

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

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE COLORAÇÃO PANÓTICO RÁPIDO E GIEMSA PARA O DIAGNÓSTICO DE PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO *Babesia* (Starcovici, 1893) E DE RIQUÉTSIAS DO GÊNERO *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) EM CÃES (*Canis familiaris*) NO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL.

ADRIANA TARNOWSKI OLICHESKI

PORTO ALEGRE

2003

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

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE COLORAÇÃO PANÓTICO RÁPIDO E GIEMSA PARA O DIAGNÓSTICO DE PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO *Babesia* (Starcovici, 1893) E DE RIQUÉTSIAS DO GÊNERO *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) EM CÃES (*Canis familiaris*) NO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL.

ADRIANA TARNOWSKI OLICHESKI

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na Área de Doenças Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araújo.

PORTO ALEGRE

2003

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que me têm dado, por me guiar e orientar em todos os passos de minha vida.

Aos meus pais por me ajudarem em todos os momentos que preciso, de todas as formas possíveis.

Ao meu irmão Alex, por me ajudar no que mais sabe fazer, com seus conhecimentos de informática.

À Elisângela, à Patrícia e a minha mãe (novamente) por toda ajuda prestada e por compreenderem a minha ausência.

À colega Márcia Cordeiro por ter aceitado colaborar com amostras do laboratório Petlab.

Aos professores Marquinhos, Verinha e Mary Jane por serem excelentes pessoas e profissionais dispostos a ajudar.

Ao colega e amigo Reginaldo, por ter me amparado e ensinado os primeiros passos no Laboratório de Protozoologia.

Às colegas Cristina, Ana Cláudia, Karla, Rochana e Amanda pela companhia indispensável no Laboratório de Protozoologia e nos almoços.

À colega Karen por ser uma pessoa tão especial e marcante no dia-a-dia.

À colega Cristiane Beck pelo apoio, dedicação e companhia que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araújo pela confiança, paciência e orientação.

Ao meu namorado Marco Henrique, pela paciência, compreensão e companhia, e por toda a dedicação e apoio prestados para a realização deste trabalho.

A todas às pessoas que acreditam que o conhecimento e o aperfeiçoamento são essenciais a nossa vida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
<i>ABSTRACT</i>	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Objetivos	12
1.1.1 Gerais	12
1.1.2 Específicos	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Babesia</i> spp	13
2.1.1 Etiologia	13
2.1.2 Sistemática	14
2.1.3 Morfologia e Ciclo Evolutivo	14
2.1.4 Transmissão	15
2.1.5 Distribuição Geográfica	16
2.1.6 Patogenia	17
2.1.7 Aspectos Clínicos	20
2.1.8 Achados laboratoriais	22
2.1.9 Diagnóstico	24
2.1.10 Tratamento	26
2.1.11 Imunidade e Prevenção	28
2.1.12 Babesiose em Humanos	30

2.2 Ehrlichia spp	32
2.2.1 Etiologia.....	32
2.2.2 Sistemática	33
2.2.3 Transmissão.....	33
2.2.4 Distribuição Geográfica.....	34
2.2.5 Morfologia e Ciclo Evolutivo.....	35
2.2.6 Patogenia	36
2.2.7 Aspectos Clínicos	38
2.2.7.1 Fase Aguda.....	38
2.2.7.2 Fase Subclínica.....	40
2.2.7.3 Fase Crônica.....	43
2.2.8 Achados anátomo-patológicos.....	44
2.2.9 Imunologia	45
2.2.10 Diagnóstico.....	46
2.2.10.1 Exames de esfregaço sanguíneo.....	47
2.2.10.2 Punção de Medula Óssea.....	48
2.2.10.3 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	49
2.2.10.4 <i>Western-Immunoblotting</i>	50
2.2.10.5 <i>Kits</i> de Diagnóstico.....	51
2.2.10.6 Reação em Cadeia da Polimerase.....	51
2.2.10.7 Reisolamento da <i>E. canis</i>	52
2.2.11 Tratamento.....	53
2.2.12 Prevenção.....	55

2.2.13 Erliquiose em Humanos.....	56
3 MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1 Amostras.....	59
3.2 Técnicas de Coloração.....	60
3.2.1 Método de Giemsa.....	60
3.2.2 Panótico Rápido	60
3.3 Análise Estatística	61
4 RESULTADOS	62
4.1 Pesquisa de Hemocitozoários.....	62
4.2 Pesquisa de <i>Babesia</i> spp.....	64
4.3 Pesquisa de <i>Ehrlichia</i> spp.....	68
4.4 Técnicas de Coloração.....	71
4.4.1 <i>Babesia</i> spp.....	71
4.4.2 <i>Ehrlichia</i> spp.....	72
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Frequência de hemocitozoários em caninos, conforme a faixa etária, na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil.....62
- TABELA 2 – Resultados da pesquisa de hemocitozoários em caninos, na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, de acordo com o gênero,...63
- TABELA 3 – Resultados da pesquisa de *Babesia* spp, de acordo com a faixa etária, em caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.....65
- TABELA 4 – Resultados da pesquisa de *Babesia* spp, conforme o gênero, em caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.....67
- TABELA 5 – Resultados da análise de esfregaços sanguíneos para *Ehrlichia* spp, de acordo com a faixa etária, de caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.....69
- TABELA 6 – Resultados da análise de esfregaços sanguíneos de caninos para *Ehrlichia* spp, conforme o gênero, em Porto Alegre, RS, Brasil.....70
- TABELA 7 – Comparação dos resultados da pesquisa de *Babesia* spp, com as colorações Giemsa e Panótico Rápido, em esfregaços sanguíneos de caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.....71
- TABELA 8 – Comparação dos resultados da pesquisa de *Ehrlichia* spp, com as colorações Giemsa e Panótico Rápido, em esfregaços sanguíneos de caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.....72

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Resultados das análises laboratoriais de esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemocitozoários, conforme a faixa etária.....63
- FIGURA 2 – Resultados das amostras de esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemocitozoários, em caninos, de acordo com o gênero.....64
- FIGURA 3 – Lâmina positiva para *Babesia* spp, corada pelo método de Giemsa (aumento de 1000x).....65
- FIGURA 4 – Frequência absoluta de *Babesia* spp em esfregaços sanguíneos de caninos, de acordo com a faixa etária.....66
- FIGURA 5 – Frequência absoluta de *Babesia* spp em esfregaços sanguíneos de caninos, conforme o gênero.....67
- FIGURA 6 – Lâmina positiva de *Ehrlichia* spp, corada com o *kit* Panótico Rápido (aumento de 1000x).....68
- FIGURA 7 – Resultados da pesquisa de *Ehrlichia* spp em esfregaços sanguíneos de caninos, de acordo com a faixa etária.....69
- FIGURA 8 – Resultados da pesquisa de esfregaços sanguíneos para pesquisa de *Ehrlichia* spp, em caninos de acordo com o gênero.....70

RESUMO

O trabalho realizado determinou a frequência dos gêneros *Babesia* e *Ehrlichia*, em 250 caninos com suspeita clínica de hemoparasitose, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS), clínicas e hospitais veterinários particulares. Foi analisada a influência da faixa etária e do gênero dos animais na positividade, assim como comparadas as colorações de Giemsa e Panótico Rápido. A pesquisa dos parasitas no sangue de caninos foi realizada através de esfregaços sangüíneos corados pelos métodos Giemsa e Panótico Rápido. Das 250 amostras analisadas, 45 (18%) foram positivas para hemoparasitas, sendo que 7 (3%) eram animais com idade igual ou inferior a 1 ano (grupo I) e 38 (15%) animais a partir de 1 ano de idade (grupo II). O Teste Exato de Fisher aplicado aos dados revelou não haver diferença significativa entre os resultados encontrados nos animais do grupo I e do grupo II. A *Odds ratio* calculada para os dois grupos foi igual a 2,142. Os resultados obtidos através da metodologia proposta em função do gênero dos 250 animais pesquisados, envolveram 144 fêmeas, sendo 29 positivas e 106 machos, sendo 16 positivos. O Teste Exato de Fisher aplicado aos dados revelou também não haver diferença significativa entre os resultados encontrados entre machos e fêmeas de todas as idades. A *Odds ratio* calculada a partir dos dados encontrados foi igual a 0,7050. Em relação aos resultados obtidos com as colorações utilizadas, das 250 amostras analisadas, 26 amostras foram positivas com o kit Panótico Rápido, sendo 19 (7,6%) positivas para *Ehrlichia* spp e 7 (2,8%) para *Babesia* spp. Com a coloração de Giemsa, obteve-se 22 amostras positivas: 21 (8,4%) para *Babesia* spp e 1 (0,4%) para *Ehrlichia* spp. Apenas 3 amostras (1,2%) apresentaram-se positivas para *Babesia* spp nas duas colorações e nenhuma amostra foi positiva para *Ehrlichia* spp com as duas colorações. O teste de Mc Nemar aplicado a estes dados revelou que houve diferença significativa em relação às amostras positivas para *Babesia* spp pela coloração de Giemsa e pelo Panótico Rápido. A porcentagem de co-positividade e co-negatividade para as duas colorações foi de 14,3% e 98,2%, respectivamente, perfazendo uma porcentagem de concordância total de 91,2%, enquanto o valor Kappa calculado foi de 0,18. O teste de Mc Nemar apresentou uma diferença extremamente significativa nos esfregaços de animais positivos para *Ehrlichia* spp com as duas colorações utilizadas. A porcentagem de co-positividade e co-negatividade para as duas colorações foi de 0% e 92,3%, respectivamente, perfazendo uma porcentagem de concordância total de 92%, enquanto o valor Kappa calculado foi de 0 (zero). Com base nesses resultados, pode-se concluir que 18% dos animais analisados foram positivos para os hemoparasitos *Babesia* ou *Ehrlichia* e que tanto a variável gênero quanto a idade não apresentaram associação com a positividade. Além disso, o corante de Giemsa mostrou-se mais eficiente para o diagnóstico de babesiose canina, enquanto o kit Panótico Rápido foi mais eficiente para a detecção de erliquiose canina.

ABSTRACT

The realized work determined the frequency of Babesia and Ehrlichia in 250 canines conducted to the Veterinary Clinic Hospital of Rio Grande do Sul Federal University (HCV-UFRGS) and from private veterinarian clinics and hospitals. It was analysed the influence of the age and the sex variables in positivity, and compared Giemsa and Panótico Rápido stains. The investigation of canine blood parasites was realized through blood smears stained by Giemsa and Panótico Rápido. From the 250 analyzed samples, 45 (18%) were positives for hemoparasites, of which 7 (3%) were 1 year old and up to 1 year old animals (group I) and 38 (15%) were animals over 1 year old (group II). The Fisher's Exact Test applied to these data didn't detect a significant difference of the results found out in the group I and the group II. The Odds ratio calculated for the two groups was 2,142. The results obtained from the proposed methodology about the sex of the 250 researched animals, 144 were female dogs of which 29 were positive and 106 were male dogs of which 16 were positive. The Fisher's Exact Test applied to these data didn't detect a significant difference between the results found out in the female and male animals of both age's group. The Odds ratio calculated upon those data was 0,7050. Regarding the obtained results from used stains, from 250 searched samples, 26 were positive using Panótico Rápido kit, of which 19 (7,6%) Ehrlichia spp positive and 7 (2,8%) Babesia spp positive. Using Giemsa's stain, 22 samples were positive: 21 (8,4%) Babesia spp positive and 1 (0,4%) Ehrlichia spp positive. Only 3 patterns were Babesia spp positive on both stains and none Ehrlichia spp on both stains. McNemar's test applied to Babesia spp positive patterns data showed a significative difference by Giemsa and Panótico Rápido stains. The percentage of co-positiveness and co-negativeness for both stains was 14,3% and 98,2%, respectively. The total agreement percentage was 91,2%, while the Kappa calculated was 0,18. McNemar's test applied to Ehrlichia spp positive patterns data showed a high significative difference on both stains. The percentage of co-positiveness and co-negativeness for both stains was 0% and 92,3%, respectively. The total agreement percentage was 92,3%, while the Kappa calculated was 0 (zero). Based on those results, we can conclude that 18% of the analyzed dogs showed positive results for the hemoparasites Babesia spp or Ehrlichia spp and the sex and the age variables did not have any association to the positive results. Besides, Giemsa stain is more efficient for canine babesiosis diagnostic, while the kit Panótico Rápido is more efficient for canine erliquiosis detection.

1 INTRODUÇÃO

A babesiose e a erliquiose são moléstias causadas por parasitas intracelulares obrigatórios, sendo seus agentes etiológicos a *Babesia* spp e a *Ehrlichia* spp, respectivamente. Ambas podem infectar animais domésticos, silvestres e também humanos. A importância epidemiológica destas hemoparasitoses reside no fato de serem transmitidas principalmente por carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, que é o mais comum em caninos do meio urbano no Brasil. Além disso, infecções concomitantes por esses dois protozoários podem ocorrer, agravando o quadro clínico dos animais (BREITSCHWERDT, 1997).

A prevalência e a distribuição geográfica destas enfermidades estão relacionadas diretamente com a distribuição do carrapato vetor, ocorrendo em praticamente todo o globo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (ANDEREG & PASSOS, 1999). A erliquiose canina é uma importante doença infecciosa cuja prevalência tem aumentado significativamente em várias regiões do Brasil (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001). Segundo Andereg & Passos (1999), a infecção por este parasita, por muito tempo, foi considerada espécie específica. Porém, recentemente esse conceito foi mudado, uma vez que espécies de *Ehrlichia* têm sido diagnosticadas em hospedeiros não específicos.

Já a babesiose canina é uma doença febril e hemolítica caracterizada pela infecção dos eritrócitos circulantes (TABOADA, 1998), sendo considerada endêmica no Brasil (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

Atualmente esses dois hemoparasitas são considerados causadores de zoonoses, sendo, portanto, de essencial importância o estudo e o controle tanto de *Babesia* spp, como de *Ehrlichia* spp.

O presente trabalho visou dar uma contribuição para o diagnóstico laboratorial destas duas hemoparasitoses através da comparação entre dois métodos de coloração distintos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Gerais:

- Comparar os métodos de coloração Giemsa e Panótico Rápido para detecção dos gêneros *Babesia* e *Ehrlichia* em esfregaços sangüíneos de caninos com suspeita clínica de hemoparasitose, contribuindo para um melhor conhecimento e adequação do diagnóstico da babesiose e erliquiose caninas.

1.1.2 Específicos:

- Estimar a frequência de animais positivos para *Babesia* spp e *Ehrlichia* spp através de esfregaços sangüíneos de caninos atendidos no HCV-UFRGS ou consultórios, clínicas e hospitais veterinários que enviaram amostras ao laboratório de análises clínicas PETLAB, no município de Porto Alegre, RS;
- Analisar a influência da faixa etária e do gênero dos animais na positividade para *Babesia* spp e *Ehrlichia* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Babesia* spp

2.1.1 Etiologia

O protozoário *Babesia*, segundo Mahoney (1977), foi observado pela primeira vez por Babes, em 1888, na Romênia, no sangue de bovinos com hemoglobinúria, classificando-os como sendo o gênero *Haematococcus*. Em 1893, Smith & Kilborne demonstraram a transmissão da *Babesia bigemina* pelo carrapato, a qual era a causadora da “Febre do Texas”, uma doença aguda febril do gado que ocorria nos Estados Unidos. O descobrimento da transmissão da *Babesia* spp por carrapatos foi muito importante, pois foi o primeiro protozoário patogênico conhecido transmitido por um vetor artrópode (MAHONEY, 1977; SOULSBY, 1968). O envolvimento de um artrópode na transmissão de doenças introduziu um novo conceito na epidemiologia, e foi o que abriu caminhos para o controle eficaz tanto em animais quanto em humanos (LEVINE, 1985).

Em 1893, Starcovici propôs o gênero *Babesia* que inclui várias espécies, sendo que em 1930 a *Babesia* spp já havia sido descrita em todas as espécies domésticas, com uma distribuição mundial e tendo o carrapato como único vetor (MAHONEY, 1977). No Brasil, Fajardo, em 1901, verificou pela primeira vez a presença de *Babesia* spp ao examinar sangue de bovinos recentemente importados (BELLATO, 1985).

Vários sinônimos para este protozoário, que apareceram na literatura, geraram certa polêmica. Entre eles: *Piroplasma*, *Achromaticus*, *Nicolli*, *Nuttallia*, *Smithia*, *Rossiella*, *Rangelia*, *Microbabesia*, *Francaiella*, *Luhsia*, *Sogdianmella*, *Pattonell* (MAHONEY, 1977; LEVINE, 1985), *Babesiella*, *Entopolypoides* e *Gonderia* (LEVINE, 1985).

2.1.2 Sistemática

Segundo Levine *et al.* (1980), o gênero *Babesia* tem a seguinte classificação:

Filo: APICOMPLEXA

Classe: SPOROZOEA

Ordem: PIROPLASMIDA

Família: BABESIIDAE

Gênero: *Babesia*

Atualmente são conhecidas 71 espécies, sendo que 18 causam doença em mamíferos domésticos (OZAKI, 1996). A *B. canis* e a *B. gibsoni* são as espécies que afetam os cães (TABOADA & MERCHANT, 1997) e a *B. microti*, *B. bovis* e *B. divergens* são as de maior importância para humanos (CASTRO & MINKOVES, 1999).

2.1.3 Morfologia e Ciclo Evolutivo

Em condições naturais, a *Babesia* spp é transmitida por carrapatos, nos quais a infecção transovariana assegura a transmissão por estágios da geração seguinte de carrapatos, podendo ser pelo estágio de larva, ninfa ou adulto. Quando a infecção persiste de um estágio ao seguinte, em carrapatos que se alimentam em hospedeiros diferentes, diz-se que a transmissão é transestadial (URQUHART *et al.*, 1998). A capacidade de transmissão transestadial e transovariana do agente permite a sua perpetuação, tornando o carrapato infectante por várias gerações (TABOADA, 1998).

Durante o repasto sanguíneo no cão, o carrapato transmite a *Babesia* spp por meio da saliva infectante, sendo necessário um período médio de 3 dias para que isso ocorra. Um a dois dias após a inoculação do agente, ocorre no hospedeiro canino a parasitemia inicial com cerca de 4 dias de duração, havendo pico 10 a 14 dias depois. Uma vez no hospedeiro, os protozoários aderem à membrana eritrocitária e, por endocitose penetram na célula, iniciando o processo de multiplicação por divisão binária sucessiva, resultando na formação de merozoítos que podem ser observados em pares de 1 a 8 intra-eritrocitariamente (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). De acordo com Neves (2000), os parasitas podem ser

encontrados isolados, aos pares ou em infecção múltipla, com formato arredondado, piriforme, elíptico, em cruz ou irregular, dentro das células vermelhas. Na saída do parasita o eritrócito pode ou não sofrer lise (BELLATO, 1985).

De acordo com Mahoney (1977), o primeiro estudo sobre o desenvolvimento da *Babesia* spp nos carrapatos foi realizado por Koch em 1906, sendo despertada especial atenção dos parasitologistas nos anos seguintes (SOULSBY, 1968).

O ciclo no invertebrado tem início quando o carrapato ingere várias formas do parasita presentes nas hemácias de um hospedeiro infectado, mas somente algumas, os gametas, são capazes de evoluir no seu organismo (NEVES, 2000). No carrapato, os gametas evoluem, tornam-se maduros e ocorre a fecundação, dando origem a um oocisto que se transforma em esporocisto. O esporocisto migra, então, para os tecidos do carrapato e atingem todos os seus órgãos, inclusive ovários e glândulas salivares, transformando-se em esporozoítos. Nos ovários podem penetrar nos ovos, originando larvas infectadas, que são transmitidas para a próxima geração de carrapatos, ocorrendo a transmissão transovariana. Nas glândulas salivares, com os esporocistos transformados em esporozoítos, as formas infectantes poderão ser transmitidas aos hospedeiros vertebrados por ocasião da picada do carrapato (CASTRO & MINKOVES, 1999). O processo todo leva cerca de 7 dias (URQUHART *et al.*, 1998).

Uma vez que a transmissão deste protozoário pode ocorrer em qualquer fase do ciclo do carrapato, o hospedeiro vertebrado não parece ser essencial para a manutenção deste parasita na população de carrapatos. Esquizontes foram observados nos ovários de adultos imaturos antes da infecção ser detectável no sangue do hospedeiro, concluindo-se que esses provavelmente poderiam infectar a próxima geração de carrapatos (SOULSBY, 1968).

