



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS VETERINÁRIAS

ERLIQUIOSE E INFECÇÕES RELACIONADAS EM CÃES

Autora: Vanessa Sinnott Esteves

Orientadora: M.V. Simone Tostes de Oliveira

PORTO ALEGRE

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS VETERINÁRIAS

ERLIQUIOSE E INFECÇÕES RELACIONADAS EM CÃES

Autora: Vanessa Sinnott Esteves

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Análises Clínicas Veterinárias

Orientadora: Dra. Simone Tostes de Oliveira

PORTO ALEGRE

2007

TÍTULO: “ERLIQUIOSE E INFECÇÕES RELACIONADAS EM CÃES”

AUTOR: VANESSA SINNOTT ESTEVES

ORIENTADOR: SIMONE TOSTES DE OLIVEIRA

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Félix H. D. González

Membro da Banca Examinadora

M.V, M.Sc. Luciana de Almeida Lacerda

Membro da Banca Examinadora

Porto Alegre

2007

RESUMO

Ehrliquiose é uma doença de distribuição mundial associada a riquetsias, cocos pleomórficos gram-negativos, transmitidos por carrapatos, capazes de ocasionar doença em humanos e em diversas espécies de animais domésticos e selvagens. Esses organismos são encontrados em vacúolos formados por membrana celular nas células de hospedeiros infectados, mais frequentemente leucócitos. Com o advento de testes sorológicos e moleculares, infecções por múltiplos organismos transmitidos por carrapato têm sido reconhecidas com maior frequência. A emergência de espécies de *Anaplasma* e *Ehrlichia* como agentes etiológicos de patologias humanas e animais recém- descobertas ou reemergentes intensificou a necessidade de testes diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos. A epidemiologia desses agentes, no entanto, está longe de ser elucidada e há necessidade de mais estudos para que seja esclarecida.

Palavras-chave: Riquetsias, *Ehrlichia*, vetores, diagnóstico.

ABSTRACT

Ehrlichiosis is a worldwide distribution disease associated with the tick-transmitted rickettsiae, gram-negative pleomorphic cocci, capable of causing disease in humans and in several species of domestic and wild animals. These organisms are found in membrane-lined vacuoles within the cytoplasm of infected host cells, most often leukocytes. With the advent of increased serologic and molecular testing, infections with multiple tick-borne organisms has been recognized with increasing frequency. The emergence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species as etiological agents of newly discovered or reemerging animal and human pathogens have intensified the need for rapid, sensitive and specific diagnostic tests. The epidemiology of these disease is far from clear and more studies are needed to elucidate it.

Key-words: Ehrlichiosis; tick-transmitted; disease; diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama filogramático da família *Anaplasmataceae* baseado nas seqüências do 16S rRNA (Cohn, 2003). **12**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
IFA	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina
EUA	Estados Unidos da América
MG	Minas Gerais
RJ	Rio de Janeiro
PR	Paraná
RS	Rio Grande do Sul
HGE	Ehrliquiose granulocítica humana
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
HIV	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
FA	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Amino Transferase
LDH	Lactato Desidrogenase
ELISA	Enzime-linked-immunosorbent serologic assay

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Definição	8
2.2 Histórico	10
2.3 Relação taxonômica das espécies de Ehrlichia	11
2.4 Caracterização	
2.4.1 Anaplasma platys	12
2.4.2 Anaplasma phagocytophila (Ehrlichia equi)	14
2.4.3 Neorickettsia risticii (Ehrlichia risticii)	15
2.4.4 Ehrlichia ewingii	15
2.4.5 Ehrlichia chaffensis e Ehrlichia sennetsu	16
2.4.6 Ehrlichia canis	17
3. DIAGNÓSTICO	
3.1 Achados clínico-patológicos	21
3.2 Evidências sorológicas	22
3.3 Diagnóstico molecular	23
4. TRATAMENTO	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO:

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., 1997; Egenvall et al., 2000; Cohn et al., 2003).

Rotineiramente, o diagnóstico definitivo de erliquioses é baseado em achados hematológicos, bioquímicos e sorológicos (McBride et al., 1996).

Estes agentes são foco de estudos e pesquisas constantes e atraem atenção não somente por atuarem como agentes etiológicos de doenças animais, mas principalmente por caracterizarem zoonoses em potencial, de forma ainda mais preocupante nas comunidades menos assistidas. Adicionalmente, trabalhadores rurais e veterinários, que possuem contato mais próximo com uma variedade de animais, estão expostos a uma gama de vetores e agentes carreados por eles (Egenvall et al., 1997; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003; Tate et al., 2005).

Presume-se que todas as espécies do gênero *Ehrlichia* sejam transmitidas por vetores, dentre eles artrópodes. Assim, países cujo clima favorece o desenvolvimento dos mesmos, possuem maior incidência de infecções por hemoparasitas (Cohn et al., 2003; Moreira et al., 2003; Paddock et al., 2003; Tate et al., 2005).

Infecções por *Ehrlichia sp.* podem mimetizar diversas doenças infecciosas através de apresentações clínicas extremamente variáveis (Cohn et al., 2003). No entanto, com o advento de técnicas sorológicas e moleculares precisas ocorreram aumentos significativos nas detecções de infecções e co-infecções transmitidas pelos carrapatos (Suksawat et al., 2000; Inokuma et al., 2003; Paddock et al., 2003; Loftis et al., 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição

Erliquias são cocos pleomórficos, gram-negativos, agentes etiológicos de doenças em diversas espécies animais e em seres humanos. Assemelham-se mais estreitamente às Rickettsias do que à

outros organismos gram-negativos, pois não ocasionam endotoxemia, além de necessitarem de um vetor capaz de promover sua transmissão através da secreção salivar (Dawson et al., 1991; Panciera et al., 2001; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003).

Rickettsias são organismos de distribuição global, incluindo Estados Unidos da América, África, Europa, América do Sul e Ásia (McBride et al., 1996; Inokuma et al., 2005).

Há relatos de infecções por esses agentes por todo o mundo, sendo descritos em praticamente todos os continentes (Kim et al., 2006).

De uma perspectiva evolucionária, as bactérias gram-negativas, transmitidas por vetores (vector-borne diseases) estão bastante adaptadas para causar infecções persistentes num número crescente de animais domésticos e selvagens que podem atuar como reservatórios. Esses organismos geralmente causam infecções intracelulares de longa duração em eritrócitos, monócitos, neutrófilos, plaquetas e, potencialmente, células do endotélio vascular (Maggi et al., 2006; Kim et al., 2006).

