



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ALTERAÇÕES OCULARES E HEMATOLÓGICAS EM CÃES
ACOMETIDOS POR *Ehrlichia canis* E CO-INFECÇÕES**

CRISTIANE SEIDE PEIXOTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA – DF

JUNHO DE 2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ALTERAÇÕES OCULARES E HEMATOLÓGICAS EM CÃES
ACOMETIDOS POR *Ehrlichia canis* E CO-INFECÇÕES**

ALUNA: CRISTIANE SEIDE PEIXOTO

ORIENTADORA: Prof. Dra. GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 213/ 2019

BRASÍLIA – DF

JUNHO DE 2019

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SEIDE-PEIXOTO, C. **Alterações oculares e hematológicas em cães acometidos por *Ehrlichia canis* e co-infecções.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019 65p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução dessa dissertação para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa Dissertação de Mestrado pode ser reproduzida sem a autorização escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SEIDE-PEIXOTO, Cristiane. **Alterações oculares e hematológicas em cães acometidos por *Ehrlichia canis* e co-infecções.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2019, 65p

Dissertação (Mestrado em ciências animais) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019.

1.Erliquiose. 2.Cães. 3.A. platys. 4. PCR. 5. Neurite óptica.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ALTERAÇÕES OCULARES E HEMATOLÓGICAS EM CÃES
ACOMETIDOS POR *Ehrlichia canis* E CO-INFECCÕES**

CRISTIANE SEIDE PEIXOTO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

APROVADA POR:

GIANE REGINA PALUDO (Doutora, Universidade de Brasília)

ORIENTADORA

DANIELI BROLO MARTINS (Doutora, Universidade Federal de Goiás)

EXAMINADOR EXTERNO

CRISTIANO BARROS DE MELO (Doutor, Universidade de Brasília)

EXAMINADOR INTERNO

BRASÍLIA, 24 DE JUNHO DE 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Giane, Regina Paludo pela orientação, confiança e carinho nesses dois anos e meio de convivência e aprendizado. À Fernanda Filgueiras que gentilmente me apresentou à professora Giane, obrigada por me direcionar à melhor orientadora para mim.

Agradeço ao meu amado marido, Adson Peixoto, pelo apoio incondicional para que eu vencesse cada etapa desse projeto, mesmo com toda dificuldade para seguir em frente devido as complicações na gestação de nossa primeira filha, a Rafaela.

Agradeço à Equipe de trabalho, Leandro Prieto, Cláudia Coutinho, Fernanda Ramos e Richard Filgueiras que incentivaram e apoiaram a realização do mestrado.

Agradeço a preciosa oportunidade de realizar o mestrado na Universidade de Brasília, instituição pela qual tenho imensa admiração e respeito.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACOES.....	12
CAPÍTULO 1	14
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Objetivos Gerais.....</i>	15
1.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.3 <i>Família Anaplasmataceae.....</i>	16
2.4 <i>Vetor e reservatório das hemoparasitoses no Brasil</i>	16
2.5 <i>Erlíquiose canina</i>	17
2.6 <i>Anaplasmoze Canina.....</i>	19
2.7 <i>Fisiopatologia das Erlíquioses</i>	20
2.8 <i>Diagnóstico</i>	22
2.9 <i>As uveítes nas hemoparasitoses</i>	24
CAPITULO 2	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 <i>Testes rápidos utilizados</i>	34
3.1.1 <i>Erlíquiose Ac test kit Alere®</i>	34
3.1.2 <i>SNAP 4Dx Plus IDEXX®</i>	34

3.2	<i>Análise Molecular (PCR)</i>	35
3.3	<i>Protocolos de amplificação</i>	36
3.3.1	GAPDH.....	36
3.3.2	Família <i>Anaplasmataceae</i> (EHR16SD e SR).....	37
3.3.3	<i>E. canis</i> (ECAN5 e HE3).....	37
3.3.4	<i>A. platys</i> (EHR16SR e PLATYS).....	37
3.3.5	<i>A. phagocytophilum</i> (MSP3 – F e MSP3 – R).....	38
3.3.6	Piroplasmídeos (BTBABE 18S BT1-F e BT1-R).....	38
3.3.7	<i>Leishmania spp.</i> (R221 e R332).....	38
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