2.1.4 Transmissão

Os vetores da babesiose canina são carrapatos da família Ixodidae (MAHONEY, 1977). Sendo que os principais vetores na transmissão da *Babesia canis* são carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato vermelho do cão, que se caracteriza por

hábitos nidícolas e está bastante adaptada aos domicílios localizados em cidades. Outras espécies de carrapato, como *Dermacentor* spp, *Hyalomma plumbeum* e *Haemaphysalis leachi*, também podem transmitir o agente (LABRUNA & PEREIRA, 2001). Segundo Ribeiro *et al.* (1997), na cidade de Porto Alegre, RS, o *R. sanguineus* estava presente em 48,8% de 450 cães de rua estudados, enquanto 1,5% apresentava infestação por *Amblyomma aureolatum*. Neste estudo os cães eram, na sua grande maioria, de áreas urbanas, o que justifica o predomínio de *R. sanguineus*. No entanto, alguns poucos cães foram capturados em áreas periféricas ou suburbanas, associando este fato ao encontro do gênero *Amblyomma*.

Segundo Bounous *et al.* (1993), a *B. gibsoni* foi identificada nos esfregaços sanguíneos de uma cadela e seus filhotes com 3 dias de idade, sugerindo a ocorrência da transmissão transplacentária.

2.1.5 Distribuição Geográfica

De acordo com Brandão & Hagiwara (2002), a babesiose canina é uma doença endêmica no Brasil. O comportamento epidemiológico é dependente de fatores como a virulência da cepa e o estado imunitário do hospedeiro, o que influencia nas prevalências encontradas em diferentes populações (CARDOSO & SERRA-FREIRE, 2000).

A prevalência da babesiose canina nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre está relacionada à distribuição geográfica dos carrapatos vetores, que se infectam após a ingestão de eritrócitos de caninos parasitados pelo hematozoário (MAHONEY, 1977).

A *Babesia canis* é mais frequentemente encontrada nos países tropicais, incluindo o Brasil, e a *Babesia gibsoni* é encontrada principalmente na África e Ásia e, de forma endêmica, no sudoeste dos Estados Unidos, onde a prevalência da infecção por *Babesia* spp variou de 3,8 a 59%. Essa prevalência parece ser elevada, pelo menos em algumas populações de cães; entretanto, a incidência da moléstia clínica é baixa (TABOADA & MERCHANT, 1997).

Com base em estudos sorológicos, bem como nas diferenças de patogenicidade e espécie do vetor transmissor, um sistema de nomenclatura trinominal para *Babesia canis* foi proposto. *Babesia canis canis* é a cepa de patogenicidade intermediária, encontrada na Europa e em partes do continente asiático, sendo transmitida por carrapatos do gênero *Dermacentor*. A cepa mais patogênica, encontrada no sudeste asiático e transmitida por *Haemaphysalis leachi*, é a *Babesia canis rossi*. Enquanto a *Babesia canis vogeli* é a menos patogênica, transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus* e encontrada nas regiões tropicais e subtropicais da maior parte dos continentes, incluindo os Estados Unidos da América e o continente sul-americano (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

De acordo com Acha & Szyfres (1977) a infecção pode ser transmitida acidentalmente ao homem. Casos de babesiose humana têm sido comprovados em Massachusetts, Nova Iorque, Maryland, Virgínia, Califórnia, Wisconsin, Minnesota e Washington. Na América Central existem casos constatados no México, enquanto que na Europa há notificação da doença na Rússia, França, Escócia e Irlanda (CASTRO & MINKOVES, 1999).

2.1.6 Patogenia

De acordo com Mahoney (1977), a destruição do eritrócito ocorre paralelamente à multiplicação do parasita no sangue, apesar da infecção por *B. canis* ser exceção, pois o animal continua perdendo células vermelhas após o declínio da parasitemia. A parasitemia, que geralmente é detectável assim que se manifesta a sintomatologia clínica, pode envolver de 0,2 a 45% dos eritrócitos, dependendo da espécie de *Babesia* (URQUHART *et al.*, 1998). Variações da patogenicidade entre as diferentes cepas de *B. canis* contribuem para as diferenças na severidade das manifestações clínicas que são observadas (TABOADA, 1998).

A *B. canis canis* causa uma parasitemia transitória, geralmente abaixo de 1%, associada à congestão dos órgãos e está correlacionada com efeitos no sistema de

coagulação. Enquanto a *B. canis rossi* induz a uma alta parasitemia periférica (SCHETTERS *et al.*, 1997a).

A babesiose é uma doença altamente patogênica na maioria dos hospedeiros. Pode ocorrer anemia severa e a destruição dos eritrócitos ser acompanhada de hemoglobinúria (LEVINE, 1985). Em 2002, Hannemann *et al.* descreveram um caso de nefrotoxicidade induzida por hemoglobinúria em um cão com babesiose, fato raramente descrito na literatura veterinária. A *Babesia* ao afetar cães jovens, induz uma parasitemia que causa hemólise tanto intra como extravascular. No início da doença, ela é caracterizada predominantemente por hemólise intravascular, resultando em anemia regenerativa sem supressão da eritropoiese. A anemia hemolítica geralmente corresponde ao aumento da parasitemia, principalmente durante o primeiro mês da infecção (BOUNOUS *et al.*, 1993). Entretanto, segundo Schetters *et al.* (1998), a infecção por *B. canis* é caracterizada por anemia não hemolítica e baixa parasitemia durante a fase aguda da doença.

A esplenomegalia é decorrente da hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear do órgão e da dilatação de sua microvasculatura interna em resposta à liberação sistêmica de mediadores inflamatórios. A hipóxia anêmica decorrente da intensa crise hemolítica pode levar ao incremento do metabolismo anaeróbico, com acidose metabólica e dissociação da curva de hemoglobina para a direita, aumento da fração de carboxihemoglobina e redução da oxigenação tecidual. A fase final do processo de degeneração é conhecida como síndrome da disfunção múltipla de órgãos, e é consequência do irreversível comprometimento orgânico provocado por hipovolemia, choque endotóxico, infecções sistêmicas (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

A hipovolemia, presente em processos hemolíticos graves, advém da ação sistêmica de mediadores inflamatórios produzidos na lise das hemácias, que causam vasodilatação periférica e hipotensão. Também o óxido nítrico (um radical do nitrogênio formado pela conversão enzimática da arginina em citrulina) tem participação no desenvolvimento de quadros hipotensivos na babesiose canina complicada. O óxido nítrico, envolvido em mecanismos de destruição de organismos, imunossupressão e neurotransmissão, quando liberado em grandes quantidades por neutrófilos, macrófagos ou pelo endotélio vascular, induz intensa vasodilatação periférica e consequente hipotensão, com deterioração rápida da homeostase orgânica que pode levar à morte. A hipotensão prolongada causa hipóxia de

órgãos e desenvolvimento de distúrbios ácido-básico mistos, dentre os quais a acidose metabólica hiperclorêmica, a acidose metabólica com ânion *gap* elevado, ou ainda a alcalose hipoalbuminêmica, a acidose hiperfosfatêmica e a alcalose respiratória. (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). Portanto, de acordo com Bounous *et al.* (1993), a acidose metabólica e a coagulação intravascular disseminada (CID) podem se desenvolver como complicações da infecção.

A hipotensão causada no hospedeiro vertebrado facilita a interação entre eritrócitos infectados e o tecido endotelial, facilitando assim a determinação do local da infecção. Além disso, a ativação do sistema de coagulação por uma molécula derivada do parasita (associada com a superfície de eritrócitos infectados ou um antígeno solúvel), consolida essa situação por formar tampões celulares. A contínua proliferação de parasitas em tais tampões resulta em capilares muito parasitados (SCHETTERS *et al.*, 1998).

A febre provavelmente decorre da liberação de citocinas pirogênicas endógenas dos eritrócitos, assim como da destruição do parasito e dos eritrócitos pelo sistema fagocítico mononuclear (CARDOSO & SERRA-FREIRE, 2002).

As mucosas podem tornar-se pálidas ou ictéricas. O baço fica significativamente aumentado, tenro, com a polpa vermelha escuro e com corpúsculos proeminentes. O fígado fica aumentado e marron-amarelado. O pulmão pode ficar ligeiramente edemaciado. Pode ocorrer diarreia ou constipação e as fezes ficarem amarelas, exceto em casos muito recentes ou superagudos. Os animais afetados perdem em condição corporal, tornando-se emaciados e frequentemente morrem. Entretanto, os sinais da babesiose podem variar muito do quadro típico (LEVINE, 1985).

A morte é devido à falência do organismo, não sendo apenas devido à destruição dos eritrócitos, resultando em anemia, edema e icterícia, mas também devido à obstrução dos capilares de vários órgãos por células parasitadas e parasitas livres (LEVINE, 1985). Acredita-se que as manifestações neurológicas sejam causadas pela sedimentação dos eritrócitos parasitados no interior dos capilares do sistema nervoso central (URQUHART *et al.*, 1998; TABOADA & MERCHANT, 1997). Pode ocorrer degeneração das células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos, anóxia, acúmulo de produtos metabólicos tóxicos, fragilidade capilar e, eventualmente, perda de eritrócitos e hemorragia

macroscópica. Há uma grande semelhança entre babesiose nos animais domésticos e malária no homem (LEVINE, 1985).

2.1.7 Aspectos Clínicos

A babesiose é uma moléstia que, acometendo diferentes espécies de mamíferos, inclusive a humana, acarreta o desenvolvimento de sintomas como febre, letargia e anemia hemolítica aguda com características regenerativas, na dependência da intensidade da parasitemia promovida pelo protozoário (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

A sintomatologia clínica pode ser moderada ou mesmo inaparente nos animais previamente expostos à infecção, ou infectados por uma espécie de *Babesia* de baixa patogenicidade (URQUHART, 1998). As manifestações clínicas da babesiose canina são classificadas como complicadas e não complicadas na dependência do comprometimento sistêmico do animal, que está diretamente relacionado à intensidade da parasitemia e da hemólise (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

Dentre as manifestações clínicas não complicadas observam-se hemólise de baixa intensidade, geralmente com hematócrito superior a 30%, e desenvolvimento de sintomas clínicos brandos, que não implicam na necessidade de hemoterapia transfusional (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). Na maioria dos casos há febre, mal-estar e apatia. Animais afetados não se alimentam ou se alimentam pouco (LEVINE, 1985).

A maioria dos sinais clínicos observados em cães com babesiose é causada por duas síndromes: uma caracterizada por choque hipotensivo (moléstia hiperaguda) e a outra, por anemia hemolítica (moléstia aguda). A moléstia hiperaguda ocorre apenas com as linhagens mais virulentas, que são raramente encontradas; sendo a moléstia aguda a mais comum. A moléstia hiperaguda caracteriza-se por choque hipotensivo, hipóxia, lesão tecidual extensa e estase vascular. Somente foi documentada em filhotes de cães infectados. Geralmente são observados: choque, coma ou morte, seguidos de menos de um dia de anorexia e letargia. Também pode ser observada hematúria (TABOADA & MERCHANT, 1997).

Os sinais clínicos da doença aguda incluem anemia, trombocitopenia, icterícia, esplenomegalia, hemoglobinúria e febre (PAGE, 1998). De acordo com Brandão & Hagiwara (2002), os sintomas da babesiose canina complicada são decorrentes da intensa crise hemolítica ocasionada pelo parasita e da liberação sistêmica de fatores inflamatórios que levam ao choque hipovolêmico, à insuficiência renal aguda e à coagulação intravascular disseminada.

Podem ocorrer fatalidades, especialmente em cãesinhos, ou em adultos infectados por *B. gibsoni*, mas a maioria dos animais recupera-se. Anorexia, letargia e vômito também são comumente observados. Podem ser notadas hematúria e icterícia, especialmente em cães infectados por *B. canis*, linfadenopatia generalizada e edema periorbitário. O desenvolvimento da anemia hemolítica imunomediada que se mantém a despeito da terapia babesicida específica é comumente relacionado (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

As infecções crônicas caracterizam-se por febre intermitente, diminuição do apetite e depleção considerável do estado físico. Uma grande variedade de sinais clínicos atípicos foi descrita. Ocasionalmente, são observados sinais brandos do trato respiratório superior e dispnéia. Sinais gastrintestinais, como vômito, constipação ou diarreia podem ocorrer (TABOADA & MERCHANT, 1997). Segundo Brandão & Hagiwara (2002), pode ocorrer pancreatite aguda em decorrência da hipoperfusão e hipóxia do órgão ocasionada pela hipotensão sistêmica.

De acordo com Scott *et al.* (1996), além de hemorragias orais, petéquias e equimoses, associadas a trombocitopenia ou a coagulação intravascular disseminada (CID), as lesões cutâneas são raras. Animais que habitam zonas endêmicas podem apresentar sangramento dos pavilhões auriculares, principalmente aqueles sujeitos à picada de insetos, sintoma freqüentemente referido por leigos (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). As lesões relatadas incluem estomatite ulcerativa, urticária, angioedema e necrose das extremidades distais. Nenhum estudo histopatológico foi relatado; portanto, não se sabe se as lesões são o resultado de insuficiência vascular ou lesões por mudanças específicas induzidas pelo parasita (SCOOT *et al.*, 1996). As manifestações vasculares que podem ocorrer são edema, ascite e púrpura (TABOADA & MERCHANT, 1997). Segundo Brandão & Hagiwara (2002), também já foram descritas miosite mastigatória e outras manifestações musculoesqueléticas atípicas, como artrites e lombalgias.

Manifestações neurológicas, como convulsão e ataxia locomotora, sintomas vestibulares ou cerebelares podem ocorrer em filhotes devido à grande concentração de hemácias parasitadas nos capilares do sistema nervoso central, causando hipóxia cerebral (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). A babesiose no cão pode ocorrer juntamente com outros eritroparasitas, como por exemplo, *Ehrlichia canis* e *Haemobartonella canis* (BOUNOUS *et al.*, 1993), contribuindo para a diversidade dos sinais clínicos (TABOADA & MERCHANT, 1997).

Já a babesiose humana é uma doença febril aguda, caracterizada por mialgias, fadiga, anorexia, cefaléia, artralgia, dor abdominal, depressão emocional. A temperatura é alta, por volta dos 40°, podendo ocorrer exantema migratório e desconforto respiratório. Há casos em que se relata hepatoesplenomegalia e petéquias disseminadas (CASTRO & MINKOVES, 1999). Além disso, o quadro clínico pode confundir-se com o da malária (NEVES, 2000).

2.1.8 Achados Laboratoriais

Dentre as alterações laboratoriais mais freqüentes na babesiose canina, a trombocitopenia tem sido descrita por diversos autores, embora sua causa ainda não esteja completamente elucidada (TABOADA & MERCHANT, 1998; BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). A destruição mediada por anticorpos e o consumo acelerado em decorrência de uma vasculite endotelial ou do seqüestro esplênico são os mecanismos mais prováveis, porém ainda são pouco compreendidos. A remissão da trombocitopenia após a instituição de terapia específica pode ser um indicativo precoce da efetividade do tratamento, uma vez que o tempo de maturação da série eritróide é maior, e a recuperação de seus valores também (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

Geralmente observa-se anemia normocítica normocrômica de baixa intensidade nos primeiros dias após a infecção. A anemia pode tornar-se macrocítica, hipocrômica e regenerativa à medida que a moléstia progride. A reticulocitose é proporcional à gravidade da anemia. As anormalidades leucocitárias observadas podem ser: leucocitose por neutrofilia, neutropenia, linfocitose e eosinofilia. Não foram observadas anormalidades

hematológicas em adultos sorologicamente positivos, mas assintomáticos (TABOADA & MERCHANT, 1997). Entretanto, de acordo com Bounous *et al.* (1993), a anemia leve geralmente persiste nos portadores infectados e assintomáticos da babesiose canina.

A presença de macroplaquetas, identificadas na análise citológica do esfregaço sanguíneo, ou determinadas pelo aumento do volume plaquetário médio (VPM), é indicativa de trombopoiese intensa com liberação acelerada de plaquetas jovens na circulação, o que exclui a possibilidade de hipoplasia megacariocítica como responsável pela diminuição do número de plaquetas circulantes, como é freqüente na erliquiose canina crônica (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). As hemácias nucleadas são freqüentemente numerosas nas infecções de longa duração. O hematócrito pode estar abaixo de 10% e a concentração de hemoglobina abaixo de 3,9 g/dL nos estágios terminais da doença (BOUNOUS *et al.*, 1993).

Segundo Brandão & Hagiwara (2002), os resultados dos testes bioquímicos são inespecíficos, podendo ser observada hipocalemia em animais gravemente afetados, em decorrência da diminuição do aporte, aumento da excreção renal, perdas gastrintestinais ou deslocamento para o espaço intracelular. A azotemia e a acidose metabólica são comuns e parecem contribuir para a morbidade e a mortalidade. Ambas são geralmente causadas pela desidratação e/ou choque. A hiperbilirrubinemia é um achado consistente durante a moléstia aguda causada por *Babesia canis*, mas não por *B. gibsoni* (BOUNOUS *et al.*, 1993). As enzimas hepáticas podem estar aumentadas durante a moléstia grave em consequência da hipóxia anêmica do órgão (TABOADA & MERCHANT, 1997).

Na urinálise, podemos observar bilirrubinúria e hemoglobinúria, podendo ser acompanhada de proteinúria, cilindrúria granular e presença de células do epitélio renal, o que pode ser indicativo de lesão renal aguda decorrente da hemoglobinúria ou hipoperfusão do órgão (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

Lesões anatômicas associadas à infecção por *B. gibsoni* incluem hepatite periportal e centrolobular difusa não supurativa, arterite multifocal necrotizante, glomerulonefrite membranoproliferativa, linfadenopatia reativa, eritrofagocitose difusa e hematopoiese extramedular (WOZNIAK *et al.*, 1997).

Em humanos, podem ocorrer anemia, hemoglobinúria, proteinúria, uréia e creatinina discretamente elevadas, sendo também encontrado aumento leve de bilirrubinas totais e frações, desidrogenase láctica (LDH), segundo Castro & Minkoves (1999).

2.1.9 Diagnóstico

O diagnóstico pode ser firmado pela demonstração das babesias no interior de eritrócitos infectados (TABOADA & MERCHANT, 1997) em esfregaços de sangue periférico corados por colorações do tipo Romanowsky, como Giemsa, Wright (BOUNOUS *et al.*, 1993; BRANDÃO & HAGIWARA, 2002), Rosenfeld ou Diff-Quick (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002), durante a fase aguda, que coincide com o pico da parasitemia (NEVES, 2000). A análise do sangue capilar obtido da ponta das orelhas ou dos coxins parece aumentar a oportunidade de evidenciar hemácias parasitadas em virtude de sua deformabilidade – que decorre da peroxidação lipídica da membrana eritrocitária pelo parasita – e conseqüente acúmulo em vasos de menor calibre como capilares e vênulas (TABOADA, 1998).

A análise citológica do esfregaço sanguíneo é imprescindível, pois permite a diferenciação morfológica entre *Babesia canis* – maior, com cerca de 2 a 5 μm , geralmente aos pares – e *B. gibsoni*, medindo 1 a 3 μm . Além disso, essa diferenciação é necessária porque há reação sorológica cruzada entre as duas espécies (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). Parasitemias muito baixas são características da linhagem de *Babesia canis*, mas parasitemias de 5 a 40 % caracterizam a infecção por *B. gibsoni*. Embora algumas vezes seja fácil encontrar o parasito em animais agudamente infectados, eles são raramente evidentes em animais com infecção crônica ou em portadores assintomáticos (TABOADA & MERCHANT, 1997). Bounous *et al.* (1993) também afirmam que, em portadores assintomáticos, a parasitemia geralmente não é detectada, porque poucos organismos estão presentes no sangue periférico ao mesmo tempo. De acordo com Neves (2000) e Acha &

Szyfres (1977), no gênero *Babesia* não há formação de pigmento (hemozoína), o que o diferencia do *Plasmodium falciparum* em humanos.