Atribui-se a várias espécies de carrapato a responsabilidade pela disseminação de tais agentes (Loftis et al., 2006). Alguns estudos utilizaram PCR, associado a outras ferramentas moleculares epidemiológicas em amostragens de carrapatos, permitindo determinar a prevalência de algumas infecções de acordo com a distribuição geográfica de vetores (Inokuma et al., 2003; Kim et al., 2006).

Riquetsias são parasitas intracelulares obrigatórios, freqüentemente encontrados em vacúolos delimitados por membranas no citoplasma de células eucariotas, das quais as mais comumente infectadas são os leucócitos. Os mecanismos que impedem a fusão de lisossomos aos endossomos que abrigam os microorganismos ainda não estão claramente definidos (Holland et al., 1985; Arrada-Alvarado et al., 2003; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003).

Devido à característica de localização intracelular, esses microorganismos dificultam a atuação do sistema imune e a resposta humoral acaba por ser ineficiente. A defesa do organismo depende quase que exclusivamente da resposta celular (fagocitose) para eliminação do agente. Dessa forma, as terapias antimicrobianas têm sua eficácia bastante reduzida (Holland et al., 1985; Harrus et al., 1997; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003).

Sugere-se que a resposta imune humoral não possui um papel importante na defesa do organismo contra essas infecções, ao contrário, hipóteses indicam que ela possa contribuir para a patogênese

da doença já que a grande produção de anticorpos pode gerar deposição de imunocomplexos (Harrus et al., 1997).

As Riquetsias, de uma forma geral, exigem condições muito específicas para crescimento em meios de cultivo, dificultando seu isolamento até mesmo porque as células da linhagem monocítica canina, necessária para o isolamento e cultivo, permanecem viáveis por curtos períodos, em média duas semanas (Dawson et al., 1991; Rikihisa et al., 1991; Suksawat et al., 2000; Maggi et al., 2006).

Em determinadas fases da infecção, quando as amostras sanguíneas têm resultados negativos de PCR, é possível detectar os organismos em outros locais. A evasão da circulação tem como objetivo evitar a resposta imune. Estudos recentes sugerem que as espécies do gênero *Ehrlichia* migram para tecidos conectivos densos (fascias e seus músculos). Outra hipótese é que, mesmo que *Ehrlichias* granulocíticas sejam mais comumente observadas em células granulocíticas, elas persistam em células mononucleares de vida longa (Egenvall et al., 2000).

Os principais parasitas caninos estabelecidos são *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* e *Anaplasma platys* (antigamente sob a nomenclatura de *Ehrlichia platys*), enquanto *Ehrlichia chaffensis*, agente endêmico do veado americano (*Odocoileus virginianus*) é considerada um agente zoonótico, causador da erliquiose monocítica humana (Panciera et al., 2001; Inokuma et al., 2003; Tate et al., 2005).

Muitas espécies de carrapatos são capazes de transmitir os parasitas horizontalmente do vetor para o hospedeiro eucarioto. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, também conhecido como carrapato marrom ou vermelho do cão, é responsável pela transmissão da espécie *E. canis*, além de *E. ewingii* e, possivelmente, *A. platys* (Huxsoll et al., 1970; McBride et al., 2001; Cohn et al., 2003; Inokuma et al., 2003; Irwin et al., 2005; Loftis et al., 2006).

A transmissão de *E. ewingii* se dá, no entanto, principalmente através do vetor *Ambliomma americanum*, enquanto espécies de *Ixodes* são responsáveis pela disseminação de *A. phagocytophila*. Um único carrapato pode ser responsável pela transmissão de mais de um tipo de agente. Tanto um mesmo carrapato infectado com mais de um agente simultaneamente, quanto vários carrapatos infectados com um único agente cada, podem transmitir os parasitas ao mesmo hospedeiro, caracterizando co-infecções com múltiplos patógenos. Múltiplos patógenos normalmente desencadeiam doenças mais complexas e severas, dificultando o diagnóstico e tratamento dos pacientes (Pusterla et al., 2000; Cohn et al., 2003; Loftis et al., 2006).

2.2 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 (Rikihisa et al., 1991; Harrus et al., 1997; Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003). Casos de erliquiose canina forma 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).

No ano de 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 et al., 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 (Rikihisa et al., 1991; Almosny et. al., 2002; Beaufilet et al., 2002; Cohn et al., 2003).

Em 1969 foi descrita uma doença hemorrágica em cães nativos de Singapura e cães militares na Tunísia (Huxsoll et al., 1970; Rikihisa et al., 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, intensificaram-se as pesquisas para

caracterização do organismo e definição da patofisiologia do agente (Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003).

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).

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

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).

A espécie *E. canis* é a causa mais comum de infecção natural em cães, considerada também a mais severa. Foram descritas causando infecção natural as espécies *E. platys* (atualmente, após reclassificação, conhecida como *Anaplasma platys*), *E. equi*, *E. risticii* e *E. ewingii*, *E. chaffensis* (Suksawat et al., 2002; Almosny et. al., 2000; Paddock et al., 2003).

2.3 Relação taxonômica das espécies de Ehrlichia

O reconhecimento de diversas espécies relacionadas à *E. canis*, porém com características distintas dela, associado à disponibilidade de modernas técnicas de biologia molecular (PCR, sequenciamento, clonagem, dentre outras), direcionaram a pesquisa às mais diversas descobertas e progressos, culminando numa extensa reclassificação e mudanças de nomenclatura (Egenvall et al., 1997; Dumler et al., 2001; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003; Inokuma et al., 2005).

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, enquadrando-se *E. canis* e *E. risticii*, formas trombocíticas (*E. platys*) e formas granulocíticas (espécies *E. ewingii* e *E. equi*) (Egenvall et al., 1997; Dumler et al., 2001; Beaufils et al., 2002; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 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 et al., 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 (Egenvall et al., 1997; Dumler et al., 2001; Cohn et al., 2003; 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* (Dumler et al., 2001; Beaufils et al., 2002; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003; Inokuma et al., 2005; Aguirre et al., 2006). Portanto, os gêneros que atualmente constituem a família *Anaplasmataceae* são *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* (Dumler et al., 2001; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003; Inokuma et al., 2005; Aguirre et al., 2006).

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).

Segundo a reclassificação, o genogrupo 1 *Ehrlichia* mantém o nome do gênero, enquanto o membros do genogrupo 2 mudam de *Ehrlichia* para *Anaplasma* e os membros do terceiro genogrupo recebem o nome de *Neorickettsia* (Dumler et al., 2001; Beaufils et al., 2002; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003; Inokuma et al., 2005).

