH, L. J. **Medicina de Laboratório Veterinária – Interpretação e Diagnóstico**. 1 ed. São Paulo: Roca, p.1- 46, 1995

M'GHIRBI, Y. et al. Clinical, serological and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. *Parasitology Research*, v. 104, n. 4, p. 767-774, 2009.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol. 55, pp. 141-147, 2003.

MURPHY, G.L., EWING, S.A., WHITWORTH, L.C., FOX, J.C., KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology** 79, 325–339. 1998.

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

MYLONAKIS, M.E., KOUTINAS, A.F., BREITSCHWERDT, E.B., HEGARTY, B.C., BILLINIS, C.D., LEONTIDES, L.S., KONTOS, V.S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19

natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 40, p. 174–184, 2004.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 766-770, 2008.

PEREZ, M., BODOR, M., ZHANG, C., XIONG, Q., RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1078, p. 110–117. 2006.

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

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. Ehrlichia canis in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 75-79, 2005.

SALES, M. R. R. P. **Prevalência de *Ehrlichia canis* pela técnica de nested-PCR e correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães de Alegre-RS. (Dissertação de Mestrado)**. 2012.

SANCHEZ, I. X. B., MACHADO, R. Z.; VASCONCELOS, A. C. **Apoptose na infecção experimental com *Ehrlichia canis* em cães domésticos. (Tese de Doutorado)**, Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SANTARÉM, V. A.; JOSÉ, M. D.; Laposy, C. B. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrlichiose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 845-852, 2008.

SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, C. Ehrlichiosis in Brazil Erliquiose no Brasil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

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

STICH, R.W., RIKIHISA, Y., EWING, S.A., NEEDHAM, G.R., GROVER, D.L., JITTAPALAPONG, S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, p. 540–546, 2002.

SILVA, M. V. M.; FERNANDES, R. A.; NOGUEIRA, J. L.; AMBRÓSIO, C. E. Erliquiose canina: revisão de literatura. **Arquivo Ciências Veterinárias Zootécnicas UNIPAR**, v. 14, n. 2, p. 139-143, jul./dez. 2011.

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, p. 2788–2793, 2001.

VIEIRA, R. F. C., BIONDO, A. W. SÁ GUIMARÃES, A. M.; SANTOS, A. P. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

VALLI, V.E.O. The hematopoietic system: ehrlichiosis. In: Jubb, K.V.F. Kennedy, P.C., Palmer, N., **Pathology of Domestic Animals**. p. 195–196, 1993.

WANER, T., HARRUS, S., JONGEJAN, F., BARK, H., KEYSARY, A., CORNELISSEN, A.W., Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**. v. 95, p. 1–15, 2001.

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

ZAVALA, M. V. G.; ALBERNAZ, A. P. “ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE CÃES SUSPEITOS DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Ehrlichia* spp. E *Anaplasma* spp. EM CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.,” **Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias Tese de Mestrado em Produção Animal**, CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ, 2007.

APÊNDICE I

FICHA DE CADASTRO E COLETA ILHÉUS

Nome do animal: _____ No do animal: _____ .DATA:

Bairro: _____ Idade: _____ Raça:
_____ Sexo: _____ Peso estimado: _____ Pêlo escuro:

Pêlo claro:

E-MAIL _____

O Animal é vacinado Sim Não Qual a vacina:

O Animal tem acesso/vai para rua? Si Nã

O Animal já viajou para outra cidade/luga Sim Não Onde:

O Animal já foi alguma vez no veterinário Sim Não Onde:

O Animal usa coleira/front-line – remédio contra carrapatos? S N

O Animal já usou algum remédio/tratamento no ouvido? S N

Tem outros animais em casa? Sim Não Qual (is):

A casa tem quintal? Si Nã Tem arvores/plantas: Si N

O quintal é pavimentado ou de terra? Cimento/pisc ter

Exames: Hemogramã Raspã Micológiã Citologia auri lar P.
hemop.

Presente

Ausente

1. Lifenopatia:

1.2. Linf. Submandibular:

1.3. Linf. Pré-escapular:

1.4. Linf. Poplíteo

--	--

--	--

Hem: _____

Ponta

de

orelha:

HT: _____

Leuc: _____

Bast: _____

Raspado:

Neut. _____

Linfo: _____

Mono: _____

Micológico:

Eosino: _____

Basof: _____

Cit.