Na fase subaguda ou crônica, quando a parasitemia é baixa, a doença pode ser diagnosticada por meio de pesquisa de anticorpos utilizando-se provas sorológicas (imunofluorescência indireta, método imunoenzimático – ELISA, e outras) e pela inoculação de sangue em roedores (NEVES, 2000). A reação de imunofluorescência indireta é considerada um método sensível e específico de detectar uma parasitemia oculta ou evidente. Títulos de anticorpos superiores a 40, ou soroconversão após um intervalo de 15 dias, permitem diferenciar animais doentes daqueles nos quais os anticorpos são remanescentes de uma infecção precedente, o que não significa doença ativa. Deste modo, testes sorológicos qualitativos ou semiquantitativos, como os do tipo ELISA (método imunoenzimático), devem ser avaliados com cautela em conjunto com os sintomas clínicos e outros dados laboratoriais relevantes, como a contagem de plaquetas (TABOADA, 1998).

De acordo com Mahoney (1977), o volume celular total, a contagem de células vermelhas e o hematócrito diminuem em 50 %. Entretanto, títulos falso-negativos são comuns em cães com menos de 6 meses de idade ou durante os estágios iniciais da infecção (TABOADA & MERCHANT, 1997). Em humanos, a sorologia por imunofluorescência indireta demonstra que títulos acima de 1:256 devem ser considerados, e acima de 1:1.024 são confirmatórios (CASTRO & MINKOVES, 1999).

O emprego de técnicas de biologia molecular, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), tem sido de grande auxílio na identificação de animais portadores crônicos da doença, ou ainda na avaliação da efetividade da terapia enquanto ainda não houve diminuição dos títulos de anticorpos específicos, uma vez que, embora ainda restrito a centros de pesquisa, permite a detecção de material genético do parasita em praticamente qualquer material biológico (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

O exame da hemolinfa de teleóginas de *Boophilus microplus* tem sido utilizado em levantamentos epidemiológicos para a detecção de vermiculos de *Babesia* spp. A hemolinfa é coletada e depositada uma gota em lâmina que é corada com Giemsa para exame microscópico. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre o período mais adequado para a realização desse exame. Todavia, de acordo com o estudo realizado por Britto *et al.* (2002), o período mais indicado é do 10º ao 12º dia de desprendimento das teleóginas.

2.1.10 Tratamento

O tratamento de cães com babesiose está direcionado para o controle do parasito, moderação da resposta imune e tratamento sintomático. Muitos medicamentos têm sido utilizados no tratamento da infecção por *Babesia* spp. A *B. gibsoni* tem menor resposta à terapia, em comparação à *B. canis*, e também tem menor probabilidade de responder à terapia sintomática (TABOADA & MERCHANT, 1997).

Dentre os diversos tratamentos preconizados, os fármacos mais recomendados são: o aceturato de diminazeno: 3,5 mg/kg, intramuscular (IM) ou subcutâneo (SC) e o dipropionato de imidocarb: 5 a 7 mg/kg, IM ou SC, em duas aplicações com intervalo de 14 dias, segundo Taboada (1998). A solução de azul de tripan a 1%, 10 mg/kg, intravenoso (IV), dose única, foi muito utilizada e não parece ter mais aplicabilidade quando comparada a outros medicamentos (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). Segundo Page (1998), em humanos pode ser usado o isotionato de pentamidina (10 a 15 mg/kg, SC, a cada 12 horas, por 2 dias).

O aceturato de diminazeno interfere com a glicólise aeróbica e a síntese de DNA do parasita, causando dilatação das membranas de organelas intracelulares, dissolução do citoplasma e destruição de seu núcleo. A dose única é efetiva para o tratamento de *Babesia canis*, enquanto, para *Babesia gibsoni*, repete-se a dose após 24 horas. Suspeita-se que possa ocorrer o desenvolvimento de resistência à sua ação, mas isso ainda não está comprovado. Efeitos colaterais podem ser observados, dentre os quais: depressão, estupor, vocalização contínua, opistótono, ataxia, rigidez extensora, nistagmo e convulsões (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

O dipropionato de imidocarb tem efeito direto sobre o parasito, alterando a forma do núcleo e a morfologia citoplasmática. A interrupção da parasitemia e dos sintomas clínicos ocorre de 24 a 48 horas após sua aplicação. São descritos, como efeitos colaterais: dor no local da aplicação, salivação, lacrimejamento e sintomas gastrintestinais, como vômito e diarreia. Para prevenir os efeitos colinérgicos indesejados da droga, pode ser utilizada atropina (0,04 mg/kg) 10 minutos antes de sua aplicação. O dipropionato de imidocarb foi

eficiente na dose de 6 mg/kg, impedindo a infecção experimental de cães por *Babesia canis* durante um período de 15 dias (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

Já as tetraciclina são pouco efetivas, embora sua atividade profilática tenha sido observada em alguns estudos: a administração de oxitetraciclina (20 mg/kg) manteve os cães em um patamar de infecção subclínica, mantendo-os na situação de portadores da infecção. A doxiciclina, com uma dosagem de 5 mg/kg/dia, via oral (VO), durante 11 dias, não permitiu a doença clínica em cães desafiados experimentalmente, mas fez com que os animais apresentassem sinais clínicos moderados e se recuperassem completamente no prazo de uma semana (GUIMARÃES *et al.*, 2002).

Há relatos clínicos de tratamento bem sucedido com clindamicina (25 mg/kg duas vezes ao dia) e azitromicina (5 a 10 mg/kg, VO, de 12 em 12 horas), porém faltam estudos controlados sobre a eficácia destes medicamentos. O uso de sulfato de quinurônio (0,25 mg/kg, SC, a cada 48 horas) demonstrou boa efetividade no tratamento para a *B. canis*, entretanto sua ação é desconhecida para a *B. gibsoni* (TABOADA, 1998).

A terapia imunossupressiva é justificada pela anemia hemolítica e a trombocitopenia provavelmente possuírem componente imunomediado. A resposta imune humoral por IgG e IgM é importante para a patogênese da hemólise. A terapia auxiliar é importante e freqüentemente é tudo o que se faz necessário para a moléstia aguda causada por algumas linhagens de *B. canis*. Fluidos intravenosos devem ser administrados a animais desidratados ou em choque. Deve-se fazer transfusão de sangue integral ou papa de hemácias a pacientes gravemente anêmicos. É importante o tratamento de fatores agravantes como parasitismo intestinal (TABOADA & MERCHANT, 1997).

O tratamento da babesiose humana consiste, além da clindamicina e pentamidina também usadas em animais, do uso de quinina e pirimetamina. O emprego da diálise e da transfusão sanguínea são recomendados para casos mais graves (NEVES, 2000). De acordo com Castro & Minkoves (1999), em paciente com enfermidade severa, a associação de clindamicina (300 a 600 mg IV ou VO, 6/6h ou 20 mg/kg/dia), com quinino (500 mg IV ou VO, 8/8h ou 25 mg/kg/dia) por 7 a 10 dias, parece ser a melhor conduta.

2.1.11 Imunidade e Prevenção

De acordo com Brandão & Hagiwara (2002), durante a infecção, vários componentes do sistema imunológico são responsáveis pela resposta gerada contra o parasita. A hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear esplênico ocorre em decorrência da depuração das hemácias circulantes parasitadas pelos merozoítos, enquanto a resposta humoral atua coibindo a infecção de células ainda não infectadas, impedindo a penetração dos esporozoítos.

No entanto, a resposta imune gerada contra o parasita parece ter uma duração limitada, havendo declínio gradativo dos anticorpos circulantes dentro de um período de 3 a 5 meses, após o qual os animais tornam-se novamente suscetíveis à infecção. O desenvolvimento da resposta imune humoral prolongada e efetiva parece ser um desafio, e motivo de grande preocupação por parte dos criadores que importam bovinos de áreas livres para outras onde ela é endêmica (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

Em um trabalho realizado por Wozniak *et al.* (1997), observou-se que após infecção por *B. gibsoni*, depósitos multifocais de anticorpos IgM foram imuno-histoquimicamente demonstrados em paredes de artérias e glomérulos renais com processo inflamatório, sugerindo que uma intensa imunoestimulação resulta em ativação e expansão da população de linfócitos T e B, além da ativação de macrófagos. A densidade de linfócitos CD3+ nos sinusóides hepáticos também aumentaram significativamente.

O estado de portador crônico da doença é decorrente da permanência do agente no organismo animal de modo controlado, não havendo a ocorrência de sintomas agudos da infecção, mas sim a estimulação antigênica periódica que mantém os títulos de anticorpos por longos períodos, protegendo os animais contra infecções futuras (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). Os cães que se recuperam da infecção aguda podem tornar-se portadores crônicos caso o sistema imunológico não tenha sido capaz de eliminar completamente o agente. Poderão ocorrer sinais clínicos se os animais, por qualquer motivo, tiverem uma imunossupressão (TABOADA & MERCHANT, 1997). Esses animais são fonte de infecção quando mantidos em colônias ou quando utilizados como doadores de sangue, segundo Brandão & Hagiwara (2002).

O tratamento dos cães doentes com dipropionato de imidocarb causa a eliminação completa do agente do organismo animal, impedindo assim a perpetuação do estímulo antigênico, limitando a proteção e tornando os animais suscetíveis a novas infecções em decorrência de anticorpos protetores. Nessas condições torna-se desejável a persistência da infecção residual, que possibilite estimulação antigênica periódica, e a manutenção de um adequado título de anticorpos capaz de promover proteção prolongada. O uso de medicamentos como a doxiciclina, capazes de limitar a infecção sem causar a extinção completa do agente, pode ter essa finalidade (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). De forma similar, o estímulo antigênico periódico promovido pela picada do carrapato, e conseqüente inoculação de formas infectantes, parece ser fundamental para a manutenção de títulos protetores de anticorpos. Portanto, animais livres de carrapatos tornam-se mais sensíveis à reinfecção em decorrência do declínio lento dos títulos de anticorpos, tornando-se suscetíveis 5 a 8 meses após a infecção precedente (TABOADA, 1998).

O estado de premunicação é tão importante na babesiose canina que o desenvolvimento de vacinas capazes de conferir imunidade protetora efetiva contra infecções, ou que limitem o desenvolvimento de sintomas clínicos graves, é extremamente desejado. Apesar da boa efetividade dos tratamentos babesicidas específicos, a imunização ainda é o procedimento de eleição, pois, em última instância, minimiza as perdas econômicas envolvidas no tratamento e morte dos animais (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

Estudos têm sido realizados na tentativa de se desenvolver vacinas produzidas com antígenos solúveis de *Babesia* spp, o que não impediria a infecção dos cães, mas limitaria o surgimento dos sintomas. Uma vacina produzida a partir de exo-antígenos de *B. canis* foi produzida na Europa e tem mostrado eficiência de 70 a 100% para impedir a infecção em cães, mas sua efetividade é limitada às características antigênicas do agente. Assim, é necessário produzir uma vacina específica para cada cepa em cada parte do mundo (TABOADA, 1998). O trabalho realizado por Schetters *et al.* (1997b) confirma esta constatação, uma vez que identificaram duas cepas diferentes de *B. canis* de áreas geográficas distintas que, em infecção experimental, revelaram diferentes patologias. Esses resultados indicam que provavelmente as diferentes cepas de *B. canis canis* e *B. canis rossii* devam ter influência no desenvolvimento de vacinas.

Segundo Taboada & Merchant (1997), os cães jovens são mais suscetíveis à infecção por *Babesia* spp do que os animais adultos, pois os cães com menos de 8 a 12 semanas de idade podem ser protegidos por anticorpos de origem materna, e assim aqueles na faixa dos 2 a 8 meses são, provavelmente, muito mais suscetíveis. Entretanto, de acordo com Bonous *et al.* (1993), os filhotes caninos com 4 meses de idade, ou mais jovens, são muito suscetíveis à babesiose, adquirindo freqüentemente uma infecção mais grave que a dos cães adultos. Cães anêmicos criados em canis localizados em regiões endêmicas devem passar por triagem para a babesiose. Adultos em canis afetados podem servir como marcadores sorológicos para a moléstia. O galgo parece ser mais suscetível à infecção do que outras raças caninas (TABOADA & MERCHANT, 1997).

O modo principal de prevenção é o controle do carrapato vetor. Visto haver necessidade de no mínimo 3 dias de alimentação para que ocorra a transmissão do parasito, indica-se inspeções freqüentes da pelagem dos animais em busca de carrapatos. A babesiose também pode ser transmitida pela transfusão sanguínea, tornando muito importante o controle de doadores de sangue (TABOADA & MERCHANT, 1997).

2.1.12 Babesiose em Humanos

As parasitoses transmitidas pelos animais domésticos ao homem têm sido diagnosticadas de forma crescente, graças aos estudos biológicos e epidemiológicos, à melhoria das técnicas de diagnóstico e à difusão das descobertas recentes (NEVES, 2000). O homem imunocomprometido, como o esplenectomizado, o idoso e atualmente o HIV-positivo, é o principal hospedeiro humano atingido (CASTRO & MINKOVES, 1999).

Até 1957 várias espécies de *Babesia* eram consideradas espécie específicas. Posteriormente, casos de babesiose em humanos foram descritos, demonstrando o potencial zoonótico de certas espécies de babésias (MAHONEY, 1977). Entretanto, segundo Neves (2000), acreditava-se que as infecções humanas só ocorriam esporadicamente em indivíduos esplenectomizados. No entanto, a partir de 1975, vários casos de babesiose humana foram diagnosticados em pessoas com baço *in situ* nos Estados Unidos. Casos

dessa doença foram descritos também no continente europeu, na América do Norte e no Brasil (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002).

O homem se infecta ao ser picado por carrapatos infectados ou através de transfusões sanguíneas. Todavia, não se sabe se a babesiose humana está sempre associada a recentes picadas de carrapatos ou pode ser provocada, em algumas ocasiões, pela manifestação de uma infecção latente devido a uma imunossupressão (URQUHART, 1998), uma vez que exames sorológicos evidenciam a presença de anticorpos específicos em indivíduos assintomáticos em diferentes áreas geográficas (NEVES, 2000).

As maiores possibilidades de ocorrência de babesiose humana no Brasil são através da picada de carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus*, prováveis transmissores, respectivamente, da babesiose eqüina e canina, considerando que o *Boophilus microplus* não ataca o homem (NEVES, 2000). O carrapato inocula os esporozoítos, contaminando as hemácias, e diferenciando-se em trofozoítos. Quando de seu amadurecimento, conterão de 2 a 4 merozoítos, liberados com o rompimento da hemácia e prontos para invadir outras células vermelhas. Diferentemente da malária, não há lise sincrônica das hemácias, não ocorrendo, portanto, crises de hemólises (CASTRO & MINKOVES, 1999).

Não parece haver uma espécie de *Babesia* capaz de causar infecção exclusivamente em seres humanos que, como na maioria das infecções transmitidas por carrapatos, parecem servir apenas como hospedeiros acidentais da doença (BRANDÃO & HAGIWARA, 2002). Os casos de babesiose humana registrados no Brasil são causados principalmente por espécies de *Babesia* parasitas de bovinos (*B. bigemina* e *B. bovis*), eqüinos (*B. caballi* e *B. equi*) e de caninos (*B. canis*). Já a *B. microti* que parasita roedores é a principal agente da babesiose humana na América do Norte (NEVES, 2000).

Segundo Brandão & Hagiwara (2002), a maioria das infecções é branda ou assintomática, mas pode resultar em sintomas graves, que causam a morte. A enfermidade clínica pode ser severa, com convalescência de até 18 meses, sendo que a doença apresenta-se de forma mais grave em imunossuprimidos (CASTRO & MINKOVES, 1999).

2.2 *Ehrlichia* spp

2.2.1 Etiologia

O gênero *Ehrlichia* é formado por bactérias gram negativas, sendo parasitos intracelulares obrigatórios que infectam os leucócitos e causam trombocitopenia no hospedeiro. Existem espécies de *Ehrlichia* que afetam cães, eqüinos, ruminantes, gatos e humanos (ANDEREG & PASSOS, 1999; LEGATZKI & JORGE, 2002). A *E. canis* foi identificada pela primeira vez na Argélia em 1935, tendo sido documentada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1963 (BREITSCHWERDT, 1997). A moléstia alcançou destaque na mídia e entre os veterinários durante a guerra do Vietnã, quando uma grande proporção de cães militares contraiu essa doença (SHERDING, 1998).

Várias espécies do gênero *Ehrlichia* causam infecção clínica e subclínica em cães, como *E. canis*, *E. platys* e *E. ewingii*, sendo essas as que normalmente infectam os caninos. Além dessas espécies, a *E. equi* (agente da erliquiose granulocitotrópica eqüina), a *E. risticii* (agente da febre eqüina) e a *E. chaffeensis* (agente da erliquiose humana) também já foram isoladas como causadoras de erliquiose em cães (ANDEREG & PASSOS, 1999). A *E. canis* é a causa da doença febril chamada pancitopenia canina (URQUHART *et al.*, 1998), enquanto a *E. platys* é a causadora da trombocitopenia cíclica canina (BREITSCHWERDT, 1997) e a *E. ewingii* causa a erliquiose granulocítica canina (QUINN *et al.*, 1997).

Ao caracterizar e comparar a seqüência de 16S-rRNA de algumas espécies de erlíquias, por ampliação e seqüenciamento do genoma, foram observadas semelhanças que permitiram dividi-las em três grupos filogenéticos. O primeiro grupo é composto pela *E. equi*, *E. platys* e *E. phagocytophila*; o segundo, pela *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, e o terceiro, pela *E. risticii* e *E. sennetsu* (QUINN *et al.*, 1997). As três espécies do genogrupo *E. canis* têm sido diagnosticadas em cães naturalmente infectados, causando um quadro clínico severo (ANDEREG & PASSOS, 1999). Porém, destas a *E. canis* é o agente que normalmente afeta os cães, e segundo alguns autores, é o que causa o quadro clínico

mais severo (LEGATZKI & JORGE, 2002). Por isso, segundo Vignard-Rosez *et al.* (2001), apenas a infecção por *E.canis* possui importância epidemiológica.

A moléstia causada pela *E. canis* tem como sinônimos históricos pancitopenia tropical canina, tifo canino, febre hemorrágica canina e moléstia do cão rastreador (SHERDING, 1998; BREITSCHWERDT, 1997), síndrome hemorrágica idiopática, erliquiose monocítica canina, riquetsiose canina, (BREITSCHWERDT, 1997).

Geralmente, parasitismos por *Babesia* spp, *Hepatozoon canis* (ANDEREG & PASSOS, 1999; BREITSCHWERDT, 1997) e *Haemobartonella canis* (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001), protozoários também transmitidos por carrapatos, podem ocorrer concomitantemente com a erliquiose canina, sugerindo a transmissão simultânea.

2.2.2 Sistemática

De acordo com Breitschwerdt (1997), o gênero *Ehrlichia* segue a seguinte classificação:

Ordem: Rickettsiales

Família: Rickettsiaceae

Tribo: Rickettsiae

Gênero: *Ehrlichia*

2.2.3 Transmissão

O vetor de maior importância na transmissão da erliquiose canina é o carrapato, mais especificamente o *Rhipicephalus sanguineus*. Esta espécie é de grande importância por ser cosmopolita, tendo como hospedeiro principal o cão. Com efeito, apesar da capacidade de se fixar em outros hospedeiros, o *R. sanguineus* parece depender dos cães para a sua nutrição (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001). De acordo com Sherding (1998) e

Quinn *et al.* (1997), o *R. sanguineus* pode transmitir os microrganismos por pelo menos 5 meses pós-ingurgitamento. A infecção no hospedeiro vertebrado ocorre quando o carrapato, durante a ingestão de sangue, inocula junto com a saliva a forma infectante da *E. canis* (BREITSCHWERDT, 1997).

Tanto os animais com infecção crônica, como os carrapatos que permanecem infectados por longos períodos podem ser reservatórios da *E. canis*. Na África do Sul foram identificados gatos que possuíam anticorpos anti- *E. canis*, assim, estes também podem atuar como reservatório. Outros mamíferos, como os roedores, também podem servir como reservatório, justificando a epizootia da erliquiose canina. Os cães que se recuperam da doença permanecem portadores, podendo manter a infecção por períodos superiores a 5 anos. Apesar de o número de parasitos circulantes no sangue de cães com infecção crônica ser menor do que naqueles com infecção aguda, acredita-se que seja um número suficiente para infectar o carrapato, que então transmite a doença (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Como não existem hospedeiros intermediários, e por ser uma doença de caráter hematológico, a *E. canis* pode ser veiculada por transfusões sanguíneas de um doador infectado para um cão submetido a esse procedimento na clínica de pequenos animais (MUNHOZ & BABO, 1998; SHERDING, 1998). Entretanto, de acordo com o trabalho realizado por François *et al.* (2002), o conservante CDPA (citrato de sódio, dextrose, fosfato de sódio, adenina) contido nas bolsas de sangue e o período de conservação de 7 dias do sangue nas bolsas, poderiam inativar a cepa de *E. canis*.