Organismos anteriormente conhecidos como *E. equi*, *E. phagocytophila* e o agente da erliquiose granulocítica humana (HGE) diferem em, no máximo, três nucleotídeos e são considerados uma mesma espécie: *A. phagocytophila* (Pusterla et al., 2000; Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003; Inokuma et al., 2005).

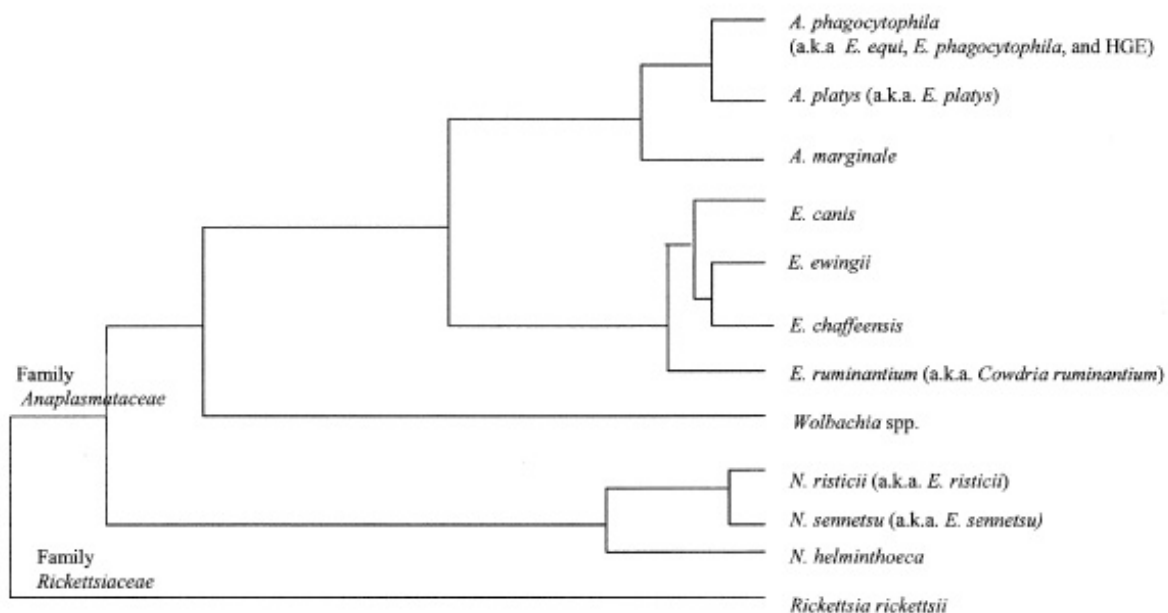


Figura 1-Diagrama filogramático da família *Anaplasmataceae* baseado nas seqüências do 16S rRNA. Fonte: Cohn, L. A. Ehrlichiosis and related infections. Vet Clin Small Anim 33 (2003) 863-884.

2.4 Caracterização

2.4.1 *Anaplasma Platys*

No ano de 1978 Harvey e colaboradores descreveram um microorganismo semelhante a Ehrlichia sp., responsável pela trombocitopenia cíclica induzida. Cães submetidos à infecção experimental apresentaram, num intervalo de sete a doze dias, organismos infectando plaquetas apenas (Egenvall et al., 1997; Harrus et al., 1997; Almosny et al., 2002; Beaufils et al., 2002; Inokuma et al., 2002; Aguirre et al., 2006).

O Bergey's Manual of Systematic Bacteriology reconhece a descrição do organismo por French & Harvey em 1983 como organismo parasita exclusivo de plaquetas de cães, possuidor de membrana dupla e divisão por fissão binária. Apresenta coloração basofílica em esfregaços corados por Giemsa, com dimensões entre 0,4 a 1,2 µm, e formatos distintos: achatada, arredondada ou ovalada (Harrus et al., 1997; Almosny et al., 2002; Martin et al., 2004; Aguirre et al., 2006; Eddlestone et al., 2006).

A. platys é um agente bastante difundido. Foi descrito nos EUA, Japão, Itália, Venezuela, Tailândia, França, Grécia, Taiwan, Brasil, dentre outros países (Inokuma et al., 2002).

Infecções são correlacionadas a casos de uveíte em cães (Panciera et al., 2001; Almosny et al., 2002), além de sinais clínicos inespecíficos como anorexia, letargia, depressão, perda de peso e descargas muco-purulentas. Ao exame físico, febre, linfadenomegalia e palidez de mucosas foram descritos (Harrus et al., 1997; Beaufils et al., 2002; Inokuma et al., 2002; Martin et al., 2004; Huang1 et al., 2005; Aguirre et al., 2006).

O tropismo por plaquetas é único dentre as doenças relacionadas a esse tipo de patógeno, muito embora outros patógenos possam ocasionar trombocitopenia (Egenvall et al., 1997; Cohn et al., 2003; Martin et al., 2004; Aguirre et al., 2006). *A. platys* multiplica-se apenas em plaquetas de cães, podendo ser transmitida por inoculação intravenosa de sangue oriundo de cães infectados (Almosny et al., 2002; Martin et al., 2004; Aguirre et al., 2006).

O vetor desse microorganismo permanece desconhecido, mas suspeita-se que seja o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, pois são comuns infecções concomitantes de *E. canis* e *A. platys* (Harrus et al., 1997; Almosny et al., 2002; Inokuma et al., 2002; Cohn et al., 2003; Martin et al., 2004; Irwin et al., 2005; Aguirre et al., 2006; Loftis et al., 2006).

A transmissão de *A. platys* se dá pela inoculação de sangue contaminado. Os cães parasitados manifestam trombocitopenia cíclica de moderada a severa cíclica, com periodicidade de uma a duas semanas, que ocorre simultaneamente com a parasitemia das plaquetas (Harrus et al., 1997; Almosny et al., 2002; Cohn et al., 2003).

Durante a parasitemia a trombocitopenia permanece acentuada, tornando-se branda posteriormente à fase aguda ou até mesmo normalizando valores após três a quatro dias (Almosny et al., 2002; Irwin et al., 2005; Eddlestone et al., 2006). Situações de estresse como cirurgias, doenças concomitantes, nutrição inadequada e prenhez podem precipitar doença clínica em animais com doença sub-clínica (Beaufils et al., 2002).

A fase aguda caracteriza-se por parasitemia cíclica, seguida de trombocitopenia e linfadenopatia generalizada (Almosny et al., 2002; Inokuma et al., 2002; Huang1 et al., 2005; Irwin et al., 2005; Aguirre et al., 2006; Eddlestone et al., 2006). Passado o período de parasitemia a infecção assemelha-se a outras infecções que promovem trombocitopenia (*E. canis*, *Babesia canis* e *Rickettsia rickettsii*) (Eddlestone et al., 2006). Apesar da diminuição significativa no número de

plaquetas circulantes, os cães infectados raramente apresentam sinais de hemorragias significativas (Almosny et. al., 2002; Huanget al., 2005).