A erliquiose é uma enfermidade encontrada em todo o Brasil, sendo frequentemente diagnosticada nas uveítes infecciosas em cães. O objetivo deste estudo foi relatar a ocorrência da infecção natural por agentes da família *Anaplasmataceae* em cães com alterações oculares, a presença de co-infecção, e documentar as alterações oculares e hematológicas presentes. Foram incluídos no estudo 33 cães com queixa primária de alteração ocular, onde foram realizados exame oftálmico completo, hemograma e exames para erliquiose (teste rápido e PCR). Como resultado, 5/33 (15,3%) cães foram positivos no teste rápido e na PCR e 4/33 cães foram positivos apenas no teste rápido, totalizando nove amostras positivas (27,3%). Os cinco cães positivos na PCR estavam infectados por *E. canis*, sendo que três deles estavam co-infectados por *A. platys* (9,1%). As uveítes anteriores dos cães com erliquiose foram mais frequentes (66,7%) e os sinais mais comuns foram hiperemia e edema corneano (100%), flare (77,8%), pressão intraocular baixa (77,8%) e neurite óptica (44,4%). Ainda nos positivos, as alterações oculares apresentaram-se bilateralmente em 88,9% ($P < 0,047$), com associação positiva da infecção com trombocitopenia ($P < 0,001$), com anemia associada à trombocitopenia ($P < 0,0001$) e com a presença de neurite óptica ($P < 0,013$). A uveíte e a neurite óptica, quando associadas à presença de anemia e trombocitopenia são fortemente indicativas de infecção por erliquiose ($P < 0,0001$ e $P < 0,003$, respectivamente). Conclui-se que a erliquiose deve ser considerada suspeita diagnóstica na presença de neurite óptica e de uveítes associadas à anemia e trombocitopenia em cães, mesmo na ausência de outros sinais clínicos comuns. A identificação do agente envolvido por meio da PCR permite maximizar o conhecimento das características da apresentação da infecção de acordo com a espécie envolvida.

Palavras-chave: 1. Erliquiose. 2. Cães. 3. Uveíte. 4. PCR. 5. Neurite óptica.

ABSTRACT

Ehrlichiosis, a disease caused by *Ehrlichia canis*, is widespread in Brazil and frequently diagnosed in infectious uveitis in dogs. The objective of this study was to report the occurrence of natural infection by agents of the *Anaplasmataceae* family in dogs with ocular alterations, to investigate the presence of co-infection and to document the ocular and hematological alterations present. The 33 dogs in this study were seen primarily for ocular changes only with no other symptoms. After undergoing complete ophthalmic examination, blood count and tested for ehrlichiosis (rapid in-clinic test and PCR), the results indicated that 5/33 (15.3%) dogs were positive in both serology and PCR while 4/33 (12.1%) dogs were positive only in serology, totaling nine positive samples (27.4%). The five dogs positive in PCR were infected with *E. canis*, 3 of which were also co-infected with *A. platys* (9.1%). Of the dogs with ehrlichiosis, 66.7% also had anterior uveitis and the most frequent symptoms were hyperemia and corneal edema (100%), flare (77.8%), low intraocular pressure (77.8%), and neuritis optics (44.4%). In addition, ocular changes were bilateral in 88.9% ($P < 0.047$), and positively associated with thrombocytopenia infection ($P < 0.001$), anemia associated with thrombocytopenia ($P < 0.0001$), and presence of optic neuritis ($P < 0.013$). Uveitis and optic neuritis, when associated with anemia and thrombocytopenia, are strongly indicative of ehrlichiosis infection ($P < 0.0001$ and $P < 0.003$, respectively). It is concluded that ehrlichiosis should be considered as a differential diagnosis in the presence of optic neuritis and uveitis associated with anemia and thrombocytopenia in dogs, even in the absence of other common clinical symptoms. The agent involved in the infection should be determined by PCR to optimize the diagnosis of the infection according to the species involved.