2.2.4 Distribuição Geográfica

A distribuição da erliquiose canina está relacionada com a distribuição do vetor *R. sanguineus*, sendo uma doença que ocorre em todos os continentes, segundo Harrus *et al.* (1997) *apud* Legatzki & Jorge (2002). De acordo com Andereg & Passos (1999), atualmente a infecção por *E. canis* ocorre em praticamente todo o globo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Três cepas de *E. canis* já foram isoladas e geneticamente caracterizadas: cepa Flórida, cepa de Oklahoma e cepa Israelense. Apesar

das cepas originarem-se de diferentes localidades geográficas, elas são muito semelhantes em relação à seqüência de 16S r-RNA. A importância clínica da erliquiose tem aumentado na Índia e em Israel. Nos Estados Unidos, a *E. canis* foi identificada pela primeira vez em 1962, sendo atualmente uma das principais doenças que afeta a população canina. A erliquiose canina foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em Belo Horizonte em 1973. Desde então a incidência dessa doença tem aumentado no estado de Minas Gerais (ANDEREG & PASSOS, 1999).

2.2.5 Morfologia e Ciclo Evolutivo

As espécies de *Ehrlichia* aparecem como microrganismos individuais (corpos elementares) extremamente pleomórficos, medindo de 0,2 a 0,4 μm de diâmetro, podendo ser vista mais freqüentemente em pequenos grupos (corpúsculos iniciais) ou muitos microrganismos firmemente agrupados (mórulas) de até 4,0 μm de diâmetro (QUINN *et al.*, 1997).

Este protozoário parece multiplicar-se por divisão binária, mas maiores detalhes de seu ciclo de vida não são conhecidos (QUINN *et al.*, 1997). O ciclo da *Ehrlichia* spp, segundo Vignard-Rosez *et al.* (2001), é constituído de 3 fases principais: 1) penetração dos corpos elementares nos monócitos, onde permanecem em crescimento por aproximadamente dois dias; 2) multiplicação do agente, por um período de 3 a 5 dias, com a formação do corpo inicial; 3) formação das mórulas, sendo estas constituídas por um conjunto de corpos elementares envoltos por uma membrana.

Segundo Andereg & Passos (1999), através da microscopia eletrônica de cultura de células infectadas com uma amostra israelense de *E. canis*, observou-se que a mórula é envolta por uma dupla membrana e que existem duas formas de mórula. Uma é composta por microrganismos de tamanhos variados, densamente compactados dentro do vacúolo, sendo difícil a identificação individual desses microrganismos, e a outra é um vacúolo contendo uma substância filamentosa que envolve microrganismos pleomórficos. A mórula é observada ocasionalmente nos leucócitos na fase aguda da infecção, em pequeno número e por um curto período de tempo; porém raramente está associada à infecção crônica

(BREITSCHWERDT, 1997). Pode ocorrer em monócitos, neutrófilos, linfócitos ou eosinófilos, dependendo da cepa infectante (ANDEREG & PASSOS, 1999). Em uma mesma célula podemos ter mais de uma mórula, sendo que estas permanecem na célula hospedeira por 3 a 4 dias para então serem liberadas com a lise celular (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001).

Já a *E. platys* infecta as plaquetas e também forma inclusões intraplaquetárias que se assemelham à mórula da *E. canis*, segundo Harrus *et al.* (1997) *apud* Legatzki & Jorge, (2002).

O carrapato *R. sanguineus* contamina-se ao ingerir sangue com leucócitos parasitados de animais doentes. Isto geralmente ocorre na segunda ou terceira semana de infecção do cão, pois na fase aguda da infecção existe maior porcentagem de leucócitos infectados (LEGATZKI & JORGE, 2002). No carrapato, a *E. canis* multiplica-se nos hemócitos e nas células da glândula salivar, propiciando, portanto, a transmissão transtadiária (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001). Entretanto, segundo Vignard-Rosez *et al.* (2001), a transmissão transovariana provavelmente não ocorre e, de acordo com Andereg & Passos (1999), é rara ou inexistente. A transmissão entre animais se faz pela inoculação de sangue proveniente de um cão contaminado para um cão sadio, pelo intermédio do carrapato. O carrapato poderá permanecer infectante por um período de aproximadamente um ano, visto que, segundo Vignard-Rosez *et al.*, (2001) e Andereg & Passos (1999), a infecção do hospedeiro vertebrado pode ocorrer em qualquer estágio de parasitemia do carrapato (larva, ninfa e adulto). De acordo com Breitschwerdt (1997), o *R. sanguineus* adulto é capaz de transmitir *E. canis* por pelo menos 155 dias após a separação do hospedeiro.

2.2.6 Patogenia

A infecção do cão sadio dá-se no momento do repasto do carrapato infectado, sendo que a erliquiose tem um período de incubação de 8 a 20 dias (ANDEREG & PASSOS,

1999; VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001). Segundo Egenvall *et al.* (1998) *apud* LEGATZKI & JORGE (2002), foi relatado que cães inoculados experimentalmente apresentaram as primeiras inclusões em neutrófilos sanguíneos de 4 a 14 dias após a inoculação.

Em um estudo realizado por Stuen & Artursson (2000), observou-se que o período de incubação varia de acordo com a dose de microrganismo infectante: quanto maior a dose de parasitas, menor o período de incubação. Entretanto as alterações clínicas e hematológicas não são influenciadas com a dose infectante.

De acordo com Breitschwerdt (1997), baseando-se nos sinais clínicos, observam-se 3 fases da doença: aguda, subclínica e crônica. Entretanto, ao contrário da infecção experimental, onde é possível diferenciar nitidamente as 3 fases, a infecção natural não é tão evidente, provavelmente, por falta de observação e acompanhamento laboratorial por parte do clínico veterinário (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Na fase aguda, a replicação do protozoário ocorre nas células mononucleares e linfócitos, sendo este seu primeiro ponto de replicação, e dissemina-se para as células do sistema retículo endotelial do fígado, baço e linfonodos, resultando em hiperplasia linforreticular. A interação entre as células infectadas e o endotélio vascular induz uma vasculite evidente nos pulmões, rins e meninges. Secundariamente ao processo de vasculite, teremos a destruição periférica das células alvo, ou o seqüestro das mesmas, levando a uma trombocitopenia e leucopenia. O animal pode recuperar-se completamente, passar para a fase subclínica ou raramente morrer (QUINN, 1997).

Segundo Vignard-Rosez *et al.* (2001), na fase subclínica a *E. canis* persiste no hospedeiro, promovendo altos títulos de anticorpos. Podem ocorrer anemia e trombocitopenia recorrentes (QUINN, 1997). Esta fase pode perdurar por vários anos, sendo que poderá acarretar apenas leves alterações hematológicas, e não haver sintomatologia clínica evidente (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001). Porém, segundo Quinn (1997), muitos animais, os quais desenvolvem infecções secundárias, não conseguem sobreviver.

Quando a resposta imune do hospedeiro é incapaz de eliminar o agente, teremos a doença crônica. A forma crônica varia de suave a severa, sendo que é dependente de fatores como idade, imunocompetência, virulência da cepa e infecções concomitantes (QUINN, 1997). A principal característica desta fase é o aparecimento de uma hipoplasia medular,

levando a uma anemia aplásica, monocitose, linfocitose e leucopenia (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001).

2.2.7 Aspectos Clínicos

2.2.7.1 Fase Aguda

A fase aguda da infecção por *E. canis* ocorre aproximadamente de 8 a 20 dias após a infecção (BREITSCHWERDT, 1997). A hiperplasia linforreticular pode acarretar um aumento de volume do fígado, baço e linfonodos (SHERDING, 1998). Esta fase é caracterizada, segundo Vignard-Rosez *et al* (2001), principalmente por hipertermia (39,5-41,5°C), anorexia, perda de peso e astenia. Observa-se nessa fase sinais inespecíficos além de febre, como secreção nasal, depressão, estertores pulmonares, petéquias, vômito (LEGATZKI & JORGE, 2002), equimoses, secreção ocular, cianose, descarga oculonasal mucopurulenta (ANDEREG & PASSOS, 1999), epistaxis, hematúria, edema de membros, insuficiência hepato-renal (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001), edema de escroto (BREITSCHWERDT, 1997). Sinais clínicos de coagulopatias são raros, de acordo com Quinn (1997).

A fase aguda pode não ser evidente, passando despercebida pelo proprietário (ANDEREG & PASSOS, 1999). Os sinais clínicos desaparecem na maioria dos casos sem tratamento dentro de uma a quatro semanas, porém o hospedeiro permanece com a infecção subclínica (QUINN, 1997).

De acordo com Andereg & Passos (1999), a possibilidade de que infecções agudas por *E. canis* possam ser imunossupressoras para cães infectados com *Babesia canis* deve ser considerada, pois foram observados, em alguns casos, que a manifestação clínica da babesiose estava relacionada com infecções agudas de *E. canis*.

Ocorre uma trombocitopenia entre 10 e 20 dias pós-infecção (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001) e um aumento no número de plaquetas imaturas circulantes, que persiste por toda a doença na maioria dos animais. A trombocitopenia deve-se à diminuição da meia-vida das plaquetas, resultante da sua destruição, decorrente da estimulação dos sistemas

imunológico e de coagulação e, em parte, devido à resposta inflamatória (BOUNOUS *et al.*, 1993). Segundo Andereg & Passos (1999), a própria infecção por *E. canis* causa lise de plaquetas, porém casos sem trombocitopenia podem ocorrer.

Na fase aguda também se observa um aumento no tempo de coagulação devido à inibição da agregação plaquetária. Esta inibição provavelmente deve-se à presença de anticorpos antiplaquetas no soro de cães infectados com *E. canis*. Esta alteração deve ocorrer devido à interação de tais anticorpos com as glicoproteínas das membranas das plaquetas, porém estudos mostram que outros fatores de inibição da aglutinação, além da presença de anticorpos, também podem estar envolvidos (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Anticorpos antiplaquetas foram encontrados em um trabalho realizado em Israel, confirmando a teoria que a trombocitopenia tem um componente imunológico envolvido. Porém, devido à aparência heterogênea dos anticorpos antiplaquetas encontrados nos cães infectados, conclui-se que também haja um componente não imunomediado envolvido na trombocitopenia (WANER *et al.*, 2000a).

Anemia aplásica é raramente observada (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001), a não ser que ocorram concomitantemente infecções por *Babesia canis* ou hemorragias recentes (ANDEREG & PASSOS, 1999). Em alguns casos temos também uma leucopenia progredindo para leucocitose (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001), entretanto, de acordo com Andereg & Passos (1999), na fase aguda raramente é observada leucocitose. Há proliferação de células megacariocíticas e da série mielóide na medula óssea.

Na fase aguda há aumento dos níveis plasmáticos de ALT (alanina aminotransferase) e FA (fosfatase alcalina), segundo Vignard-Rosez *et al.* (2001), além de proteínas c-reativas (CRP) e de alfa-1-ácido-glicoproteínas (AAG), de acordo com Legatzki & Jorge (2002). Observa-se também um aumento da bilirrubina total devido à hemólise intensa e em poucos casos, uma icterícia branda (ANDEREG & PASSOS, 1999). Segundo Vignard-Rosez *et al.* (2001), os exames mostram uma hiperbilirrubinemia principalmente por betaglobulinemia.

Outro achado comum é a hiperproteinemia, resultante do aumento dos níveis de gamaglobulinas. A hiperglobulinemia sugere uma resposta imune exacerbada que provavelmente é ineficiente, e pode causar a síndrome de hiperviscosidade sanguínea. Isso ocorre na fase febril da doença, e persiste durante as fases crônica e subclínica. Porém, em

cães com um quadro de pancitopenia, a concentração de gamaglobulinas é menor, provavelmente em consequência da leucopenia pronunciada. Como a ativação, divisão e diferenciação dos linfócitos B em células formadoras de anticorpos requer citocinas, secretadas principalmente por células *T-helper* e por células apresentadoras de antígenos, uma leucopenia pronunciada, nos cães com pancitopenia, pode resultar em interações inapropriadas entre as células mencionadas acima, deficiência de citocinas e células apresentadoras de antígenos, resultando assim em uma menor concentração de gamaglobulina (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Também pode ocorrer, em todas as fases da erliquiose, hipoalbuminemia (BREITSCHWERDT, 1997). Esta alteração pode ser resultante da anorexia, que leva à diminuição da ingestão de proteínas, perda de peso, perda de fluidos inflamatórios edematosos (como consequência de vasculite), decréscimo da produção de proteínas devido a doenças hepáticas concomitantes e proteinúria. Além disso, como a síntese de globulina é regulada pela pressão oncótica, o decréscimo da concentração de albumina pode agir como mecanismo compensatório ao estágio de hiperglobulinemia, mantendo a pressão oncótica e prevenindo o aumento da viscosidade do sangue (ANDEREG & PASSOS, 1999).

2.2.7.2 Fase Subclínica

A fase subclínica caracteriza-se pela persistência da *E. canis* no hospedeiro, após uma aparente recuperação da fase aguda (SHERDING, 1998). Esta persistência foi demonstrada através de PCR e de altos níveis de anticorpos no soro, sugerindo uma constante estimulação do sistema imune por antígenos. Os cães podem eliminar o microrganismo durante a fase subclínica ou, em cerca de 6 a 9 semanas, progredir para a fase crônica. Em áreas enzoóticas, a fase subclínica pode durar anos, e cães imunocompetentes podem eliminar o parasita e recuperar-se da infecção sem tratamento (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Os sintomas podem ser brandos e o animal pode apresentar-se saudável e clinicamente normal. Porém, em alguns casos, observam-se complicações como depressão, agravamento da perda de peso, mucosas pálidas, hemorragias, infecções secundárias e

edemas nos membros. Linfadenopatia e esplenomegalia são raras, assim como a presença de carrapatos no hospedeiro (LEGATZKI & JORGE, 2002). Segundo Quinn (1997), pode ocorrer febre intermitente.

De acordo com Andereg & Passos (1999), a hemorragia é evidenciada na forma de epistaxe, melena, hematúria e ematemesa. Às vezes, observam-se petéquias e equimoses no abdomen e membros. Foi descrito por Sousa *et al.* (2002) um caso de hematoma mamário, secundário à mamite, em uma pastora belga com sorologia e PCR positivos para erliquiose. A hemorragia ocorre devido à trombocitopenia e devido à disfunção da agregação plaquetária. Esta disfunção deve-se a alterações que ocorrem na membrana, na interação agonista-receptor e no processo de secreção (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Podem ocorrer lesões oculares como hifema, hemorragia sub-retinal, uveíte, descolamento da retina e cegueira (LEGATZKI & JORGE, 2002). Essas alterações sempre foram associadas somente à trombocitopenia, porém a elevação da pressão oncótica, a vasculite e a disfunção plaquetária também estão envolvidas na patogênese do sangramento ocular. Essas alterações devem-se à hipergamaglobulinemia, que causa distúrbios na coagulação e síndrome de hiperviscosidade. Os distúrbios na coagulação são devidos à presença de anticorpos antiplaquetários, disfunção das plaquetas e distúrbios na síntese do fator III de coagulação (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Harrus *et al.* (1998) relataram um caso de cegueira aguda em um labrador associada à gamopatia monoclonal induzida pela *E. canis*. O animal apresentava hifema bilateral, hemorragia retinal e descolamento da retina. O resultado da eletroforese da proteína sérica revelou hipoalbuminemia e um pequeno pico de gamaglobulina.

Alterações neurológicas, como ataxia, disfunção motora, hiperestesia localizada ou generalizada e tremores são provavelmente causados por infiltração celular ou devido a hemorragias nas meninges ou no parênquima cerebral e na medula espinhal (ANDEREG & PASSOS, 1999). Alguns cães apresentam artrite localizada ou generalizada nesta fase, provavelmente devido ao depósito de imunocomplexos (LEGATZKI & JORGE, 2002). De acordo com Andereg & Passos (1999), geralmente quando o agente causador da infecção é a *E. ewingii*, é comum a observação de poliartrite. Nestes animais há um aumento da concentração protéica e de células (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) no líquido sinovial.

Alguns cães apresentam glomerulonefrite, também causada provavelmente por depósitos de imunocomplexos.

A fase subclínica geralmente termina com epistaxe, hemorragias generalizadas e insuficiência renal progressiva. Experimentalmente, cães com imunocompetência adequada eliminaram os parasitos e não apresentaram a fase crônica da moléstia (ANDEREG & PASSOS, 1999). Os animais incapazes de montar uma resposta imune efetiva contra o microrganismo ficam cronicamente infectados (BREITSCHWERDT, 1997).

Um dos achados laboratoriais mais comuns é a trombocitopenia moderada (LEGATZKI & JORGE, 2002), e observa-se também uma leucopenia seguida de leucocitose e monocitose. A neutropenia também é um achado comum nesta fase (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Segundo Waner *et al.* (1997) *apud* Andereg & Passos (1999), em um estudo que caracterizou a fase subclínica em cães naturalmente infectados, observou-se neutropenia em 30% dos cães doentes. Este mesmo estudo apontou leucopenia em 78% dos cães infectados experimentalmente, e 71% destes cães apresentaram redução de neutrófilos. Porém nenhum dos cães apresentou leucopenia ou neutropenia absoluta.

De acordo com Andereg & Passos (1999), os níveis de globulina sérica continuam aumentando com o progredir da doença. É freqüente a ocorrência de proteinúria nesta fase em consequência da glomerulonefrite, resultante da hiperglobulinemia que pode ser policlonal, devido a heterogenicidade das cadeias leves das proteínas observadas em cães com proteinúria. Esta alteração pode ser observada em cães com ou sem azotemia. A presença de níveis elevados de uréia e creatinina no sangue (azotemia) dependerá do grau de lesão renal.

O tempo de sedimentação está aumentado, assim como o tempo de coagulação. Outras alterações hematológicas observadas foram aumento do tamanho das plaquetas e redução do hematócrito e da concentração de hemoglobina. Este aumento no tamanho das plaquetas sugere uma trombocitopoiese ativa da medula óssea em resposta ao declínio patológico do volume de plaquetas circulantes (ANDEREG & PASSOS, 1999).

A pancitopenia (redução total do número de células medulares devido à aplasia medular crônica) é rara na fase subclínica; e a titulação de anticorpos anti-*E. canis*, através da IFI, observada nesta fase, é muito alta, variando de 1:2560 a 1:20480 (LEGATZKI &

JORGE, 2002). Estes altos títulos de anticorpos indicam a duração prolongada da infecção e a estimulação crônica pelo antígeno (ANDEREG & PASSOS, 1999).

2.2.7.3 Fase Crônica

Segundo Breitschwerdt (1997), na fase crônica os sinais clínicos da moléstia podem ser caracterizados como brandos ou os animais podem ser assintomáticos, mas também podem ser graves. A severidade da doença depende da cepa infectante, de doenças concomitantes, da alimentação, da suscetibilidade e da idade do animal (LEGATZKI & JORGE, 2002). Os sinais clínicos podem desenvolver-se 1 a 4 meses após a inoculação do microrganismo (SHERDING, 1998).

Os sinais clínicos nesta fase são os mesmos da fase subclínica, porém de forma exacerbada. Geralmente o animal apresenta-se apático, caquético e com infecções secundárias diversas. A glomerulonefrite é um achado comum nesta fase (ANDEREG & PASSOS, 1999). A combinação de tendências hemorrágicas, palidez, sensibilidade abdominal e sinais compatíveis com meningoencefalite, tipificam os cães cronicamente infectados; a epistaxe, outrora considerada ponto referencial da moléstia, não é freqüente (BREITSCHWERDT, 1997). Entretanto, de acordo com Quinn (1997), metade dos cães gravemente afetados apresenta sinais relacionados à deficiência na coagulação.

A principal característica desta fase é a hipoplasia de medula, resultando em uma pancitopenia severa (LEGATZKI & JORGE, 2002) com anemia aplásica, assim como monocitose, linfocitose, leucopenia e diminuição da concentração de gamaglobulina (ANDEREG & PASSOS, 1999). De acordo com Breitschwerdt (1997), a pancitopenia é documentada em menos de 25% dos cães. Como a neutropenia é um fator predisponente importante para infecções bacterianas, a combinação desses fatores indica um maior comprometimento do estado imunológico desses animais, tornando-os assim mais suscetíveis a infecções secundárias (BREITSCHWERDT, 1997).