Trombocitopenia regenerativa está presente em grande parte dos casos e promove, indiretamente, a redução da agregação plaquetária (Almosny et. al., 2002). A partir da observação da medula óssea pode-se verificar hiperplasia megacariocítica na fase aguda da doença, embora as demais linhagens celulares dos cães infectados podem estar normais ou hiperproliferativas (Almosny et. al., 2002). O mecanismo pelo qual ocorre trombocitopenia não foi completamente elucidado. Presume-se que plaquetas alteradas sejam retiradas da corrente circulatória através de seqüestro esplênico ou outros sítios, além de sofrerem fagocitose por macrófagos no baço, fígado e medula óssea e ataques imunes (Romero-Guzmán et al., 2000; Beaufils et al., 2002; Eddlestone et al., 2006).

O número de eritrócitos e leucócitos também sofre redução a medida que a doença evolui, porém não o suficiente para caracterizar anemia e leucopenia (Almosny et. al., 2002; Beaufils et al., 2002).

No primeiro relato de *A. platys* em cães nativos de Israel, além das manifestações clínicas conhecidas, a presença de plaquetas gigantes caracterizadas como sendo jovens e observadas apenas em casos de erliquiose granulocítica foi associada ao agente (Almosny et. al., 2002).

Infecções associadas de várias espécies do gênero *Ehrlichia* ou outras doenças podem gerar quadros mais graves (Almosny et. al., 2002; Beaufils et al., 2002).

Animais doentes apresentam ocorrência de hipergamaglobulinemia, com elevação dos valores de IgM e IgA. (Harrus et al., 1997; Almosny et. al., 2002). Observa-se ainda a redução dos níveis e da capacidade de fixação de ferro (Almosny et. al., 2002).

O diagnóstico visual dessa Riquetsia, a partir da visualização de inclusões nas plaquetas, é considerado difícil, visto o caráter cíclico da trombocitopenia. Além disso, o teste de imunofluorescência indireta detecta anticorpos para *A. platys* durante um curto período após o aparecimento de plaquetas parasitadas, entretanto essas espécies não produzem reações cruzadas quando realizados testes sorológicos (Almosny et. al., 2002; Beaufils et al., 2002; Cohn et al., 2003; Martin et al., 2004).

2.4.2 *Anaplasma phagocytophila* (*Ehrlichia equi*)

A real incidência de infecções por *A. phagocytophila* em cães é desconhecida (Cohn et al., 2003). Entretanto, acredita-se ter sido primeiramente notificada como uma forma pouco usual de *E. canis*, devido a sua reprodução e formação de mórula no citoplasma de neutrófilos e mononucleares. No ano de 1982, foi relatada a ocorrência da infecção natural em dois cães da Califórnia, habitando regiões em que a infecção por *Anaplasma phagocytophila* é endêmica para a espécie equina. Há relatos de que tenha sido primeiramente descrita em 1989 por Bellström na Suécia (Egenvall et al., 1997; Egenvall et al., 1998; Egenvall et al., 2000; Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003).

Infecções naturais por esse agente em cães são normalmente acompanhadas de letargia, apatia, trombocitopenia, febre e depressão (Egenvall et al., 1998; Egenvall et al., 2000; Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003; Inokuma et al., 2005). No entanto, infecções experimentais desencadeiam doença moderada (Cohn et al., 2003). Neutropenia, linfopenia, eosinopenia e trombocitopenia, além de inclusões em granulócitos, foram achados laboratoriais em cães experimentalmente infectados e monitorados (Egenvall et al., 1998; Egenvall et al., 2000). Egenvall e colaboradores comprovaram que a imunocompetência do paciente está diretamente relacionada a agudização da infecção. Animais infectados, sem sinais clínicos, recebiam administração de corticóides e, pouco tempo após, percebia-se o agravamento do quadro, com aparecimento de inclusões celulares e sintomatologia (Egenvall et al., 1998; Egenvall et al., 2000).

Cães infectados cronicamente apresentam depressão moderada, dificuldade de locomoção e título de anticorpos bastante elevado (Egenvall et al., 1998; Egenvall et al., 2000).

Suspeita-se que carrapatos sejam os vetores do agente, embora o modo de transmissão permanece desconhecido (Egenvall et al., 1998; Almosny et. al., 2002; Huang et al., 2005; Inokuma et al., 2005). Sabe-se apenas que a maior parte dos casos desenvolve-se no outono (Cohn et al., 2003).

A. phagocytophila, apesar de capaz de desencadear quadros de poliartrite, o faz com menor frequência do que àqueles atribuídos à *E. ewingii* (Cohn et al., 2003).

Testes sorológicos não apresentam reações cruzadas com *E. canis*, pelo fato de que pertencem a gêneros distintos (Egenvall et al., 1998; Cohn et al., 2003). É ainda uma das Riquetsias conhecidas que apresenta menor grau de especificidade por hospedeiros quando comparada com

as outras do gênero *Ehrlichia* (Cohn et al., 2003). Além de acometer o cão, atribui-se a esse organismo ocorrência da erliquiose granulocítica equina, febre do carrapato em pequenos ruminantes, erliquiose granulocítica humana e infecções também em felinos (Egenvall et al., 1997; Egenvall et al., 1998; Cohn et al., 2003; Huang1 et al., 2005; Inokuma et al., 2005).

2.4.3 *Neorickettsia risticii* (*Ehrlichia risticii*)

Agente causal da febre equina de Potomac, infecta equinos, cães e felinos e, assim como os outros agentes descritos, é transmitido através de picadas de carrapatos, além de pequenos artrópodes (Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003).

Possui um ciclo de vida complexo, apenas recentemente elucidado, envolvendo caramujos como hospedeiros intermediários (Cohn et al., 2003).

Descrita no ano de 1985 por Holland e colaboradores, promove infecções leves ou inaparentes em cães (vômitos e letargia), que podem permanecer como portadores assintomáticos do agente (Almosny et al., 2002; Cohn et al., 2003).

Estudos epizooticos em cães e gatos de áreas endêmicas para erliquiose equina revelaram a presença de anticorpos para *Neorickettsia risticii* (Almosny et al., 2002). Conforme esperado, não apresentam reações sorológicas cruzadas com outros agentes (Cohn et al., 2003).