Key-words: 1.Ehrlichiosis. 2.Dogs. 3.Uveitis. 4. PCR. 5. Optic neuritis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Teste rápido para erliquiose SNAP 4Dx Plus[®] IDEXX Laboratories[®] do cão C33. 43
- Figura 2 Eletroforese em gel agarose corado com brometo de etídio mostrando diferentes resultados da PCR44
- Figura 3 Eletroforese em gel agarose corado com brometo de etídio mostrando o resultado da PCR para *A. platys* utilizando os oligonucleotídeos EHRSR e PLATYS.....45
- Figura 4 Glaucoma secundário no olho esquerdo de cão da raça Labrador, positivo para Erliquiose no teste rápido (cão C33)..47
- Figura 5 Fotografia do olho direito de cão da raça Akita com uveíte anterior bilateral (Cão C16).48
- Figura 6 Fotografias das alterações do olho direito do cão SRD C12, positivo para *E. canis* através de PCR..49
- Figura 7 Fotografia do olho esquerdo do cão C-20, da raça Bull Terrier, avistado no primeiro atendimento, co-infectado por *E. canis* e *A. platys* na PCR.49
- Figura 8 Sequência de fotografias de fundo de olho do cão C-20 (Bull Terrier) do primeiro atendimento e após o tratamento..50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Testes rápidos realizados nos cães do estudo e seus resultados	41
Tabela 2 Apresentação dos sinais oculares dos cães infectados e não- infectados.....	43
Tabela 3 Valores das médias e desvio padrão de idade e dos achados laboratoriais dos 33 cães positivos e negativos para Erliquiose no teste rápido ou na PCR.....	45
Tabela 4 Valores hematológicos dos cães naturalmente infectados, diagnosticados por meio do teste rápido e por meio da PCR para família <i>Anaplasmataceae</i>	45
Tabela 5 Alterações laboratoriais e associações das alterações laboratoriais com a presença de uveíte e neurite nos animais infectados (9) e não-infectados (24)	47

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACOES

% - Porcentagem

μ L – Microlitros

μ Mol – MicroMol

AGH – Anaplasmosse Granulocítica Humana

ALT – Alanino Aminotransferase

CEUA – Comitê de Ética de Uso Animal

D.R. – Descolamento de Retina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Trifosfato de Desoxirribonucleosídeos

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

EMC – Erliquiose Monocítica Canina

GAPDH – Gliceraldeído – 3 – Fosfato – Desidrogenase

HCT – Hematócrito

H.R. – Hemorragia de Retina

IgG – Imunoglobulina G

Kg – Quilogramas

mg – Miligramas

MgCL₂ – Cloreto de Magnésio

mM – MiliMoL

°C – Graus Celsius

pb – Pares de base

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia

pMol – Picomol

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SRD – Sem raça definida

TCC – Trombocitopenia Cíclica Canina

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por carrapatos possuem grande impacto na saúde animal e têm sido diagnosticadas em diferentes regiões do Brasil, mostrando ampla distribuição das hemoparasitoses no país (Costa et al., 2015; Silveira et al. 2015; Gottlieb et al., 2016). O vetor *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como “carrapato vermelho do cão”, é o principal transmissor de patógenos como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Babesia spp*, *Rangelia vitalii* e *Rickettsia spp*, que parasitam células sanguíneas e causam enfermidades em cães de áreas urbanas e rurais (Aguiar et al., 2007; Araes-Santos et al., 2015; Guedes et al., 2015).

A Erliquiose e a Anaplasmose são doenças de alta ocorrência em cães no Distrito Federal, também sendo diagnosticada em felídeos selvagens (Silva et. al, 2015; Mazzotti et al., 2018). Os estudos sugeriram grande incidência de manifestações oculares na Erliquiose canina, sendo *Ehrlichia canis* o agente infeccioso mais diagnosticado na presença de uveítes associadas a alterações hematológicas como a trombocitopenia e a anemia, muito comuns nas doenças transmitidas por carrapatos (Leiva et al.; 2005; Komnenou et al., 2007; Oriá et al., 2008; Panciera et al., 2010; Pinto & Carvalho, 2015).

Existem vários testes sorológicos simples e rápidos para utilização na rotina, sendo que o teste sorológico mais comum é o RIFI que pode apresentar reação cruzada entre diferentes espécies erliquiais (Dagnone, 2006, Araes-Santos et al., 2015; Guedes et al., 2015). Os kits comerciais utilizados em clínicas veterinárias possuem boa sensibilidade e especificidade, quando comparados ao RIFI, com detecção de anticorpos anti - *E. canis* na titulação $\leq 1:320$ (Harrus & Waner, 2011).