Segundo Legatzki & Jorge (2002), devido ao agravamento das alterações hematológicas (aumento do tempo de sedimentação e de coagulação e anemia), a

ocorrência de hemorragias é comum, assim como a proteinúria, devido ao agravamento da lesão renal.

Para o diagnóstico diferencial durante a fase crônica, devemos excluir intoxicação por estrógenos, pancitopenia imunomediada e doenças associadas a disfunções de órgãos específicos, como glomerulonefrites (SEIBERT, 1996). De acordo com Sherding (1998), os sinais clínicos e as anormalidades laboratoriais nos cães com erliquiose crônica podem lembrar um mieloma múltiplo ou leucemia linfocítica crônica.

2.2.8 Achados anátomo-patológicos

Os achados de necropsia dependem da fase da doença em que o cão se encontrava quando morreu. Geralmente são observadas petéquias e equimoses na superfície de serosas e mucosas da cavidade nasal, pulmões, rins, bexiga, no trato gastrintestinal e nos tecidos subcutâneos (ANDEREG & PASSOS, 1999). De acordo com Quinn (1997), hemorragias extensas são freqüentes no exame *post-mortem*.

Quando a necropsia é feita na fase aguda da doença, observam-se esplenomegalia, hepatomegalia, linfonodos aumentados de volume e com coloração amarronzada e medula óssea hiperplásica e vermelha. Esta coloração dos linfonodos é devida a eritrofagocitose e hemossiderose (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Já na fase crônica, são encontrados nódulos marrons no pulmão e a medula óssea está hipoplásica e pálida devido à descoloração gordurosa. Edemas são freqüentemente observados nessa fase (ANDEREG & PASSOS, 1999). Segundo Vignard-Rosez *et al.*(2001), além de edema de membros e hipoplasia medular, observa-se hemorragia em diversos órgãos e linfadenopatia generalizada.

No exame histológico, o achado mais comum é um infiltrado de células perivasculares nos tecidos dos pulmões, cérebro, meninges, rins, linfonodos e baço. Nestes dois últimos órgãos, observam-se plasmocitose e hiperplasia folicular. A esplenomegalia é devida à congestão e proliferação difusa da polpa branca. No fígado observa-se uma

necrose centrolobular, principalmente na fase aguda, e um infiltrado celular no sistema porta (ANDEREG & PASSOS, 1999). Na fase aguda os cães poderão apresentar miocardite intersticial e adenomegalia (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001).

De acordo com Andereg & Passos (1999), macroscopicamente poucos cães apresentam evidências de meningite, porém microscopicamente observa-se, na maioria dos cães, um infiltrado linfoblástico nas meninges, especialmente ao redor das veias. Quinn (1997) afirma que uma meningoencefalite não supurativa pode estar presente em alguns cães.

2.2.9 Imunologia

O primeiro pico de produção de anticorpos ocorre no 7º dia pós-infecção, sendo de IgA e IgM. Através da reação de imunofluorescência indireta (IFI), foram detectados anticorpos da classe IgG entre o 2º e o 6º dias pós-infecção experimental e após o 15º dia, porém alguns cães só se soroconvertem 28 dias pós-infecção. Pode-se observar um decréscimo na proporção de células CD4+ e CD8+ nos cães infectados. O título de anticorpos continua aumentando durante a infecção, com um aumento de 8 vezes no título de IgG aos 43 dias após a infecção. Em alguns cães o título cai subitamente poucos dias antes da morte (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Cães imunizados com antígenos inativados de *E. canis* e adjuvantes tiveram uma alta produção de anticorpos, porém esses falharam na indução de proteção e os animais apresentaram sinais clínicos mais severos do que os do grupo controle. Isto demonstra que os anticorpos não são protetores, somente são eficientes na presença de erlíquias extracelulares; e que provavelmente estão relacionados com a gravidade da sintomatologia. A imunidade protetora da erliquiose canina depende claramente da premunição. Essa imunidade depende da interação entre os anticorpos anti-*E. canis* e a imunidade celular (células citotóxicas, linfócitos T *killer* e linfocinas), que é a principal responsável pela

defesa do organismo. A resposta imune celular foi detectada 28 dias após a infecção experimental em cães com *E. canis* (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Após a eliminação do agente através de tratamento, os níveis de anticorpos IgG persistem detectáveis pela IFI, porém entre 3 e 9 meses o título diminui. Cães tratados com doxiciclina tiveram uma queda de duas a quatro vezes no título de anticorpos entre o 21º e o 35º dias após o tratamento. Essa queda foi de 16 vezes 49 dias após o início do tratamento. Após o tratamento, os níveis de gamaglobulina decrescem. Assim, portadores podem ser distinguidos de cães soropositivos que não possuem o agente, pela presença de altos níveis de gamaglobulina ou pela trombocitopenia dos primeiros (ANDEREG & PASSOS, 1999).

A doença pode ser caracterizada como auto-imune, evidenciada pela presença de auto-anticorpos contra plaquetas em cães infectados experimentalmente com *E. canis* (WANER *et al.*, 2000a). Outras evidências de que a patogênese da erliquiose canina é decorrente de um processo imunomediado são a hipergamaglobulinemia, a plasmocitose tecidual intensa e a hiperplasia linforreticular. Além disso, cães infectados experimentalmente com *E. canis* e submetidos a uma terapia imunossupressora apresentaram sintomatologia mais branda. O quadro clínico também foi mais brando em cães esplenectomizados, pois na ausência do órgão houve menor liberação de mediadores inflamatórios como pirógenos endógenos, diminuição da produção de anticorpos e diminuição do número de macrófagos circulantes, evidenciando a característica auto-imune da doença (ANDEREG & PASSOS, 1999).

2.2.10 Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose tem aumentado devido ao maior conhecimento sobre a doença, a expansão geográfica da ocorrência e a melhoria das técnicas de diagnóstico. Testes mais sensíveis dão maior eficiência à pesquisa e identificação de animais portadores. É muito importante o diagnóstico da erliquiose nos estágios iniciais da infecção,

melhorando assim o prognóstico dos animais. Como em alguns casos os animais com erliquiose apresentam sintomas inespecíficos, o diagnóstico através do exame clínico é dificultado (ANDEREG & PASSOS, 1999).

A trombocitopenia presente no quadro clínico não permite que se confirme o diagnóstico da doença, mas em áreas sabidamente endêmicas, a erliquiose deve ser considerada como a primeira suspeita. A confirmação do diagnóstico pode ser reforçada se forem encontradas hipoalbuminemia e hiperglobulinemia associadas à trombocitopenia (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001).

A erliquiose canina pode ser diagnosticada através da detecção de mórulas no citoplasma de leucócitos em esfregaços sanguíneos e de medula óssea (ANDEREG & PASSOS, 1999).

A detecção de antígenos plasmáticos é um método limitado de diagnóstico. Apesar da detecção desses antígenos ocorrer entre 15 e 20 dias após a infecção experimental com *E. canis*, eles permanecem nesses níveis por um período de tempo muito variável, sendo por isso ineficiente no diagnóstico precoce da doença (ANDEREG & PASSOS, 1999).

O diagnóstico pode ser feito sorologicamente empregando-se a técnica de imunofluorescência indireta, que normalmente é empregada em universidades e clínicas particulares, *Western immunoblotting* e *dot-blot enzyme linked-immunoassay (dot-blot ELISA)*. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem sido utilizado na pesquisa de *E. canis* em monócitos sanguíneos e em tecidos. O reisolamento e cultivo da *E. canis* de sangue e tecidos também é utilizado como método de diagnóstico (ANDEREG & PASSOS, 1999; BABO *et al.*, 2001).

2.2.10.1 Exames de esfregaços sanguíneos

Para a confecção dos esfregaços sanguíneos, pode-se utilizar sangue total, sem anticoagulante, coletado do ápice da orelha do animal. O esfregaço deverá ser fixado com álcool metílico e depois corado (ANDEREG & PASSOS, 1999).

As inclusões intracitoplasmáticas de *E. canis* ou mórulas coram-se de roxo com o corante de Wright e de azul com o corante de Giemsa. As células contendo as mórulas são

encontradas com maior frequência na borda franjada do esfregaço sanguíneo, em monócitos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (ANDEREG & PASSOS, 1997). A identificação de mórulas nos esfregaços sanguíneos é difícil, sendo encontradas apenas nas duas primeiras semanas da infecção e em pequenas quantidades (BREITSCHWERDT, 1997), devido à baixa parasitemia e a porcentagem de células infectadas raramente ultrapassarem 1%. A observação de *E. canis* nos leucócitos é mais frequente na fase aguda da doença (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Apesar disso, é um método que não requer equipamentos sofisticados para a sua realização. Necessita-se apenas de um microscópio óptico para a leitura dos esfregaços, sendo assim realizável na própria clínica ou consultório veterinário (ANDEREG & PASSOS, 1999).

2.2.10.2 Punção de medula óssea

A técnica de punção de medula óssea pode ser considerada um método em potencial para o diagnóstico da fase aguda da infecção por *E. canis*. Como há proliferação de células megacariocíticas e da série mielóide na medula óssea, pode-se realizar este exame, no qual o material deverá ser obtido através de biópsia da medula óssea, feita no ângulo externo do íleo ou no esterno, tendo-se o cuidado de não contaminar a amostra com sangue. O exame deverá ser feito no máximo uma hora após a colheita da amostra, e durante esse intervalo, o material deverá permanecer em um frasco com uma gota de EDTA a 10% (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Experimentalmente, a *E. canis* foi detectada através de punção em medula óssea de cães. Os cães foram inoculados com uma amostra brasileira de *E. canis*, isolada em Jaboticabal (SP), objetivando sua multiplicação para posterior estabelecimento de cultivos *in vitro*. Os animais foram monitorados por esfregaços sanguíneos a cada 3 dias e punções de medula óssea semanais após a infecção (PI). O parasita foi primeiramente detectado em esfregaços sanguíneos 13 dias PI, não sendo mais visualizado a partir do dia 17 PI. Entretanto, no dia 23 PI, várias formas em multiplicação foram visualizadas em material de punção de medula, em lâminas coradas pelo Giemsa (MOREIRA *et al.*, 2001).

2.2.10.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A IFI é uma técnica sensível (SHERDING, 1998), detectando anticorpos anti-*E. canis* a partir do 7º dia após a infecção, sendo a mais utilizada atualmente no diagnóstico da erliquiose canina (ANDEREG & PASSOS, 1999). É uma técnica muito específica (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001), entretanto, segundo Waner *et al.* (2000b), requer equipamentos caros e pessoal treinado.

A IFI é utilizada desde 1972, sendo aplicável tanto para estudos de infecções experimentais como para estudos epidemiológicos de campo. Os antígenos utilizados geralmente são procedentes de cultivo de células infectadas com *E. canis*. Os soros que apresentam reação em diluição igual ou maior a 1:10 podem ser considerados como positivos, porém títulos de 20 a 80 são considerados relativamente baixos. Resultados falso-negativos podem ocorrer se o antígeno não for de boa qualidade ou se o técnico for inexperiente, e resultados falso-positivos podem ser observados se a amostra de soro estiver contaminada por bactérias (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Nos exames de IFI, de acordo com Munhoz & Babo (1998), pode ocorrer uma reatividade cruzada antigênica significativa entre as várias espécies de *Ehrlichia*, mas consideravelmente há reação cruzada sorológica e limitada entre *E. canis* e muitos patógenos caninos não erliquiais comuns. Os títulos podem não ser detectáveis em duas a três semanas pós-inoculação. Como no caso de outras doenças infecciosas, os títulos altos não conferem proteção contra reinfecção e podem persistir por 9 a 12 meses (SHERDING, 1998).

Nas reações cruzadas observadas com outros patógenos, o título de IgG é sempre maior para a espécie que causa a infecção. A reação cruzada entre a *E. canis* e a *E. platys* não é um problema significativo. Foi demonstrado que a reação cruzada entre a *E. canis* e a *E. risticii* é mínima, e que os títulos da IFI eram pelo menos oito vezes maiores para a espécie responsável pela infecção. Na IFI ocorre uma forte reação cruzada entre as espécies *E. canis* e a *E. chaffeensis*, impossibilitando a diferenciação entre as duas espécies através desta técnica. Reação cruzada entre a *E. canis* e a *Cowdria rumminantium* já foi descrita e, por isso deve-se tomar cuidado ao interpretar resultados de diagnóstico sorológico de *E.*

canis em regiões onde ocorre a *Cowdria rumminantium* (África, Índia e Madagascar). Esta doença ainda não foi descrita no Brasil. É possível utilizar *C. rumminantium* como antígeno na pesquisa de anticorpos anti-*E. canis*, minimizando o problema de diminuição da virulência da *E. canis* devido a passagens sucessivas em cultura de monócitos. Há relatos de que soros de cães infectados experimentalmente com *E. canis* reagem tanto com antígenos de *E. canis* como com os de *C. rumminantium*, entretanto o soro de animais infectados com *C. rumminantium* tem títulos quatro a cinco vezes maiores frente a antígenos de *C. rumminantium*. Com a IFI não é possível identificar em qual fase da infecção o animal se encontra. Um título positivo demonstra somente que o animal foi exposto ao agente em algum momento (ANDEREG & PASSOS, 1999).

2.2.10.4 *Western Immunoblotting* (WI)

O *Western Immunoblotting* é quase tão sensível quanto a IFI no diagnóstico da *E. canis*, e tem a grande vantagem da objetividade da leitura. Porém é uma técnica cara, consome mais tempo e necessita de uma tecnologia mais avançada do que a IFI (ANDEREG & PASSOS, 1999).

O WI identificou anticorpos anti-*E. canis* a partir do 4º dia após a infecção. A intensidade da reação foi máxima entre os dias 10 e 14 após a infecção. Utilizando-se esta técnica, foi observado que o soro anti-*E. canis* reage fortemente com as regiões imunodominantes 25 e 32 kDa do antígeno de *C. rumminantium*, enquanto que soro anti- *C. rumminantium* reage fracamente com a região imunodominante 27 kDa do antígeno da *E. canis*, o que demonstra que os antígenos têm epitopos semelhantes (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Foi constatado que pode ocorrer reação cruzada de *E. canis* com *E. equi* no WI, não sendo, portanto, confiável para confirmação de infecção por *E. equi*. Além disso, foi observado que, com base na análise do WI para *E. canis* e *E. equi*, o teste de imunofluorescência indireta não é específico, podendo ocorrer muitos falso-negativos (SUKSAWAT *et al.*, 2000).

2.2.10.5 Kits de diagnóstico

Existem *kits* comerciais para o diagnóstico da erliquiose canina que se baseiam no princípio do *dot-blot*-ELISA (*Dot-Blot Enzyme Linked-Immunoassay*). Este teste é tão sensível e específico quanto a IFI para a detecção de anticorpos no soro. Os resultados são de fácil leitura por pessoal não treinado e proporcionam um registro permanente. O *kit Immunocomb* (BIOGAL), é capaz de determinar anticorpos do tipo IgG específicos para o parasito. O teste pode ser realizado com sangue total ou soro, é de fácil execução, rápido, e a leitura é direta, observando-se a coloração final da reação. No mercado brasileiro esses *kits* ainda não são produzidos, porém já são importados e largamente empregados em Israel, nos Estados Unidos e em alguns países da Europa (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Este teste é muito útil no monitoramento dos níveis de anticorpos, principalmente nas fases subclínica e crônica, onde é muito difícil o encontro da *E. canis* em esfregaço sanguíneo. É também útil no monitoramento dos níveis de anticorpos pós-tratamento (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001).

Um trabalho feito por Waner *et al.* (2000b), comparou o teste de imunofluorescência indireta e o *kit* ELISA, e concluiu-se que ambos são igualmente sensíveis na detecção de anticorpos IgG contra *E. canis*.

2.2.10.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica sensível (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001) e específica para a detecção de pequenas quantidades de *E. canis*, podendo ser empregada no diagnóstico a partir de amostras de necropsia e de material de biópsia, possibilitando desse modo um levantamento da doença (LEGATZKI & JORGE, 2002). Com a utilização dessa técnica foi possível o isolamento de DNA de *E. canis* de células mononucleadas de sangue e tecidos (pulmões, baço, linfonodos, rins, cérebro e olhos) de animais infectados. A principal vantagem da PCR é que permite identificar a espécie de erlíquia causadora da infecção, o que nem sempre é possível com outras técnicas. Porém é uma técnica cara e, para ser empregada no diagnóstico de animais

suspeitos de serem portadores da *E. canis*, deve-se aumentar a sensibilidade da seqüência alvo de DNA (*primers*) (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Nos Estados Unidos, Mathew *et al.* (2000) desenvolveram um novo método de PCR, usando *primers* de biotina específicos para *E. canis* (PCR-BP). Os resultados mostraram que o teste é sensível para detecção deste protozoário, sendo que os resultados são obtidos mais rapidamente do que com o PCR convencional, sendo constatada a infecção já na primeira semana após a exposição ao parasita. Alves *et al.* (2002b) desenvolveram dois novos *primers* brasileiros.

No Japão, foi feito um trabalho de detecção do DNA de *E. platys* em *Rhipicephalus sanguineus* coletados de cães (INOKUMA *et al.*, 2000), sendo talvez a base para novas pesquisas neste ramo.

2.2.10.7 Reisolamento da *E. canis*

O reisolamento da *E. canis* de células mononucleares do sangue e de tecidos é considerado o teste mais sensível para o diagnóstico da erliquiose canina, sendo possível dois dias após a infecção experimental. Porém essa técnica é muito demorada, levando de 14 a 34 dias, tem alto custo e exige equipamento adequado para o cultivo celular. Devido a sua alta sensibilidade, este é o teste de escolha para avaliar a eficiência de um quimioterápico (ANDEREG & PASSOS, 1999).

O trabalho realizado por Sreekumar *et al.* (2000) concluiu que a cultura de monócitos de sangue periférico pode ser o diagnóstico de eleição para animais portadores. O crescimento do parasita ocorreu após 10 dias, sendo confirmado através de sua morfologia, coloração e crescimento característicos na cultura, e através da imunofluorescência indireta.

2.2.11 Tratamento

Segundo Vignard-Rosez *et al.* (2001), o objetivo do tratamento é curar os animais doentes e prevenir a manutenção e a transmissão da doença pelos portadores assintomáticos. Para tanto, existem várias drogas eficientes no combate à erliquiose canina, dentre elas a tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina associada ou não ao dipropionato de imidocarb, minociclina e cloranfenicol.

Destas drogas, a tetraciclina (22 mg/kg a cada 8 horas) e seus derivados doxiciclina (25 mg/kg a cada 8 horas) e minociclina (20 mg/kg a cada 12 horas) são os mais amplamente empregados. A duração da terapia é tão importante quanto a dosagem ou o quimioterápico utilizado. O tratamento deve persistir por pelo menos 3 a 4 semanas nos casos que respondem eficientemente, ou por períodos maiores que 8 semanas naqueles animais que estão na fase crônica da doença (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Segundo Babo *et al.* (2001), o tratamento com oxitetraciclina injetável de longa ação, na dosagem de 20 mg/kg, via intramuscular, a cada 72 horas, em 5 aplicações, foi considerado eficaz em seu estudo.

A doxiciclina constitui a droga de eleição no tratamento da erliquiose em todas as suas fases, pois é bem absorvida e com rapidez quando administrada por via oral e sua distribuição é ampla pelo coração, rins, pulmões, músculo (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001). A doxiciclina é mais lipossolúvel e penetra nos tecidos e fluidos corporais melhor que o cloridrato de tetraciclina e a oxitetraciclina. Esta droga deve ser empregada em animais que apresentam afecções renais, pois sua eliminação dá-se primariamente através das fezes por vias não biliares, na forma ativa (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Na literatura, existem várias indicações de dosagens e tempo de duração do tratamento da erliquiose utilizando-se a doxiciclina. Recomenda-se na fase aguda a dosagem de 5 mg/kg ao dia durante 7 a 10 dias, e nos casos crônicos 10 mg/kg ao dia por 7 a 21 dias. O tratamento pode durar de 3 a 4 semanas nos casos agudos, e até 8 semanas nos casos crônicos. Alguns autores recomendam prolongar o tratamento por mais de 6 semanas nos casos de erliquiose subclínica, caso contrário existe a possibilidade da permanência do agente no animal (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001). A doxiciclina mostrou-se eficiente no

tratamento da erliquiose na fase aguda da infecção por *E. platys* e *E. canis* com os animais apresentando uma melhora no 5º dia de tratamento. Há demonstrações de que a doxiciclina não foi eficiente na eliminação da infecção causada pela *E. chaffeensis* (ANDEREG & PASSOS, 1999).