2.4.4 *Ehrlichia ewingii*

Em 1971 foi descrita a ocorrência de *Ehrlichia* em granulócitos de cães que apresentavam infecção branda. Posteriormente sugeriu-se que as inclusões neutrofílicas fossem consideradas uma forma de *E. equi* (Almosny et. al., 2002).

A espécie *E. ewingii* foi relatada no ano de 1985 como sendo o agente etiológico da erliquiose granulocítica canina, devido à presença de mórulas em granulócitos de cães acometidos por poliartrite aguda. A espécie pode ser antigenicamente relativa à *E. canis* e produz uma infecção subclínica, causando febre e muitas anormalidades hematológicas, dentre as quais se destacam neutropenia, linfocitose e trombocitopenia num período entre 18 e 24 dias após a infecção (Almosny et al., 2002). Essas características são atribuídas à infecção moderada sistêmica em cães (Panciera et al., 2001).

Há casos em que o animal infectado demonstra sinais neurológicos, podendo decorrer de meningite, entretanto, não há registros de doenças oculares como as relatadas em infecções por *E. canis* (Panciera et al., 2001; Almosny et. al., 2002).

A identificação apenas da mórula granulocítica não permite diferenciar a infecção por *A. phagocytophila* da ocasionada por *E. ewingii*, muito embora a distribuição geográfica desses agentes possa fornecer indícios a respeito do real agente envolvido (Cohn et al., 2003).

Panciera e colaboradores em recente estudo demonstraram com relativa facilidade, através de infecções experimentais com *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffensis* e o agente da HGE, a indução de inflamação nas meninges cerebrais e tecido ocular de cães. A magnitude e composição celular da reação inflamatória permitem a identificação de infecções pelos agentes através de histopatologia ocular (2001).

Infecções caninas são comumente associadas com poliartropatias cursando com dor e edema das articulações, além de febre (Cohn et al., 2003). Pode-se verificar o aparecimento de mórulas em células polimorfonucleares do líquido sinovial (Almosny et al., 2002).

Ambos os agentes da HGE da erliquiose por *E. ewingii* promovem um quadro indiferenciado em humanos sem, no entanto, associarem-se a doenças do sistema nervoso central ou oculares (Panciera et al., 2001; Cohn et al., 2003).

Não há certezas a respeito do vetor responsável pela disseminação do agente, entretanto, há suspeitas de que seja o carrapato *Amblyomma americanus* e, possivelmente, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Suspeita-se, também, da participação de *Dermacentor variabilis* em alguns casos (Almosny et. al., 2002). Os animais são mais afetados no verão e primavera, estações em que estes vetores estão mais ativos (Cohn et al., 2003).

Os casos dessa enfermidade têm sido correlacionados com aparecimento de febre, letargia, vômito e diarreia. As análises laboratoriais revelam anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia com presença de plaquetas gigantes, linfopenia e eosinopenia (Almosny et. al., 2002).

Há ainda a possibilidade de co-infecções de *E. ewingii*, *E. equi* e *E. canis* ou ocorrência de reações sorológicas cruzadas entre elas (Almosny et. al., 2002).

2.4.5 *Ehrlichia chaffensis* e *Ehrlichia sennetsu*

Ehrlichia 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 et al., 2003). Trata-se de um agente endêmico à espécie *Odocoileus virginianus* (White-tailed deer), veado típico dos EUA, promovendo a erliquiose monocítica em humanos, enquanto agentes ainda não completamente caracterizados promovem a erliquiose granulocítica humana (Egenvall et al., 1997; Panciera et al., 2001, Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003; Tate et al., 2005).

Considerada um patógeno emergente, *Ehrlichia 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 et al., 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 et al., 2003).

Ehrlichia sennetsu afeta humanos e foi descrito no Japão. Tem tropismo por células mononucleares e provoca a febre sennetsu em humanos, considerados hospedeiros naturais (Holland et al., 1985; Almosny et. al., 2002). É comum que pessoas suspeitas de erliquiose humana apresentem febre e tenham histórico de contato recente com carrapatos (Holland et al., 1985; Dawson et al., 1991).

Cães são susceptíveis a infecções experimentais por *E. chaffensis* e *E. sennetsu* como descrito por Misao & Kobayashi em 1956 (Holland et al., 1985; Almosny et. al., 2002), com demonstrações de infecção moderada a inaparente (Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003).

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

Cães, macacos e camundongos podem infectar-se com *E. sennetsu* (Egenvall et al., 1997; Almosny et. al., 2002).

São descritos casos de reações cruzadas entre *E. sennetsu*, *E. canis* e *E. risticii* (Almosny et. al., 2002).

Segundo Dawson et al. (1991), a mórula da *Rickettsia* responsável pela erliquiose humana nos EUA, assemelha-se bastante às vistas em células infectadas por *E. canis* (Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003).

A confirmação da infecção no estudo de Dawson deu-se através de sorologia e PCR (Dawson et al., 1991). O sequenciamento dos produtos obtidos nas reações de PRC (16S rRNA) revelou que os isolados dos pacientes utilizados no estudo são similares, mas não idênticos à *E. canis* (98,7% de homologia na seqüência) (Dawson et al., 1991; Pusterla et al., 2000; Suksawat et al., 2000; Paddock et al., 2003). Assim, somente através de PCR é possível diferenciar *E. canis* de *E. chaffensis*, já que cães infectados apresentam títulos positivos para ambas devido a reações cruzadas (Cohn et al., 2003; Paddock et al., 2003).

Células infectadas analisadas por eletromicrografia revelaram que os corpúsculos de inclusão são envoltos por uma membrana citoplasmática distinta. Cada organismo individualmente é circundado por uma membrana plasmática internamente e a parede celular externamente. Essa característica facilita a evasão do organismo de ataques do sistema imune (Dawson et al., 1991; Paddock et al., 2003).

Esses organismos são extremamente pleomórficos, tendo de formas ovais a diamantes (Dawson et al., 1991).

Os principais sinais clínicos relatados em pacientes humanos acometidos pela erliquiose humana incluem febre, mialgia, dores de cabeça, leucopenia, trombocitopenia e elevação da atividade das enzimas hepáticas (Dawson et al., 1991; Paddock et al., 2003).

Há evidências de que cães também são susceptíveis a esse agente, além do agente responsável pela HGE (Pusterla et al., 2000; Panciera et al., 2001; Paddock et al., 2003).

2.4.6 *Ehrlichia canis*

Foi a primeira *Ehrlichia* a ser descrita como patógeno de importância veterinária e, provavelmente, a mais estudada. Possui ampla distribuição mundial com prevalência elevada, morbidade e mortalidade em regiões de clima quente (Rikihisa et al., 1991; McBride et al., 2001; Cohn et al., 2003; Irwin et al., 2005).