Auricular:

Ptn: _____

Plaqueta: _____

Assinatura (autorização para coleta e exames) proprietário:

--

ANEXO I

No Protocolo definido para extração e purificação de DNA pelo Protocolo Fenol foram utilizados 400µL capa de leucócitos de sangue ou o macerado de carrapatos de cães em um tubo tipo eppendorf® de 2mL. Foram adicionados a este volume 500µL de solução salina [0,9%] (NaCl), homogeneizando-se suavemente, em seguida centrifugou-se durante 5 minutos na rotação de 10.000rpm, descartando-se o sobrenadante. Após este procedimento, foram adicionados 500µL de tampão da extração (TE): sendo composto por 250µL de Tris[20mM], 250µL de EDTA [50mM] e, 5µL de proteinase K [0,5%]; foram misturadas ao Vortex®. Após isto, foram mantido em banho-maria à seco por 45 minutos a 60°C. Terminado este tempo, foram adicionados 200µL de SDS [1%], retornando ao banho-maria à mesma temperatura durante 30 minutos.

Para a purificação do DNA foram adicionados à mistura anterior 350µL de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico [25:24:1], homogeneizados durante 1 minuto e centrifugados a 14.000rpm, em que houve separação de fase e transferindo-se o sobrenadante a um novo tubo, em que um segundo passo de purificação foi realizado adicionando-se 350µL de clorofórmio, homogeneizando-os posteriormente e centrifugado por 10 minutos a 14.000rpm. Após este passo o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionaram-se 150µL de Acetato de Amônio [5M] e 900µL de etanol absoluto [100%P.A.] gelado, agitando-se manualmente, aguardou-se 10 minutos em gelo. Em seguida centrifugaram-se durante 10 minutos a 12.000rpm, descartando-se o sobrenadante. O remanescente foi lavado com 1.000µL de etanol absoluto [80% P.A.] gelado e centrifugado por 10 minutos a 14.000rpm. Após o descarte do sobrenadante o remanescente ficou secando em tubo durante 10 minutos, passado este tempo, o DNA total foi diluído em 50µL de água ultra-pura estéril tamponada (Invitrogen®).

ANEXO II

Tabela X. Hematologia canina referência de normalidade

Eritrograma	Referências	
	Weiss et al., (2000)	Duncan JR (1994)
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,5 -8,5	5,0 – 7,9
Hemoglobina (g/dL)	12,0 – 18,0	12 – 19
Hematócrito (%)	37 – 55	45 – 57
CMH (pg)		21 – 26
CMHC(g/dL)		32 – 36
Leucograma		
Leucócitos Totais (mm^3)	6.000 – 17.000	5.000 – 14.000
Neutrófilos ($\mu\text{L}/\%$)	3.000 – 11.500/60 - 77	
Linfócitos ($\mu\text{L}/\%$)	1.000 – 4.800/12 – 30)	
Eosinófilos ($\mu\text{L}/\%$)	150 – 1.250/2 – 10	
Monócitos ($\mu\text{L}/\%$)	150 – 1.350/3 – 10	
Plaquetas ($\times 10^3\mu\text{L}$)	200 – 500	210 – 620

Parâmetros hematológicos	Positivos		Negativos		Referência (Weiss et al., 2000)
	média	dp	média	Dp	
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	5,42	1,06	6,47	0,7	5,5 – 8,5
HT (%)	36,22	7,51	46,18	6,94	37 – 55
HB (g/dL)	12,71	2,89	15,07	1,74	8 – 12
Leucócitos (mm^3)	12.269,68	4.132,78	12.631,73	3.661,6	6.000 – 17.000

Neutrófilo (mm ³)	8.632,68	3.227,13	8.989,32	2.565,9	1.200 – 6.800
Linfócitos (mm ³)	2.482,72	1.267,36	3.027,73	2171,2	1.000 – 4.800
Monócitos (mm ³)	521,72	402,75	358,23	236,17	150 - 1.350
Eosinofilos (mm ³)	745,94	655,94	89,81	827,85	100 – 1.250
Plaquetas (mm ³)	144,72	87,91	274,8	81,17	160 – 500
<hr/>					
Proteína (g/dL)	8,29	0,92	7,77	0,63	7 – 10
<hr/>					