O dipropionato de imidocarb (duas aplicações de 5 mg/kg com 14 dias de intervalo), um parassimpaticomimético anticolinesterásico, é altamente efetivo em cães com erliquiose refratária e infecções mistas por *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (SHERDING, 1998). De acordo com Andereg & Passos (1999), em infecções concomitantes por estes dois parasitos, deve ser feita a associação entre doxiciclina e imidocarb.

O cloranfenicol (50 mg/kg a cada 8 horas) pode ser utilizado principalmente em filhotes com menos de 5 meses, para evitar o amarelamento do esmalte dos dentes com o uso de tetraciclinas (QUINN, 1997). Porém, seu uso é questionável em cães com citopenia (SHERDING, 1998).

Segundo Sherding (1998), outra droga que pode ser empregada no tratamento da infecção causada pela *E. canis* ou da *E. platys* é a enrofloxacina (5 mg/kg/dia). Cães tratados com a enrofloxacina apresentaram uma melhora visível, à semelhança do que foi observado com os cães tratados com doxiciclina (ANDEREG & PASSOS, 1999). Entretanto, um trabalho realizado por Neer *et al.* (1999) demonstrou que a enrofloxacina (5 ou 10 mg/kg, a cada 12 h, por 21 dias) não foi efetiva para infecção por *E. canis* induzida experimentalmente.

Freqüentemente um tratamento de suporte deve ser fornecido ao animal (VINARD-ROSEZ *et al.*, 2001). Em alguns casos, é necessária a reposição de fluidos através da fluidoterapia endovenosa e transfusões sanguíneas, além de suplementos vitamínicos (QUINN, 1997). A administração de anti-inflamatórios como prednisolona (1 a 2 mg/kg a cada 12 horas, nas duas primeiras semanas) e nas próximas duas semanas uma terapia de manutenção; ou dexametasona em doses imunossupressoras é benéfica nos casos em que a trombocitopenia é significativa (ANDEREG & PASSOS, 1999).

A resposta à terapia é avaliada através da melhoria das condições do animal. Cães na fase aguda, subclínica ou no início da fase crônica apresentam melhora visível dentro de 24 a 48 horas após o início do tratamento (BREITSCHWERDT, 1997). Esta melhora clínica geralmente é acompanhada por uma melhora do quadro hematológico. Com a

eliminação do parasita ocorre um decréscimo da concentração de gamaglobulina (ANDEREG & PASSOS, 1999).

O prognóstico depende da fase em que se encontra o animal e do momento em que foi iniciado o tratamento (SHERDING, 1998). Na fase aguda da doença o prognóstico é favorável quando o tratamento é adequado. Já na fase subclínica, o prognóstico é de favorável a reservado, já que afeta cães assintomáticos ou com risco de desenvolverem a fase crônica da doença. O prognóstico da fase crônica é de desfavorável a grave nos cães com hipoplasia não regenerativa da medula óssea. Quando o tratamento é bem sucedido, o animal elimina a *E. canis* e dentro de 9 a 12 meses os níveis de anticorpos declinam. Então o cão torna-se novamente suscetível à doença, pois a imunidade protetora da erliquiose canina depende claramente do estado de premunicação. A persistência de altos títulos de anticorpos após o tratamento pode indicar uma resposta imune exacerbada ou uma falha no tratamento (ANDEREG & PASSOS, 1999).

2.2.12 Prevenção

A prevenção da doença tem um caráter de suma importância nos canis e nos locais de grande concentração de animais, devendo ser feita principalmente através do controle de carrapatos (SHERDING, 1998). Além disso, nos animais assintomáticos deve ser feito um sistema de identificação sorológica dos animais positivos (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001). Deve-se, segundo Andereg & Passos (1999), tratá-los e 5 semanas após, retestá-los para confirmar que estão negativos, antes de introduzi-los em áreas livres.

Nas áreas endêmicas, quando houver fluxo de animais, recomenda-se o tratamento com doxiciclina por um período de 1 mês (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001) ou a profilaxia a longo prazo com tetraciclina (6,6 mg/kg/dia) ou a oxitetraciclina de longa ação (200 mg/kg IM duas vezes por semana) por períodos que abranjam pelo menos uma geração de carrapatos (BREITSCHWERDT, 1997). Conforme Sherding (1998), pode-se utilizar nas

áreas endêmicas durante a estação de carrapatos, doses baixas de tetraciclina (3 mg/kg, VO, cada 24 h) ou doxiciclina (1 a 2 mg/kg, VO, cada 24h).

Segundo Andereg & Passos (1999), os cães utilizados como doadores de sangue devem ser negativos para a *E. canis* em dois testes sorológicos consecutivos feitos com intervalo de 4 semanas.

Ainda não existem vacinas disponíveis no mercado para a prevenção da erliquiose canina (BREITSCHWERDT, 1997; ANDEREG & PASSOS, 1999; VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2001).

2.2.13 Erliquiose em Humanos

A erliquiose apresenta um importante potencial zoonótico, sendo o carrapato o vetor deste e de outros patógenos, caracterizado por sintomatologia inespecífica no homem (LEGATZKI & JORGE, 2002). Segundo Buller *et al.* (1999), 4 espécies podem infectar o homem: *E. chaffeensis*, *E. sennetsu*, *E. canis* e *E. ewingii*. A erliquiose humana é uma doença emergente caracterizada por febre, cefaléia, mal estar, mialgia, náusea, exantema (ZIKONOV & POTASMAN, 1999), trombocitopenia, leucopenia e aumento de enzimas hepáticas. A maioria dos pacientes tem histórico de contato com carrapatos (ANDEREG & PASSOS, 1999).

O primeiro registro de infecção humana ocorreu em 1987, e o agente foi identificado com *E. chaffeensis*, causador da erliquiose humana (HARRUS *et al.*, 1997 *apud* LEGATZKI & JORGE, 2002).

Em Israel, o primeiro caso de erliquiose em humanos foi de um homem de 52 anos, que havia sido hospitalizado com febre, exantema difuso, artralgia e epididimite. A biópsia de pele revelou necrose de pequenos vasos, consistente com periarterite nodosa. A febre rapidamente diminuiu após o início do tratamento com ciprofloxacina (ZIKONOV & POTASMAN, 1999). Segundo Pick *et al.* (2000), algumas formas de vasculite, em humanos, podem estar associadas à infecção por *E. chaffeensis*.

Segundo Quinn (1997), a infecção por *E. canis* não é considerada um grande problema de saúde pública, pois a erliquiose humana nos Estados Unidos está atribuída à *E. chaffeensis* e não à *E. canis* como se achava anteriormente.

Na Califórnia, o estudo da prevalência de anticorpos para a erliquiose granulocítica (*Ehrlichia equi* ou agente da erliquiose granulocítica humana) é realizado em pumas e outros vertebrados, a fim de indicar as regiões geográficas de risco de erliquiose para humanos. Foi realizado um trabalho com 47 pumas, de 1996 a 1998, obtendo-se uma soroprevalência de 17% e uma positividade de 16% pelo método PCR (FOLEY *et al.*, 1999).

Provavelmente com o mesmo intuito, Waner *et al.* (1999) realizaram um trabalho com chacais que vivem livres na natureza. A alta prevalência de anticorpos dos genogrupos *E. canis* e *E. phagocytophila* deve ser levada em consideração, uma vez que há possibilidade dos chacais poderem ser transmissores desses protozoários para caninos e humanos.

Também foi encontrada uma alta prevalência de *E. chaffeensis* em coiotes de vida livre em Oklahoma. De 21 coiotes testados através de PCR para *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chaffeensis*, 15 (71%) foram positivos para *E. chaffeensis*. Portanto, esses caninos silvestres devem desempenhar um papel importante na epidemiologia da erliquiose monocítica humana (KOCAN *et al.*, 2000).

Em 1991 foi descrito um caso de erliquiose humana nos Estados Unidos, no qual os exames morfológicos das inclusões intraleucocitárias sugeriam que o agente causal era a *E. canis*. O seqüenciamento de r-RNA indicou uma semelhança de 98,7% entre o agente causal isolado do paciente e a *E. canis*, e de 86,8% entre a *E. risticci* e os exames sorológicos, IFI, do paciente foram positivos para *E. canis*. Todos esses resultados sugeriram que o agente causal era a *E. canis*, mas os resultados não eram confirmatórios (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Vários trabalhos mostram a semelhança entre as duas espécies de erlíquias. Ao se analisar a seqüência de r-RNA das duas espécies observou-se uma semelhança de 98,2%. A *E. canis*, a *E. chaffeensis* e a *E. ewingii* pertencem ao mesmo grupo filogenético. Na reação de imunofluorescência observa-se uma forte reação cruzada entre *E. canis* e *E. chaffeensis*. Como a *E. chaffeensis* já foi isolada de cães com erliquiose e como agente da erliquiose

humana, o agente causal deste caso descrito em 1991 bem pode ser a *E. chaffeensis* (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Unver *et al.* (2001) realizaram um trabalho de comparação antigênica e molecular de *E. canis* isolada de cães, carrapatos e humanos na Venezuela. Foi constatado que a sequência genética 16S rRNA e o perfil antigênico deste parasita nas três espécies apresentaram-se idênticos, sugerindo que os cães servem de reservatório e o *R. sanguineus* serve como vetor para humanos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras:

Foram utilizadas amostras de sangue de animais da espécie canina submetidos a atendimento clínico veterinário na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, no período de novembro de 2001 a novembro de 2002.

As amostras de sangue analisadas para pesquisa de hemocitozoários foram provenientes de caninos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS) ou amostras recebidas pelo laboratório de análises clínicas PETLAB oriundas de atendimentos domiciliares, consultórios, clínicas ou hospitais veterinários.

O cálculo do tamanho da amostra foi determinado conforme Thrusfield (1986), para uma expectativa de prevalência de 20%, com uma precisão absoluta de 5% e com um nível de confiança de 95%.

Foram utilizados 250 cães, com alguma suspeita de hemoparasitose, seja pelo histórico, sintomatologia ou exame clínico. Os animais eram de diferentes raças e de ambos os gêneros, sendo categorizados de acordo com a idade (obtida através de informações do proprietário) em 2 grupos:

GRUPO I – constituído por 65 cães com idade igual ou inferior a 1 ano, sendo 23 machos e 42 fêmeas;

GRUPO II – constituído por 185 cães com mais de 1 ano de idade, sendo 83 machos e 102 fêmeas.

As amostras de sangue foram coletadas através de punção jugular ou cefálica, em tubo estéril contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético), sendo aquelas do HCV - UFRGS enviadas diretamente ao Laboratório de Protozoologia. Das amostras recebidas pelo PETLAB, eram confeccionados os esfregaços e, posteriormente enviados ao Laboratório de Protozoologia.

3.2 Técnicas de Coloração

O esfregaço foi realizado até 12 horas após a coleta, sendo que as amostras ficaram armazenadas sob refrigeração. As lâminas foram identificadas e guardadas em caixa de madeira até o momento da análise.

Foram realizados esfregaços sanguíneos, sendo confeccionadas duas lâminas de cada amostra e coradas uma pelo Método de Giemsa e a outra com o *kit* Panótico Rápido. Posteriormente, as lâminas foram examinadas na sua totalidade com objetiva de imersão (1000X).

As confecções dos esfregaços, a partir da distensão do sangue, foram realizadas colocando-se uma pequena gota de sangue com a capilar de microhematócrito em uma das extremidades de uma lâmina de vidro limpa e desengordurada. A distensão da gota foi feita com o auxílio de outra lâmina de vidro, com um ângulo de 45°, avançando até a outra extremidade da lâmina base suavemente. Após, foram secadas por agitação vigorosa imediata ou com secador de cabelos, rapidamente, para que não houvesse hemólise. Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo Método de Giemsa e Panótico Rápido.

3.2.1 Método de Giemsa

As lâminas com esfregaços foram cobertas com álcool metílico por 3 minutos para sua fixação. Após, foram secadas com secador de cabelos, e então cobertas com solução comercial de Giemsa. Transcorridos de 10 a 20 minutos, eram enxaguadas em água corrente e novamente secadas para então serem analisadas no microscópio com óleo de imersão em aumento de 1000 vezes.

3.2.2 Panótico Rápido

Para esta coloração foi usado o *kit* comercial Panótico Rápido LB – Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. O Panótico Rápido LB baseia-se no princípio de

coloração hematológica estabelecida por Romanowsky, atuando em 15 segundos. A extensão hematológica é submetida a ação de um fixador e duas soluções corantes, por meio de imersões de 5 segundos cada, e ao final da última imersão encontra-se pronta para a leitura. O reagente número 1 compõe-se de uma solução de triarilmetano a 0,1%, o número 2 de uma solução xanteno a 0,1%, e o número 3, uma solução de tiazinas a 0,1%. As extensões sanguíneas foram mergulhadas na solução 1, mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada), escorrendo-se o excesso de líquido em papel absorvente antes de introduzi-la na próxima cuba. Após, as lâminas foram submersas na solução 2 e 3 da mesma forma, e sendo lavadas em água corrente após a última. Secava-se com secador, para então serem analisadas ao microscópio com objetiva de imersão, colocando-se sobre a extensão corada uma gota de nujol.

Macroscopicamente, a coloração deve apresentar uma tonalidade rosada e, microscopicamente, as plaquetas devem se apresentar púrpuras com um ponto em vermelho visível. Lâminas muito vermelhas indicam acidez excessiva, e muito azuladas, alcalinidade excessiva.

3.3 Análise Estatística

- O teste exato de Fisher¹ foi utilizado nas análises comparativas;
- O teste de McNemar¹ foi utilizado nos estudos pareados;
- A *Odds Ratio*¹ foi utilizada para medir a intensidade de associação entre as variáveis gênero e idade e a positividade;
- A Porcentagem de Concordância¹ foi calculada para demonstrar o relacionamento entre os 2 métodos de coloração no número total de amostras positivas (co-positividade) e negativas (co-negatividade), segundo Araújo (1999) e Fialho (2002).
- A estatística de Kappa (LANDIS & KOCH, 1977) foi utilizada para medir a intensidade de associação entre as variáveis gênero e idade e a positividade.

¹ Graphpad Instat, Copyright©, 1990-1993, Graphpad Software, v2.04

4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa de Hemocitozoários

Através da análise das lâminas de 250 animais, foram encontradas 45 positivas para hemocitozoários (*Babesia* spp ou *Ehrlichia* spp). A estimativa de ponto do valor populacional da frequência foi de 18% e para um intervalo de confiança de 95%, usando-se aproximação normal variou entre 13,24% a 22,76%.

Na Tabela 1, observamos os resultados encontrados de acordo com a faixa etária, sendo que os cães com idade igual ou menor a 1 ano apresentaram 7 amostras positivas para hemocitozoários. E dos cães com mais de 1 ano de idade, 38 apresentaram-se positivos.

TABELA 1 – Frequência de hemocitozoários em caninos, conforme a faixa etária, na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil.

RESULTADO/ IDADE	Grupo I (≤ 1 ano)	Grupo II (> 1 ano)	TOTAL
POSITIVOS	7 (3%)	38 (15%)	45 (18%)
NEGATIVOS	58 (23%)	147 (59%)	205 (82%)
TOTAL	65 (26%)	185 (74%)	250 (100%)

O Teste Exato de Fisher aplicado aos dados da Tabela 1, revelou não haver diferença significativa entre os resultados, nos caninos menores ou igual a 1 ano de idade e naqueles maiores de 1 ano ($p= 0,0919$). Enquanto a *Odds ratio* calculada a partir dos dados encontrados foi igual a 2,142.

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos nas análises laboratoriais para hemocitozoários (*Babesia* spp e *Ehrlichia* spp), de acordo com a idade dos animais.

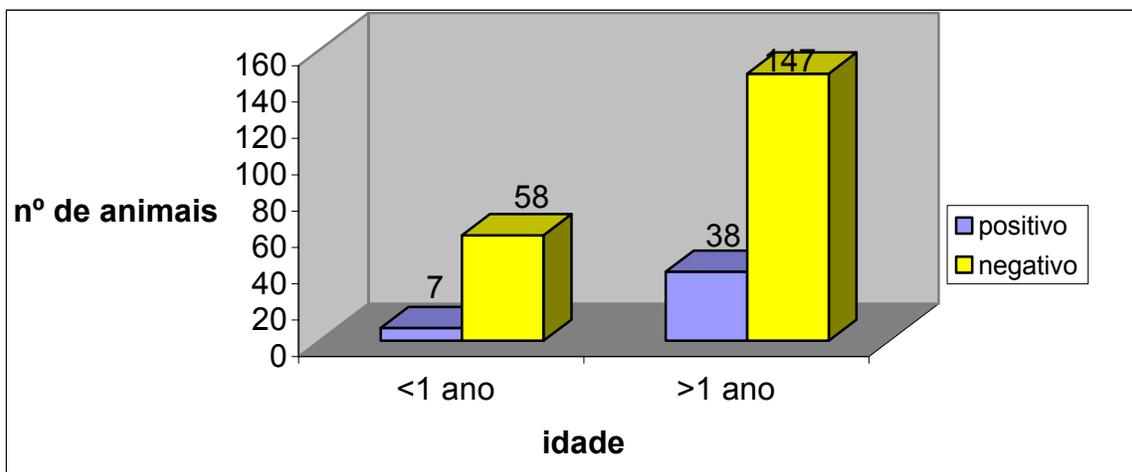


FIGURA 1 – Resultados das análises laboratoriais de esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemocitozoários, conforme a faixa etária.

Os resultados obtidos através da metodologia proposta em função do gênero dos animais estão demonstrados na Tabela 2. Dos 106 machos analisados, 16 apresentaram amostras com resultado positivo para hemocitozoários; enquanto das 144 fêmeas, 29 foram positivas.

TABELA 2 – Resultados da pesquisa de hemocitozoários em caninos de Porto Alegre, RS, Brasil, de acordo com o gênero.

RESULTADO / GÊNERO	MACHOS	FÊMEAS	TOTAL
POSITIVOS	16 (6%)	29 (12%)	45 (18%)
NEGATIVOS	90 (36%)	115 (46%)	205 (82%)
TOTAL	106 (42%)	144 (58%)	250 (100%)

O Teste Exato de Fisher aplicado aos dados da Tabela 2 revelou não haver diferença significativa entre os resultados, para machos e fêmeas, dos dois grupos etários estudados ($p=0,3231$). A *Odds ratio* calculada a partir dos dados encontrados foi igual a 0,7050.

A Figura 2 demonstra os resultados encontrados, com os dados agrupados em função do gênero dos animais.



FIGURA 2 – Resultado das amostras de esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemocitozoários, em caninos, de acordo com o gênero.

4.2 Pesquisa de *Babesia* spp

Considerando-se a frequência de *Babesia* spp, obteve-se das 250 amostras analisadas, 25 positivas (10%), sendo que, para um intervalo de confiança de 95%, usando-se aproximação normal, variou entre 6,28 e 13,72%.

A Figura 3 apresenta um esfregaço sanguíneo, corado pelo Método de Giemsa, positivo para *Babesia* spp.

Figura 3 – Lâmina positiva para *Babesia* spp, corada pelo método de Giemsa
(aumento de 1000 x)

Na Tabela 3, observamos os resultados encontrados nos cães do grupo I, apresentando 3 amostras positivas para *Babesia* spp nos 65 exames realizados. E, das 185 amostras analisadas nos cães do grupo II, 22 apresentaram-se positivas, conforme dados discriminados de acordo com a faixa etária.

TABELA 3 – Resultados da pesquisa de *Babesia* spp, de acordo com a faixa etária, em caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.

RESULTADO/ IDADE	Grupo I (≤ 1 ano)	Grupo II (>1 ano)	TOTAL
POSITIVOS	3 (1%)	22 (9%)	25 (10%)
NEGATIVOS	62 (25%)	163 (65%)	225 (90%)
TOTAL	65 (26%)	185 (74%)	250 (100%)

O Teste Exato de Fisher foi aplicado aos dados da Tabela 3, revelando não haver diferença significativa nos resultados entre os animais com idade igual ou inferior a 1 ano e mais de 1 ano de idade, em ambos os gêneros ($p= 0,1493$). A *Odds ratio* calculada a partir dos dados encontrados foi igual a 2,789.