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).

Sua natureza é insidiosa e, portanto, a erliquiose canina é observada durante todo o ano (Almosny et. al., 2002).

Os achados clínicos associados à infecção por *E. canis* são variáveis, dependendo de diversos fatores como a cepa do organismo, o status imune do hospedeiro, além da raça do animal (Harrus et al., 1997; Cohn et al., 2003; Aguirre et al., 2006). 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 (Huxsoll et al., 1970; Harrus et al., 1997; Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003).

Animais mestiços (não puros) parecem ter uma resistência mais elevada às infecções por erliquias (Harrus et al., 1997).

Um quadro hemorrágico severo algumas vezes caracterizado como pancitopenia tropical está normalmente associado à presença de anemia aplásica (por alterações causadas pelo agente no microambiente medular), ocorrendo em alguns cães aproximadamente 60 dias após a infecção (Rikihisa et al., 1991; Almosny et. al., 2002). Algumas vezes epistaxe é o único sinal que animais infectados por *E. canis* apresentam (Huxsoll et al., 1970).

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 agente ao qual se atribui a transmissão da erliquiose é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido também como carrapato marrom ou vermelho dos cães (Huxsoll et al., 1970; Rikihisa et al., 1991; Harrus et al., 1997; Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003). 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 (teleóginas) 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 *Rhipicephalus 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 *Ehrlichia 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).

Infecções experimentais são possíveis através da inoculação subcutânea, intravenosa, intraperitoneal de sangue ou emulsão de órgãos (Almosny et. al., 2002).

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* (Almosny et. al., 2002).

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; Cohn et al., 2003).

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 são observadas 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 (Huxsoll et al., 1970; Almosny et. al., 2002; Arraga-Alvarado et al., 2003; 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 excitose (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 nas células parasitadas (Almosny et. al., 2002).

A doença promovida pela *Rickettsia E. canis* ocorre tipicamente em três fases: aguda, subclínica e crônica (Rikihisa et al., 1991; Panciera et al., 2001; McBride et al., 2001; Cohn et al., 2003).

A fase aguda ocorre de 1 a 3 semanas após o animal ter sido picado pelo carrapato infectado e caracteriza-se por febre, linfadenomegalia, esplenomegalia, dores musculares, anemia não regenerativa, trombocitopenia e leucopenia, num quadro de leve à moderado (Rikihisa et al., 1991; Panciera et al., 2001; McBride et al., 2001; Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003). A fase aguda da infecção dura em torno de dois a quatro semanas e a replicação do organismo ocorre dentro de células mononucleares infectadas (Almosny et. al., 2002).

Segue-se a fase subclínica, que persiste por meses a anos. O animal nesse estado é considerado portador do agente etiológico (Rikihisa et al., 1991; Panciera et al., 2001).

A infecção pode progredir para uma fase crônica, na qual os sinais clínicos mais severos da doença ocorrem. *E. canis* pode ocasionar meningites e doenças oculares (Panciera et al., 2001).

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).

A alteração hematológica mais consistente diz respeito a trombocitopenia, resultante de uma combinação de fatores. Ocorre hipoplasia megacariocítica, inflamação do endotélio vascular, que desencadeia o consumo de plaquetas, destruição imunomediada das mesmas (deposição de imunocomplexos), além do seqüestro pelo baço pela diminuição de sua meia-vida (Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003).

Como resultado da vasculite e lesões endoteliais, pode-se estabelecer um quadro de coagulação intravascular disseminada (Almosny et. al., 2002).

Alterações na função plaquetária também são relatadas em casos de cães infectados pela *Rickettsia* em questão. A liberação de fator III plaquetário, que possui atividade pró-coagulante,

promove a diminuição da adesão plaquetária. Outra hipótese que pode estar associada à anteriormente descrita é que alguns defeitos plaquetários justifiquem-se pela superposição da membrana plaquetária com macroglobulinas, que também responsáveis por sua destruição auto-imune (Almosny et. al., 2002).

Em momentos de trombocitopenia, os animais infectados podem apresentar aparecimento de petéquias, epistaxe, hematúria ou hemorragia gastrointestinal, dependendo da contagem plaquetária (Almosny et. al., 2002). Os tempos de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP) apresentam-se dentro dos valores de referência na maioria dos casos, no entanto, o tempo de sangramento mostra-se prolongado (Huxsoll et al., 1970; Beaufils et al., 2002).

Na fase aguda da erliquiose ocorre a inibição da migração das plaquetas numa fase anterior ao decréscimo numérico dessas e, antes mesmo, do aparecimento de anticorpos humorais específicos. Através da visualização das plaquetas através do microscópio de varredura de elétrons, pode-se constatar que o fator de inibição da migração plaquetária comprometeu a formação de pseudópodes das plaquetas, induzindo ao arredondamento, aglutinação e “vazamento” das plaquetas. Aparentemente, o fator de inibição plaquetária é produto de linfócitos ativados (Almosny et. al., 2002).

A diminuição da capacidade de adesão das plaquetas relaciona-se, também, à redução numérica que ocorre durante a fase aguda da infecção, correlacionada à presença de anticorpos anti-plaquetários, além da ação da direta da *E. canis* sobre as plaquetas circulantes (Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003).

A ativação da imunidade humoral gera o aparecimento de anticorpos antinucleares, anti-plaquetários e anti-eritrocitários na circulação, existindo evidências da produção de linfocinas e de fator inibidor da migração de leucócitos (Harrus et al., 1997; Almosny et. al., 2002).

Outra possível alteração hematológica pode ser o decréscimo da produção de células vermelhas, ocasionada pelo processo inflamatório (Almosny et. al., 2002).

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 (Almosny et al., 2002; Cohn et al., 2003). Além disso, muitos pacientes sobrevivem à fase aguda e permanecem na fase subclínica (Rikihisa et al., 1991; Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003).

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) (Almosny et al., 2002; Cohn et al., 2003). 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 (Harrus et al., 1997; Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003).

Achados hematológicos desse estágio da doença podem assemelhar-se aos encontrados na fase aguda, incluindo trombocitopenia, anemia arregenerativa e resposta leucocitária variável e hipergamaglobulinemia (Almosny et. al., 2002; Cohn et al., 2003).

A duração dessa fase depende da imunocompetencia 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).

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, hematúria, hematoquesia). Além disso, a persistente estimulação antigênica promove hipergamaglobulinemia, podendo resultar em doenças glomerulares imunomediadas (glomerulonefrite ou síndrome nefrótica), acompanhadas de pancitopenia (Rikihisa et al., 1991; Almosny et al., 2002; Cohn et al., 2003). Não é raro que se encontre casos de uveítes associadas, além de sintomatologia nervosa (ataxia, paresia, deficiências proprioceptivas e nistagmo) (Cohn et al., 2003).

Alguns animais podem apresentar episódios subsequentes de sangramento por diversos meses, ocasionando a morte (Huxsoll 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 (Huxsoll et al., 1970; Almosny et al., 2002; Irwin et al., 2005).

Alguns estudos realizados com cães esplenectomizados observaram 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).

Estudos correlacionaram alguns fatores ao prognóstico da doença, concluindo que os fatores determinantes na morte de animais infectados por erliquiose incluem a raça do animal, contagem de células vermelhas e leucócitos, concentração de hemoglobina além de número de plaquetas (quanto mais severa for a trombocitopenia, maiores as chances de que o paciente não sobreviva). Outros fatores demonstraram pouca influência no prognóstico dos pacientes, incluindo idade, sexo, concentração de proteína plasmática total e confinamento dos animais (Harrus et al., 1997).

3. 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 o que impede que o diagnóstico dessas infecções em países pobres como a África (Inokuma et al., 2005). No Brasil, há poucas pesquisas relacionadas à patofisiologia das riquetsias, sendo uma área relativamente recente de estudos.

3.1 Achados clínico-patológicos

Antes do desenvolvimento da técnica de 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 et al., 1991; Maggi et al., 2006).

Assim como no exame físico e na anamnese, anormalidades clínico - patológicas tendem a ser pouco específicas (Cohn et al., 2003).

Inclusões celulares caracterizam infecções por microorganismos do gênero *Ehrlichia*, porém, sua ausência não exclui ocorrência de infecção, embora quanto maior o número de inclusões, mais severa a manifestação da doença (Egenvall et al., 1998). Diversos estudos descrevem a utilização da capa flogística (buffy-coat) a fim de maximizar as chances de visualização de inclusões ao microscópio eletrônico, ou ainda, para a realização de PCR dessa porção celular (Rikihisa et al., 1991; Eddlestone et al., 2006).

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 hiperglobulimemia 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 (Huxsoll et al., 1970; Rikihisa et al., 1991; Harrus et al., 1997; Cohn et al., 2003).

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 (Egenvall et al., 1997; Harrus et al., 1997; Egenvall et al., 1998; Cohn et al., 2003).

Animais com infecções crônicas, cursando ou não com glomerulonefrites, podem manifestar proteinúria (Egenvall et al., 1997; 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).

Espécies emergentes de *Anaplasma*, *Bartonella* e *Ehrlichia* são agentes etiológicos emergentes ou reemergentes de animais e humanos e promoveram a intensificação da necessidade de diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos (Irwin et al., 2005; Maggi et al., 2006).

O diagnóstico dessas patologias normalmente baseia-se na realização de PCR e soroconversão, entretanto, atualmente a histopatologia de tecido ocular tem fornecido embasamento para diagnóstico. Conforme dito anteriormente, as características do infiltrado inflamatório, além de sua intensidade, nos tecidos podem ser relacionadas a infecções por Riquetsias (Panciera et al., 2001).

Alterações inflamatórias no epitélio ocular envolvem tipicamente a retina, o corpo ciliar, a íris e plexo coróide (Panciera et al., 2001).

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

3.2 Evidências sorológicas

As técnicas sorológicas são as mais rotineiramente empregadas como testes confirmatórios de diagnóstico para infecções por *Rickettsias* (Rikihisa et al., 1991; Egenvall et al., 1997; Harrus et al., 1997; Egenvall et al., 1998; Cohn et al., 2003).

O princípio dos testes é detectar não o organismo em si, e sim, os anticorpos reativos (Rikihisa et al., 1991; Egenvall et al., 1997; Harrus et al., 1997; 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 falsamente 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 (Rikihisa et al., 1991; 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 et al., 1991; Cohn et al., 2003; Maggi et al., 2006).

Os mais comumente utilizados são os de imunofluorescência indireta (IFA), para a qual os títulos são considerados positivos a partir de 1:40, e testes 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 (Rikihisa et al., 1991; Egenvall et al., 1997; Harrus et al., 1997; Egenvall et al., 1998; Cohn et al., 2003; Eddlestone et al., 2006; Maggi et al., 2006;).

3.3 Diagnóstico molecular

Reação da Polimerase em Cadeia (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 (selecionam regiões comuns a todos os organismos incluídos no mesmo gênero) ou primers específicos (selecionam regiões específicas do DNA de um único organismo). A combinação desses primers, utilizando-se primeiramente o primer geral, a fim de pré-selecionar as amostras positivas para quaisquer parasitas pertencentes ao mesmo gênero, e a seguir utilizar primers específicos para a espécie que se procura, é prática bastante freqüente no diagnóstico de hemoparasitoses (Egenvall et al., 2000; Inokuma et al., 2003; Martin et al., 2004; Maggi et al., 2006; Kim 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., 2004).

Resultados de PCR podem ser negativos para amostras de sangue devido à retirada de células contaminadas da circulação (clearance), sem, no entanto, debelar a infecção (Eddlestone et al., 2006).

Eddlestone e colaboradores (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 sp.* foram detectados por períodos superiores a seis meses utilizando primers específicos, além disso, amostras permaneceram como positivas, mesmo quando eram consideradas negativas pelo esfregaço sangüíneo ou pelas condições dos pacientes (Egenvall et al., 2000).

A utilização de PCR direto e nested 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) são utilizados com bastante frequência (Inokuma et al., 2003; Eddlestone et al., 2006; Maggi et al., 2006; Kim et al., 2006). As práticas de biologia molecular aperfeiçoam-se rapidamente, com desenvolvimento de primers mais específicos, como é o caso do utilizado para detecção do gene responsável pela codificação da enzima citrato sintetase (gltA) do gênero *Anaplasma* (Inokuma et al., 2002; Inokuma et al., 2005), além de aumentarem a sensibilidade, reduzindo o número de falsos positivos (Martin et al., 2004).

4. TRATAMENTO

Antibióticos do grupamento das tetraciclinas tem sido o tratamento de escolha para infecções por erliquias por vários anos (Cohn et al., 2003).

Por sua excelente absorção doxiciclina e minociclina têm sido as drogas mais frequentemente utilizadas (Egenvall et al., 1997; Cohn et al., 2003).

Embora a maior parte dos estudos seja direcionada para *E. canis* a doxiciclina tem se mostrado extremamente eficaz para outras espécies responsáveis por infecção (Egenvall et al., 1997; Cohn et al., 2003).