A Figura 4 apresenta o resultado obtido na análise de esfregaços sanguíneos para pesquisa de *Babesia* spp, conforme a faixa etária.

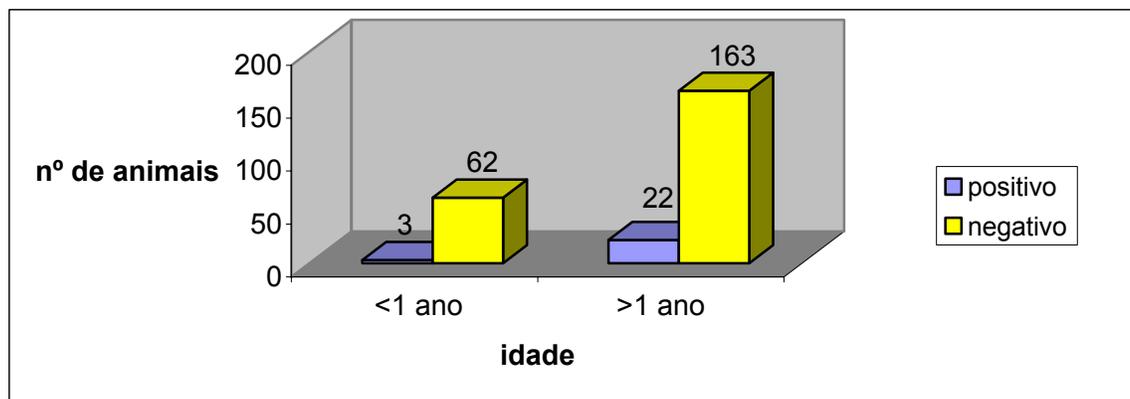


FIGURA 4 – Frequência absoluta de *Babesia* spp em esfregaços sanguíneos de caninos, de acordo com a faixa etária.

A Tabela 4 apresenta os resultados encontrados na pesquisa de *Babesia* spp em caninos de acordo com o gênero. Dos 106 machos analisados, 12 apresentaram-se positivos para *Babesia* spp. E, das 144 fêmeas, 13 foram positivas para o mesmo parasita.

TABELA 4 – Resultados da pesquisa de *Babesia* sp, conforme o gênero, em caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.

RESULTADO / GÊNERO	MACHOS	FÊMEAS	TOTAL
POSITIVOS	12 (5%)	13 (5%)	25 (10%)
NEGATIVOS	94 (38%)	131 (52%)	225 (90%)
TOTAL	106 (43%)	144 (57%)	250 (100%)

O Teste de Fisher, aplicado aos dados da Tabela 4, revelou não haver diferença significativa em relação ao gênero dos dois grupos etários estudados ($p= 0,6704$). A *Odds ratio* calculada a partir dos dados encontrados para frequência de *Babesia* spp, em relação à idade, foi igual a 2,789.

A Figura 5 apresenta o resultado da pesquisa de *Babesia* spp em esfregaços sanguíneos de caninos, de Porto Alegre, RS, Brasil, de acordo com o gênero.

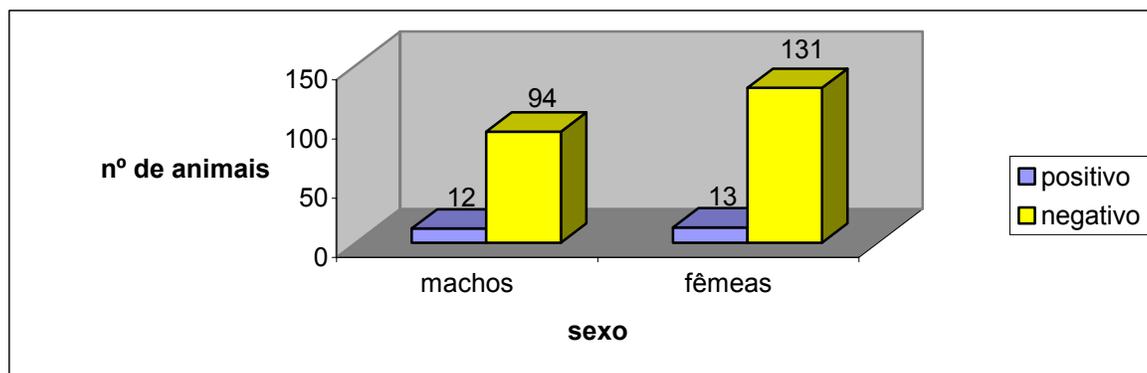


FIGURA 5 – Frequência absoluta de *Babesia* spp em esfregaços sanguíneos, conforme o gênero.

4.3 Pesquisa de *Ehrlichia* spp

Em relação à frequência de animais para *Ehrlichia* spp, dos 250 animais estudados, a positividade foi de 20 (8%), variando de 4,64 a 11,36% para um intervalo de confiança de 95%, usando-se aproximação normal.

A Figura 6 apresenta um esfregaço sanguíneo, corado pelo Método Panótico Rápido, com um neutrófilo apresentado uma mórula de *Ehrlichia* spp.

Figura 6 – Lâmina positiva para *Ehrlichia* spp, corada com o *Kit* Panótico Rápido
(aumento de 1000 x)

Observamos, na Tabela 5, os resultados obtidos em animais com idade igual ou inferior a 1 ano, apresentando 4 positivas para *Ehrlichia* spp nos 65 animais estudados. Das 185 amostras de caninos com idade superior a 1 ano, 16 apresentaram-se positivas.

TABELA 5 – Resultados da análise de esfregaços sangüíneos para *Ehrlichia* spp, de acordo com a faixa etária, de caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.

RESULTADO/ IDADE	Grupo I (≤ 1 ano)	Grupo II (>1 ano)	TOTAL
POSITIVOS	4 (2%)	16 (6%)	20 (8%)
NEGATIVOS	61 (24%)	169 (68%)	230 (92%)
TOTAL	65 (26%)	185 (74%)	250 (100%)

Ao ser aplicado o Teste de Fisher nos resultados das Tabelas 5, constatou-se que não houve diferença significativa entre os resultados, dos animais com idade menor ou igual a 1 ano e aqueles com mais de 1 ano de idade, de ambos os gêneros ($p= 0,6067$). A *Odds ratio* calculada a partir dos dados analisados para frequência de *Ehrlichia* spp, de acordo com a idade, foi igual a 1,444.

A Figura 7 apresenta o resultado da análise laboratorial de esfregaços sanguíneos para pesquisa de *Ehrlichia* spp, segundo a faixa etária, de caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.

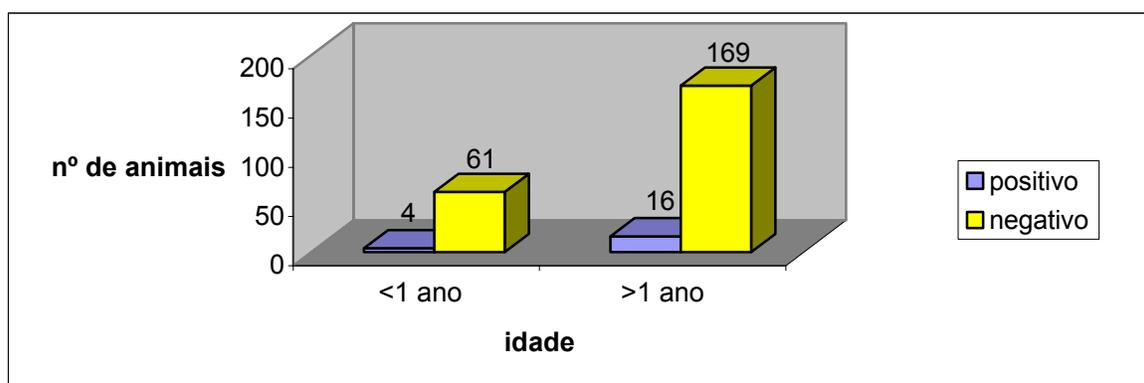


FIGURA 7 – Resultados da pesquisa de *Ehrlichia* spp em esfregaços sanguíneos de caninos, de acordo com a faixa etária.

A Tabela 6 apresenta os resultados encontrados nas amostras dos 106 machos analisados, com 4 positivos para *Ehrlichia* spp; enquanto que das 144 fêmeas, 16 apresentaram-se positivas para este parasita, segundo dados expostos na Tabela 6 de acordo com o gênero.

TABELA 6 - Resultados da análise de esfregaços sanguíneos de caninos para *Ehrlichia* spp, conforme o gênero, em Porto Alegre, RS, Brasil.

RESULTADO / GÊNERO	MACHOS	FÊMEAS	TOTAL
POSITIVOS	4 (2%)	16 (6%)	20 (8%)
NEGATIVOS	102 (41%)	128 (51%)	230 (92%)
TOTAL	106 (42%)	144 (58%)	250 (100%)

Ao ser aplicado o Teste de Fisher nos resultados das Tabelas 6, foi constatado que não houve diferença significativa entre os resultados, dos animais em relação ao gênero ($p=0,0363$). A *Odds ratio* calculada a partir dos dados analisados para frequência de *Ehrlichia* spp, de acordo com o gênero, foi igual a 0,3137.

Na Figura 8 pode ser observado o número de animais positivos para *Ehrlichia* spp, conforme o gênero.

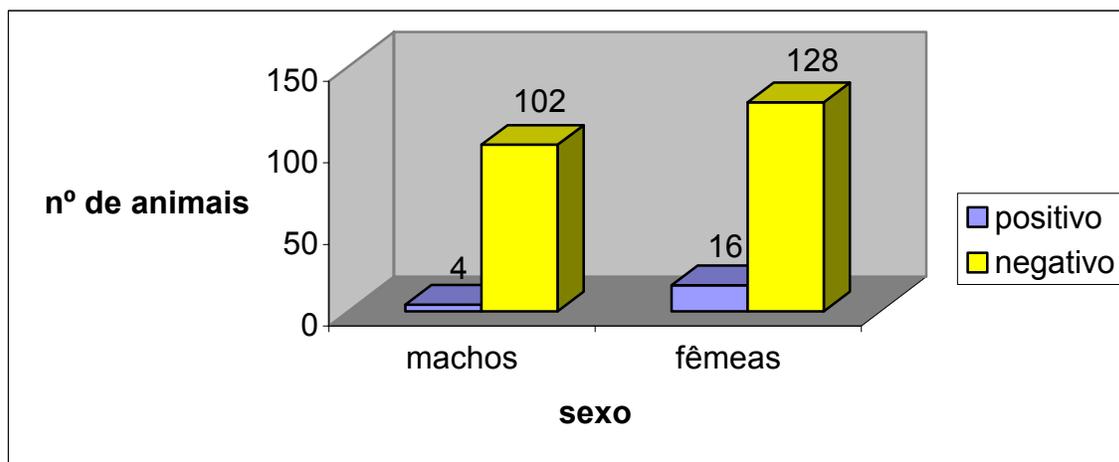


FIGURA 8 –Resultado da pesquisa de esfregaços sanguíneos para pesquisa de *Ehrlichia* spp, em caninos de acordo com o gênero.

4.4 Técnicas de Coloração

4.4.1 *Babesia* spp

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos através das colorações de Giemsa e Panótico Rápido na pesquisa de *Babesia* spp, em caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.

TABELA 7 – Comparação dos resultados da pesquisa de *Babesia* spp, com as colorações Giemsa e Panótico Rápido, em esfregaços sanguíneos de caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.

TÉCNICAS	Panótico +	Panótico -	TOTAL
Giemsa +	3 (1,2%)	18 (7,2%)	21 (8,4%)
Giemsa -	4 (1,6%)	225 (90%)	229 (91,6%)
TOTAL	7 (2,8%)	243 (97,2%)	250 (100%)

O Teste McNemar aplicado aos dados da Tabela 7 detectou uma diferença significativa entre as duas técnicas para um $\alpha = 5\%$ ($p = 0,0056$ considerado significativo), enquanto o valor Kappa calculado foi 0,18.

Segundo os dados da Tabela 7, a porcentagem de concordância de resultados positivos para *Babesia* spp, nas duas colorações, foi de 14,3%, e a porcentagem de concordância de resultados negativos foi de 98,2%, perfazendo uma porcentagem de concordância total de 91,2%.

Ainda de acordo com a Tabela 7, foram positivas 8,4% das amostras na coloração de Giemsa, enquanto que o Panótico Rápido detectou 2,8% de positividade. Do total de amostras, 25 foram positivas em ambas as colorações, ou ao menos em uma coloração, enquanto 229 (91,6%) foram negativas na coloração de Giemsa e 243 (97,2%) negativas no Panótico Rápido.

Também de acordo com a Tabela 7, encontraram-se 22 amostras não concordantes quanto à negatividade e positividade, dos quais verificou-se que 18 foram positivos para Giemsa e negativos para o Panótico Rápido, sendo considerados falsos negativos, e 4 amostras foram negativas para Giemsa e positivas para o Panótico Rápido, sendo falsos positivos, considerando-se a coloração de Giemsa como método padrão de coloração para *Babesia* spp.

4.4.2 *Ehrlichia* spp

Na Tabela 8 pode-se observar os resultados obtidos, conforme a coloração utilizada, na pesquisa de *Ehrlichia* spp na totalidade das amostras analisadas.

TABELA 8 – Comparação dos resultados da pesquisa de *Ehrlichia* spp, com as colorações Giemsa e Panótico Rápido, em esfregaços sanguíneos de caninos de Porto Alegre, RS, Brasil.

TÉCNICAS	Panótico +	Panótico -	TOTAL
Giemsa +	0 (0%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)
Giemsa -	19 (7,6%)	230 (92%)	249 (99,6%)
TOTAL	19 (7,6%)	231 (92,4%)	250 (100%)

O Teste McNemar aplicado aos dados da Tabela 8 detectou uma diferença significativa entre as duas técnicas para um $\alpha = 5\%$ ($p = 0,0001$, considerado extremamente significativo), enquanto o valor Kappa calculado foi zero.

Segundo os dados da Tabela 8, a porcentagem de concordância de resultados positivos para *Ehrlichia* spp nas duas colorações foi de zero, e a porcentagem de concordância de resultados negativos foi de 92,3%, perfazendo uma porcentagem de concordância total de 92%.

Ainda segundo esta tabela, 0,4% das amostras foram positivas na coloração de Giemsa enquanto que o Panótico Rápido detectou 7,6% de positividade. Do total de amostras, 20 (8%) foram positivas, sendo que 249 (99,6%) foram negativas na coloração de Giemsa e 231 (92,4%) negativas no Panótico Rápido.

De acordo com a Tabela 8, também foram encontradas 20 (todas) amostras não concordantes quanto à negatividade e positividade, dos quais verificou-se que uma foi positiva para Giemsa e negativa para o Panótico Rápido, sendo considerado falso negativo, e 19 amostras foram negativas para Giemsa e positivas para o Panótico Rápido, sendo falsos negativos, considerando-se o *kit* Panótico Rápido como método padrão para a coloração de *Ehrlichia* spp.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como um dos objetivos determinar as frequências de *Babesia* spp e *Ehrlichia* spp em esfregaços sanguíneos de caninos com alguma sintomatologia de hemoparasitose. A amostragem foi constituída por caninos, triados clinicamente no HCV e em clínicas veterinárias particulares, com sinais clínicos de alguma enfermidade e suspeita de hemoparasitose. De acordo com Seibert (1996), doenças concomitantes podem potencializar o desenvolvimento de sinais clínicos da babesiose e erliquiose. Não foi possível, entretanto, selecionar nesta pesquisa os animais de acordo com a sintomatologia.

Através da confecção de esfregaços sanguíneos corados pelo Método de Giemsa e pelo Panótico Rápido, foram analisadas 250 amostras, sendo 45 positivas (18%) para os hemoparasitas *Babesia* spp ou *Ehrlichia* spp. Constatou-se, portanto, que a positividade em caninos atendidos em clínicas veterinárias da cidade de Porto Alegre e no HCV-UFRGS, baseada nos dados encontrados, variou de 13 a 23%, em um intervalo de confiança de 95%.

Os resultados discordam daqueles encontrados no Hospital Veterinário da ULBRA, em Canoas, RS, no período de 1999 a 2001, onde foram realizados 992 esfregaços sanguíneos, sendo 377 (38%) positivos para hemocitozoários (QUEIROLO *et al.*, 2002). Por outro lado, foi constatada uma baixa incidência de hemoparasitas em caninos do Batalhão de Operações Especiais da Polícia Militar do Distrito Federal. Dos 57 cães analisados através de esfregaço de borda de orelha, foi encontrada apenas uma mórula de *Ehrlichia* (PALUDO, 2002).

A análise dos resultados positivos para hemocitozoários, conforme a Tabela 1, em relação à idade, permitiu concluirmos que não houve diferença significativa entre animais menores ou igual a 1 ano de idade e maiores de 1 ano. Entretanto, os caninos com mais de 1 ano de idade apresentaram uma taxa de exposição ao risco aproximadamente duas vezes maior do que aqueles com idade igual ou menor a 1 ano. Isto pode ser comprovado até mesmo pela amostragem, uma vez que o maior número de amostras foi de cães com mais

de 1 ano de idade. As amostras não foram aleatórias, havendo maior suspeita clínica nesta faixa etária, e maior tempo de vida para exposição ao risco de infecção.

De acordo com a Tabela 2, observamos que não houve diferença significativa na positividade para hemocitozoários relacionada ao gênero dos animais, sendo que a taxa de exposição ao risco foi praticamente a mesma em ambos os gêneros.

A frequência de *Babesia* spp neste estudo foi de 10% (25) das 250 amostras analisadas, podendo variar de 6,28 a 13,72% (para um intervalo de confiança de 95%) nas amostras de diferentes clínicas e hospitais estudados. A faixa etária, como consta na Tabela 3, não teve relação com a positividade das amostras para *Babesia* spp. Porém, a taxa de exposição ao risco dos animais maiores de 1 ano de idade foi superior àqueles com idade igual ou menor a 1 ano.

Porém, segundo Guimarães *et al.* (2002), a *B. canis* tem sido detectada com maior prevalência em cães de até dois anos de idade do que em animais mais velhos. Trabalhos constantes da literatura demonstram que, de forma geral, quanto mais novo o cão, maior a suscetibilidade à infecção por este protozoário.

Em relação aos dados da Tabela 4, referente ao gênero dos cães, não houve relação significativa nos animais analisados para a babesiose. Também não houve diferença na taxa de exposição ao risco para machos e fêmeas deste hemoparasita. Dados encontrados na literatura confirmam que, em estudos anteriormente realizados, não há diferença significativa de positividade em relação ao gênero (GUIMARÃES *et al.*, 2002).

Os valores da frequência de babesiose encontrados são inferiores ao levantamento epidemiológico feito por Almeida *et al.* (2002) no Rio de Janeiro, no período de abril de 2000 a junho de 2001. De um total de 312 amostras de caninos, 46,47% apresentaram-se positivas para *Babesia* spp.

Em Belo Horizonte, em uma pesquisa de 194 fichas de caninos suspeitos de hemoparasitose do Hospital Veterinário da UFMG, de 1998 a 2001, 61 amostras (42%) de esfregaços sanguíneos foram positivas para *B. canis* (BASTOS *et al.*, 2002). Outros estudos soroepidemiológicos realizados em Minas Gerais apontam prevalência de cães positivos para a *B. canis* que varia entre 34,1% e 66,9% (GUIMARÃES *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Pontevedra (2000) também apresentou um elevado índice de positividade para *Babesia* spp. Dos 79 esfregaços sanguíneos da ponta da orelha corados

com Diff-Quick, 52 (66%) foram positivos, sendo o maior número destes animais (72%) com idade superior a 2 anos. Apesar de não ter havido diferença significativa em relação à faixa etária neste trabalho, há concordância pelo fato de haver maior número de amostras com mais de 1 ano de idade.

Nossos valores podem ter sido inferiores aos encontrados em outros trabalhos devido à baixa parasitemia característica da *Babesia canis*, encontrada apenas na fase aguda da doença (NEVES, 2000). Além disso, as amostras não são de origem capilar, o que aumentaria a oportunidade de visualização de hemácias parasitadas, de acordo com Taboada (1998). As amostras de sangue foram coletadas das veias cefálica ou jugular devido à rotina do HCV-UFRGS e da maioria das clínicas, que muitas vezes utilizam a mesma amostra, em outros laboratórios, para hemograma ou outros exames bioquímicos. Guimarães *et al.* (2002) citam que, como o hemograma é preparado com sangue venoso, a oportunidade de encontrar a *B. canis* é extremamente reduzida.

Silva *et al.* (2001) realizaram esfregaços sanguíneos de 22 cães de Barra Mansa, RJ, observando 2 animais positivos para *Babesia* spp e 2 para *Ehrlichia* spp. Na cidade de Salvador, BA, a prevalência de positividade para babesiose foi de 2,5% em 1568 fichas analisadas, nos anos de 1998 a 2001 (BAVIA *et al.*, 2002).

Em esfregaços sanguíneos de 250 caninos, de 7 municípios do Rio de Janeiro analisados, apenas 5,2% apresentaram-se positivos para *B. canis*, e 4,8% para *E. canis*, tendo ocorrido algumas infecções concomitantes por *Hepatozoon canis*. Destas mesmas amostras, 205 foram avaliadas pelo método de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Babesia canis*, encontrando-se 41,1% positivas, com títulos superiores a 1:40 (O'DWYER, 2000).

Os valores encontrados em amostras de esfregaços sanguíneos podem ser inferiores aos encontrados através de outras técnicas de diagnóstico, como mostra o trabalho de O'dwyer (2000), pois em infecções subagudas ou crônicas, a parasitemia é muito baixa, e o diagnóstico deve ser realizado através de provas sorológicas (NEVES, 2000).

Infecções concomitantes não foram encontradas no presente estudo, assim como no trabalho realizado por Seibert (1996), discordando de Andereg & Passos (1999) e Breitschwerdt (1997), entre outros autores que citam que o parasitismo concomitante entre hemoparasitas é comum. Em um relato de caso, foram visualizados o aparecimento

simultâneo de *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em um mesmo monócito, além da visualização de *Babesia* sp na mesma amostra de um canino procedente de Seropédica, RJ (XAVIER *et al.*, 2002).

A positividade das amostras para *Ehrlichia* spp foi de 8% (20) do total de 250 caninos estudados, podendo variar nos estabelecimentos estudados de 4,64 a 11,36%, concordando com Seibert (1996), que encontrou 10,37% de positividade em um trabalho realizado no mesmo laboratório.

De acordo com a análise da Tabela 5, não foi constatada diferença significativa em relação à faixa etária dos caninos positivos para *Ehrlichia* spp, mas os animais com mais de 1 ano de idade apresentaram uma taxa de exposição ao risco de 50% a mais em relação àqueles com idade igual ou menor a 1 ano. Entretanto, Seibert (1996) desenvolveu seu trabalho apenas com animais de até 1 ano de idade, pois justifica que animais jovens têm maior probabilidade de desenvolver sinais clínicos e mais severos que adultos, sendo que dos 14 cães positivos, 9 tinham até 6 meses e 5 tinham de 9 a 15 meses.

Os dados da Tabela 6, relacionados ao gênero dos caninos estudados para erliquiose, ao serem analisados, demonstram que não houve relação entre a positividade para machos e fêmeas, mas apesar da taxa de exposição ao risco destes dois grupos ser a mesma, as fêmeas infectaram-se mais que os machos. Esses resultados concordam com os dados de Seibert (1996), que não encontrou diferença significativa relacionada ao gênero (57% de machos e 42% de fêmeas).

Masona *et al.* (2001), na Austrália, testaram 316 soros de caninos através de imunofluorescência indireta para erliquiose canina, obtendo apenas 7 amostras positivas. Destas 7 amostras, foi realizada a PCR em 6 amostras, resultando todas negativas, e 3 amostras foram inoculadas em camundongos, que também não apresentaram anticorpos anti-*E. canis*, nem sinais clínicos da doença. Concluiu-se, portanto, que aquela região encontra-se praticamente livre deste parasita.

Já na Venezuela, 11 caninos foram avaliados através de imunofluorescência indireta, sendo que 6 (54%) foram considerados positivos para *Ehrlichia* spp (PÉREZ *et al.*, 1997).

Alves *et al.* (2002) compararam as técnicas de esfregaço sanguíneo e PCR para o diagnóstico de *E. canis*. Dos 30 cães com suspeita clínica de erliquiose, apenas 1 foi

positivo no esfregaço sanguíneo, enquanto 9 foram positivos através do PCR. Concluiu-se que o diagnóstico não é muito preciso pelo método de esfregaço sanguíneo, pois o parasito nem sempre é visualizado devido a constante flutuação da parasitemia e à baixa percentagem de células infectadas, raramente ultrapassando 1%.

O número de animais positivos para erliquiose canina encontrado poderia ser inferior ao número de casos reais, se levarmos em consideração a média de vida (cerca de 10h) de um neutrófilo na circulação sanguínea, segundo Seibert (1996), além disso, o método diagnóstico usado e o fato de alguns animais apresentarem leucopenia, dificultando a visualização de células positivas, poderia influenciar nos resultados obtidos.

A comparação das colorações de Giemsa e Panótico Rápido foi relacionada à positividade para *Babesia* spp e *Ehrlichia* spp. Conforme a Tabela 7, dos 25 esfregaços sanguíneos positivos para *Babesia* spp, 18 foram corados pelo Giemsa, 4 pelo Panótico Rápido e 3 com os dois corantes. Na análise destes dados, constatou-se que o corante Giemsa é o mais indicado para a confirmação de babesiose canina.

Na Tabela 8, observamos que das 20 amostras positivas para *Ehrlichia* spp, 19 foram coradas com o Panótico Rápido e apenas uma amostra positiva foi corada com Giemsa, não havendo nenhuma positiva com as duas colorações. O fato das amostras coradas com técnicas diferentes não terem sido concordantes pode dever-se à baixa parasitemia das amostras, não sendo visualizadas *Ehrlichia* spp em ambas as lâminas.

Em um trabalho realizado no Rio de Janeiro, no município de Goytacazes, foram encontrados valores superiores aos nossos. Foram analisadas 312 amostras de esfregaços sanguíneos corados pelo método Panótico Rápido, sendo encontrado um total de 46,47% de amostras positivas para *Babesia* spp (ALMEIDA *et al.*, 2001), discordando do presente estudo que encontrou poucas amostras positivas para *Babesia* spp pelo método Panótico Rápido.

O estudo realizado por Cardoso & Serra-Freire (2001) no Rio de Janeiro, através de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, apresentou dos 53 cães capturados no município de Teresópolis, uma prevalência de 20,75% para *Babesia canis*; enquanto no município de Silva Jardim foram encontrados 24,70% de amostras positivas dos 85 cães analisados.

Os resultados obtidos neste estudo e a revisão apresentada demonstram a importância do esfregaço sanguíneo ainda hoje na rotina da clínica de pequenos animais, quando não se dispõe de um método mais avançado. Além de obtermos um resultado rápido, devido à simplicidade do método, pode ser feito na própria clínica a baixos custos, a fim de se obter um diagnóstico imediato para se iniciar o tratamento específico mais adequado.

6 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos através da análise laboratorial de esfregaços sangüíneos, de caninos com alguma suspeita clínica, atendidos em Porto Alegre, RS, podemos concluir:

- que as infecções por *Babesia* spp e *Ehrlichia* spp estão presentes na rotina de clínicas e laboratórios, com um percentual significativo;
- que a coloração de eleição para o diagnóstico de babesiose canina deve ser realizada com o corante de Giemsa;
- que o *kit* Panótico Rápido é o método de eleição para corar os esfregaços sangüíneos suspeitos de erliquiose canina;
- na pesquisa de *Babesia* spp, de acordo com o valor Kappa calculado, houve uma concordância fraca entre as duas colorações;
- na pesquisa de *Ehrlichia* spp, de acordo com o valor Kappa calculado, houve uma rara probabilidade de concordância entre as duas colorações;
- o uso das duas técnicas de coloração em uma mesma amostra aumenta a confiabilidade dos resultados.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**. Publicación Científica n. 354. Organización Panamericana de la Salud/ Oficina Sanitaria Panamericana, Washington – USA, 1977, 708p.

ALMEIDA, A. J. *et al.* Ocorrência de *Babesia* sp. em caninos do município de Campos dos Goytacazes / RJ. In: CONGRESSO DE SAÚDE PÚBLICA, 4., 2001, Rio de Janeiro. **Resumo**. [S.l.:s.n.]. Não paginado. Disponível em: <<http://www.crmvrj.com.br/Ivcong/caninos.htm>> Acesso em 15 fev. 2003.

ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. Rio de Janeiro – RJ. **Resumo**. Tese (Doutorado). UFRRJ, 1998. Disponível em: <http://www.ufrj.br/posgrad/cppasv/tese/do/red_110.htm> Acesso em 15 fev. 2003.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose Felina: revisão. **Clínica Veterinária**, n.23, p. 30-32, 1999.

ALVES, L. M. *et al.* Comparação das técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do esfregaço sanguíneo para o diagnóstico de *Ehrlichia canis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado – RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002a. 108p.

ALVES, L. M. *et al.* Desenvolvimento de dois novos *primers* brasileiros para detecção de *Ehrlichia canis*, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado – RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002b. 108p.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, n.19, p.31-38, 1999.

ARAÚJO, F. A. P. **Avaliação soropidemiológica de anticorpos para *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 em soros de suínos (*Sus scrofa*) da região da Grande Erechim, RS – Brasil, detectados através das técnicas de imunofluorescência indireta e imunoenzimática**. Rio de Janeiro – RJ, 125f. Tese (Doutorado). Instituto Oswaldo Cruz, 1999.

BABO, V. J. *et al.* Avaliação da oxitetraciclina injetável de longa ação no tratamento da Erlichiose. **A Hora Veterinária**, n.119, p.38-40, 2001.

BASTOS, C. V. *et al.* Estudo retrospectivo da babesiose canina em Belo Horizonte de 1998 a 2001. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2002, Minas Gerais. **Resumos**. Minas Gerais: UFMG., 2002. Disponível em:

< http://www.veterinariazen.hpg.ig.com.br/arch_erlichC.htm > Acesso em 15 jan. 2003.

BAVIA, M. E. *et al.* Babesiose canina na cidade de Salvador – Bahia – 1998-2001. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado – RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002. 108p.

BELLATO, V. Tristeza Parasitária dos Bovinos. In: BECK, A. A. H.; GARCIA, E. C. T.; BORGES, P. C. C. **Manual de Parasitoses dos Animais**. Florianópolis: Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, 1985, p. 73-80.

BOUNOUS, D. I.; HOSKINS, J. D.; BOUDREAUX, M. K. O Sistema Hematopoético. In: HOSKINS, J. D. **Pediatria Veterinária**. São Paulo: Manole, 1993, cap.11, p.317-351.

BRANDÃO, L P.; HAGIWARA, M. K. Babesiose Canina – Revisão. **Clínica Veterinária**, n.41, p.50-59, 2002.

BREITSCHWERDT, E. B. As Riquetsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997, v.1, cap.67, p.543-553.

BRITTO, C. F. *et al.* Dinâmica de infecção por *Babesia* spp. na hemolinfa de teleóginas de *Boophilus microplus* naturalmente infectadas. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2002, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. p. 138.

BULLER, R. S. *et al.* *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 3, p. 148-155, 1999.

CARDOSO, V. S.; SERRA-FREIRE, N. M. Prevalência de *Babesia canis* em *Canis familiaris* de Silva Jardim e Teresópolis, estado do Rio de Janeiro, Brasil: avaliação por esfregaço sanguíneo. **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, vol.8, p. 359-364, 2001. Disponível em: < <http://www.web.ugf.br/editora> > Acesso em 03 nov. 2002.

CASTRO, I. O.; MINKOVES, R. Babesiose. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999, cap.17, p.156-158.

FIALHO, C. G. **Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii*, Nicolle & Manceaux, 1909 em soros de suínos da região da grande Porto Alegre – RS, Brasil, através de imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação indireta (HAI)**. Porto Alegre – RS. 115f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

FOLEY, J. E. *et al.* Granulocytic ehrlichiosis and tick infestation in mountain lions in California. **J. Wildl. Dis.**, v. 35, n. 4, p. 703-709, 1999.

FRANÇOIS, E. P. *et al.* Avaliação do perfil sorológico de cães receptores de transfusão de sangue conservado de doadores positivos para *Ehrlichia canis*. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13, 2002, São Leopoldo. **Resumos**. São Leopoldo: Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2002.

GUIMARÃES, A. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; SANTA ROSA, I. C. A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clínica Veterinária**, n.41, p.60-68, 2002.

HANNEMANN, C. R. A.; AZEVEDO, J. S.; QUEIROLO, M. T. Nefrotoxicidade induzida por hemoglobinúria em um cão com babesiose – relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado – RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002. 108p.

HARRUS, S. *et al.* Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. **Vet. Parasitol.**, v.78, n. 2, p. 155-160, 1997.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n. 11, p. 4219-4221, 2000.

KOCAN, A. A. *et al.* Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 6, n. 5, p. 477-480, 2000.

LABORCLIN. Produtos para laboratórios. **Panótico Rápido LB**. Paraná: [s.n.] 2p.

LABRUNA, M.; PEREIRA, M. Carrapato em Cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, n.30, p.24-32, 2001.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, 33: 159-174, 1977.

LEGATZKI, K.; JORGE, P. S. Erliquiose canina: uma doença emergente? **Nosso Clínico**, n.26, p.12-20, 2002.

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**. Ames, Iowa State University Press, EUA, 1985.

LEVINE, N. D. *et al.* A Newly Revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v.27, n. 1, p. 37-58, 1980.

MAHONEY, D.F. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, 1977, v.4, p.1-76.

MASONA, R.J. *et al.* Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centres of northern Australia. **Australian Veterinary Journal**, 2001, vol.79, Iss 8, p. 559-562. Disponível em: < <http://www.medvet.umontreal.ca/biblio/vetjr.html>> Acesso em 4 jan. 2003.

MATHEW, J. S. *et al.* Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of *Ehrlichia canis* infection. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, n. 5, p. 456-459, 2000.

MOREIRA, S.; PASSOS, L.; MACHADO, R. Detecção de *Ehrlichia canis* através de punção de medula óssea em cães. SEMANA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFMG, 3., **Anais**. Minas Gerais: UFMG, 2001. Disponível em: < http://www.ufmg/prp/anais3_agrarias.htm101k > Acesso em 10 nov. 2002.

MUNHOZ, A.L. F.; BABO, V. J. Estudo retrospectivo das características da Erliquiose Canina. **A Hora Veterinária**, n.106, p.39-43, 1998.

NEER, T. M. *et al.* Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection, **J. Vet. Int. Med.**, v. 13, p. 501-504, 1999.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000, 428p.

O'DWYER, L. H. **Diagnóstico de hemoparasitose e carrapatos de cães procedentes de áreas rurais em três mesoregião do estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Rio de Janeiro – RJ, 2002. Tese (Doutorado). UFRJ, 2002. Disponível em: <http://www.ufrj.br/posgrad/cppasv/tese/do/red_130.htm> Acesso em 15 fev. 2003.

OZAKI, L. S. *Babesia* in domestic animals: molecular biological tools for studying their taxonomy and life cycle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, suppl., 1996.

PAGE, R. L. Hematologia / Oncologia. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Rocca, 1998, cap. 3, p. 165-245.

PALUDO, G. R. *et al.* Determinação dos valores hematológicos e ocorrência de hemoparasitas em cães do Batalhão de Operações Especiais da Polícia Militar do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado – RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002. 108p.

PÉREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. Diagnostico de ehrlichiosis canina mediante pruebas de Western Immunoblot, Inmunofluorescencia Indireta y PCR. In: **Jornadas de Investigación del Hospital Veterinario “Dr. Humberto Ramírez Daza”, II**, 1997, Venezuela: Ano 3, n.2, p. 47-70. Disponível em: <<http://pegasus.ucla.edu/ve/cc/revista/a3n2sep97/32sep1997/REVSECC1.htm>> Acesso em 15 jan. 2003.

PICK, N. *et al.* Ehrlichiosis associated vasculitis. **J. Intern. Med.**, v. 247, n. 6, p. 674-678, 2000.

PONTEVEDRA, A. P. Experiencias con la babesiosis canina en el centro de Galiza, Miscelánea. **Prodiva S. A. Pequeños Animales**. España: 2000, n.39. Disponible em: <<http://www.prodivesa.com/public.htm>> Acesso em 03 nov. 2002.

QUEIROLO, M. T. *et al.* Exames parasitológicos realizados em cães e gatos, no laboratório de parasitologia do hospital veterinário da ULBRA, de 1999 a 2001. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado – RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002. 108p.

QUINN, P. J. *et al.* Bacterial Diseases. **Microbial and parasitic diseases of the dog and cat**. London: Saunders, 1997. p.229-233.

RIBEIRO, V.L.S. *et al.* Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.27, p.285-9, 1997.

SCHETTERS, T. P. M. *et al.* Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants with emphasis on clinical babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v.52, n. 3-4, p. 219-233, 1994.

SCHETTERS, T. P. M. *et al.* Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection. **Vet. Parasitol.**, v.73, n. 1-2, p. 35-41, 1997a.

SCHETTERS, T. P. M. *et al.* Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v. 115, n. 5, p. 485-493, 1997b.

SCHETTERS, T. P. M. *et al.* Parasite localization and dissemination in the *Babesia* infected host. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 513-519, 1998.

SCOOT, D. W.; MILLER, JR., W.H.; GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de Pequenos Animais**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, p. 443.

SEIBERT, M. **Ocorrência de Ehrlichia em cães conduzidos ao Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre – RS. 95f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

SHERDING, R. G. Doenças Infeciosas. In BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Rocca, 1998. p. 139-142.

SILVA, C. P. *et al.* Frequência de hemoparasitose canina na cidade de Barra Mansa, Rio de Janeiro. **Revista Científica do UBM**, Barra Mansa: 2001, v. 3, n. 6. Disponível em: <<http://www.ubm.br/ubm/paginas/publicacoes/revista-cientifica/06-hemoparasitose-canina.htm>> Acesso em 03 nov. 2002.

SOULSBY, E. J. L. **Helminths, Arthropods & Protozoa of Domesticated Animals**. 6.ed. London: Baillière, Tindall and Cassell Ltd, 1968, 824p.

SOUSA, M. G. *et al.* Hematoma mamário em cadela com erliquiose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado – RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002. 108p.

SREEKUMAR, C. *et al.* Detection of an *Ehrlichia bovis*-like organism in cultured búfalo monocytes. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 32, n. 2, p. 67-72, 2000.

STUEN, S.; ARTURSSON, K. Effects of the dose of *Ehrlichia phagocytophila* on the severity of experimental infections in lambs. **Vet. Rec.**, v. 146, n. 23, p. 669-672, 2000.

SUKSAWAT, J.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, v.14, n. 1, p. 50-55, 2000.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.473-481.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Infecções por protozoários e por outras causas In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 4.ed. São Paulo: Manole, 1997, v. 1, cap. 68, p.554-572.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. Great Britain: Butterworth, 1986, 483p.

UNVER, A. *et al.* Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2788-2793, 2001.

URQUHART, G. M. *et al.* **Parasitologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

VERCAMEN, F.; DE DEKEN, R.; MAES, L. Prophylatic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline. **Vet. Parasitol.**, v. 66, n. 3-4, p. 251-255, 1996.

VERCAMEN, F.; DE DEKEN, R.; MAES, L. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. **Vet. Parasitol.**, v. 68, n. 1-2, p. 51-55, 1997.

VIGNARD-ROSEZ, K.; ALVES, F. R.; BLEICH, I. Erliquiose Canina. **Cães e Gatos**, n.96, p.25-28, 2001.

WANER, T. *et al.* Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. **Vet. Parasitol.**, v. 82, n. 2, p. 121-128, 1999.

WANER, T. *et al.* Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.77, n. 1-2, p. 145-150, 2000a.

WANER, T.; STRENGER, C.; KEYSARY, A. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, n. 3, p. 240-244, 2000b.

WOZNIAK, E. J. *et al.* Clinical, antomic, and immunopathologic characterization of *Babesia gibsoni* infection in the domestic dog (*Canis familiaris*). **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 692-699, 1997.

XAVIER, S. P. *et al.* Observação simultânea de parasitismo de *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em monócito associado à observação de *Babesia* sp. e microfilaria no mesmo cão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado – RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002. 108p.

ZIKONOV, I.; POTASMAN, I. Monocytic ehrlichiosis- an emerging zoonotic disease in Israel. **Harefuah**, v.136, n. 9, p. 667-8, 756, 1999.