Além da antibioticoterapia, tratamentos de suporte devem ser adotados à medida que se fizerem necessários, principalmente em infecções que ameaçam a vida do paciente (Cohn et al., 2003).

Acredita-se que curtos tratamentos com doxiciclina sejam capazes de negatar PCR de amostras sanguíneas, eliminando completamente os agentes causadores da infecção (Beaufils et al., 2002).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os agentes riquetsiais são parasitas intracelulares obrigatórios que podem ocasionar doença em humanos e animais e são transmitidos por vetores, mais comumente carrapatos (Aguirre et al., 2004).

A doença possui apresentações bastante variadas o que, frequentemente, pode dificultar o diagnóstico (Aguirre et al., 2004).

Ensaio sorológico de diagnóstico apresentam desvantagens por não distinguirem reações cruzadas entre os diferentes gêneros de *Ehrlichia*, além de dependerem do título de anticorpos presentes no momento do teste (Aguirre et al., 2004).

Além disso, a localização intracelular desses microorganismos dificulta a atuação do sistema imune e a eficácia de terapias convencionais. Além disso, Riquetsias, de uma forma geral, exigem condições muito específicas para crescimento em meios de cultivo, dificultando seu isolamento (Dawson et al., 1991; Rikihisa et al., 1991; Suksawat et al., 2000; Maggi et al., 2006).

Ensaio de PCR são formas rápidas e sensíveis de se realizar o diagnóstico de diversas enfermidades, dentre elas as infecções por agentes riquetsiais como é o caso das Erliquias, com a vantagem de ser extremamente específico (McBride et al., 1996).

O teste diagnóstico clinicamente mais confiável para diagnóstico de erliquioses é através de técnicas sorológicas como IFA. Entretanto, testes sorológicos têm desvantagens: anticorpos IgG não são detectados antes de uma a três semanas pós infecção e reações cruzadas podem ocorrer entre as espécies de *Ehrlichia*. As técnicas de biologia molecular superaram o desempenho dos testes sorológicos, sendo amplamente utilizadas (McBride et al., 1996; McBride et al., 2001; Inokuma et al., 2005).

Há evidências de erliquiose em quase todas as espécies, inclusive humana (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.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGUIRRE, E., SAINZ, A., DUNNER, S., AMUSATEGUI, I., LÓPEZ, L., RODRÍGUES-FRANCO, F., LUACES, I., CORTÉS., O., TESOURO, M. A. First Isolation and Molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. Veterinary Parasitology, v. 125, p. 365-372, 2004.

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

ARRAGA-ALVARADO, C., PALMAR, M., PARRA, O., SALAS, P. *Ehrlichia platys (Anaplasma platys)* in Dogs from Maracaibo, Venezuela: An Ultrastructural Study of Experimental and Natural Infections. Vet. Pathol., v. 40, p. 149-156, 2003.

BEAUFILS, J.P., INOKUMA, H., MARTIN-GRANEL, J., JUMELLE, PH., BARBAULT-JUMELLE, 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.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. Vet. Clin. Small Anim. V. 33, p. 863-884, 2003.

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.

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.

ENGENVALL, A., BJÖERSDORFF, A., LILLIEHÖÖK, I., ENGVALL, E. O., KARLSTAM, E., ARTUSSON, K., HEADAMMAR, 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.

ENGENVALL, 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.

HARRUS, S., AROCH, I., LAVY, E., BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Veterinary Record*, n. 141, p. 247-250, 1997.

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

HOLLAND, C.J., RISTIC, M., HUXSOLL, D.L., COLE, A.I., RAPMUND, G. Adaptation of *Ehrlichia sennetsu* to Canine Blood Monocytes: Preliminary Structural and Serological Studies With Cell Culture-Derived *Ehrlichia sennetsu*. *Infection and Immunity*, p. 366-371, May, 1985.

HUANG, H., UNVER, A., PEREZ, M.J., ORELLANA, N.G., RIKIHISA, Y. Prevalence and Molecular Analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 211-216, 2005.

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.

INOKUMA, A., FUJII, K., MATSUMOTO, K., OKUDA, M., NAKAGOME, K., KOSUGI, R., HIRAKAWA, M., ONISHI, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Veterinary Parasitology*, n.110, p. 145–152, 2002.

INOKUMA, H., FUJII, K., OKUDA, M., ONISHI, T., BEAUFILS, J., RAOULT, D., BROUQUI, P. Detection of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon *groESL* and Citrate Synthase Gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, p. 1132-1136, Sept, 2002.

INOKUMA, H., BEPPUA, T., OKUDA, M., SHIMADA, Y., SAKATA, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. *Veterinary Parasitology*, n. 115, p. 343-348, 2003.

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.

KIM, C., YI, Y., YU, D., LEE, M., CHO, M., DESAI, A.R., SMRITI, S., KLEIN, T.A., KIM, H., SONG, J., BEAK, L., CHONG, S., O'GUINN, M.L., LEE, J.S., LEE, I., PARK, J., FOLEY, J., CHAE, J. Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Tick and Small Mammals in Korea. Applied and Environmental Microbiology. P. 5766-5776, Sept, 2006.

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.

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 (2005) 176–180

MCBRIDE, J. W., CORSTVET R. E., GAUNT, S. D., CHINSANGARAM, J., AKITA, G.Y., OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. Vet Diagn Invest, v. 8, p. 441-447, 1996.

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.

MOREIRA, S.M., BASTOS, C.V., ARAÚJO, R.B., SANTOS, M., PASSOS, L.M.F. Retrospective study (1998-2001) in canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 55, n. 2, p. 141-147, Belo Horizonte, apr, 2003.

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

PUSTERLA, N., LUTZ, H., BRAUN, U. Experimental infection of four horses with *Ehrlichia phagocytophila*. *Veterinary Record*, v. 143, p. 303-305, 1998.

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.

RIKIHISA, Y., EWING, S.A., FOX, C., SIREGAR, A.G., PASARIBU, F.H., MALOLE, M.B. Analyses of *Ehrlichia canis* and a Canine Granulocytic *Ehrlichia* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 143-148, 1992.

ROMERO-GUZMÁN, L.T., LÓPEZ-KARPOVITCH, X., PAREDES, R., BARRALES-BENITEZ, O., PIEDRAS, J. Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica*, v. 85, p. 627-631, 2000.

TATE, C.M. MEAD, D.G., LUTTRELL, M.P., HOWERTH, E.W., DUGAN, V.G., MUNDERLOH, U.G., DAVIDSON, W.R. Experimental Infection of White-Tailed Deer with *Anaplasma phagocytophilum*, Etiologic Agent of Human Granulocytic Anaplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 3595-3601, Aug, 2005.