Os índices de positividade nas sorologias contrastam com baixos resultados positivos nos exames de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), o que pode ser justificado pela presença de diferentes espécies de microrganismos, já que os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* possuem vários antígenos em comum. A PCR é um teste molecular utilizado na identificação das espécies de Rickettsias, com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico preciso destes agentes, contribuindo para o conhecimento da ocorrência e caracterização da doença em diversas regiões (Waner et al. 2001; Oriá, 2008; Costa et al, 2015; Guedes et al., 2015; Gottlieb, 2016). A bactéria *E. canis* está envolvida na maioria dos casos infecciosos de déficit visual e cegueira total em cães (Leiva et al.; 2005; Komnenou et al., 2007; Panciera et al., 2010).

A ocorrência de *E. canis* e de outros agentes infecciosos da família *Anaplasmataceae* na presença de alterações oculares em cães com ou sem alterações hematológicas sugestivas da doença ou a presença de co-infecção, poderão acrescentar conhecimento na forma como as uveítes se apresentam indicando um sinal adicional à suspeita clínica de doenças transmitidas por carrapatos. A variedade dos sinais descritos em diferentes regiões dificulta a suspeita e o diagnóstico das hemoparasitoses, principalmente na ausência da sintomatologia clássica, quando a única queixa é a alteração ocular, portanto, a identificação do agente e a precocidade do tratamento poderão definir o prognóstico de visão do cão.

1.1 Objetivos Gerais

Investigar a ocorrência da infecção natural por espécies da família *Anaplasmataceae* em cães com uveíte, glaucoma e neurite óptica, atendidos em uma clínica veterinária do Distrito Federal, Brasil.

1.2 Objetivos Específicos

Investigar a infecção por *E. canis* ou eventual co-infecção deste agente com outras espécies da família *Anaplasmataceae* em cães que apresentem como único sinal de doença a alteração ocular; Associar as alterações oculares com as alterações hematológicas;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família *Anaplasmataceae*

As Hemoparasitoses causadas por Rickettsias são comuns em regiões tropicais e subtropicais, devido a presença generalizada de carrapatos, que são seus vetores naturais (Pinto & Carvalho, 2013; Guedes et al., 2015). De acordo com a reclassificação filogenética descrita em 2001 por Dumler et.al., os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* pertencem à família *Anaplasmataceae* e incluem espécies de organismos bacterianos Gram-negativos intracelulares, como *Ehrlichia. canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* que podem infectar cães e seres humanos (Dumler et.al., 2001; D’Dagnone, 2006).

Os gêneros *Anaplasma* e *Erliquia* são compostos por bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias que parasitam leucócitos, eritrócitos ou plaquetas de mamíferos (Gaff et al., 2014). A nomenclatura das doenças causadas por esses agentes se relaciona com a célula parasitada, a exemplo da *E. canis* e *E. chaffeensis* que parasitam monócitos e são chamadas de Erliquioses Monocíticas e da *A. phagocytophilum* e *E. ewingii* que parasitam granulócitos e são chamadas de Erliquioses Granulocíticas. São doenças com potencial zoonótico, transmitidas por carrapatos e mantidas por seus reservatórios na natureza (McQuiston et al., 2003).

2.2 Vetor e reservatório das hemoparasitoses no Brasil

O carrapato *Rhiphicephalus sanguineus* é o vetor primário da espécie *E. canis* e possui grande importância para saúde pública pela sua capacidade de carregar e transmitir patógenos tanto para os animais domésticos quanto para o ser humano (Dantas-Torres et al., 2008). Ele também é vetor de outros microrganismos como *Babesia vogeli*, *Rickettsia spp.*, *Anaplasma*

platys, *Bartonella vinsonii* e *Hepatozoon canis*, que causam doenças em cães em todo o mundo (Santos et al., 2009; Eiras et al., 2012). No Brasil, devido a ampla distribuição da espécie de carrapato *Rhipicephalus sanguineus* tanto nas áreas urbanas quanto rurais, as doenças hemoparasitárias ocasionadas por estes agentes são bastante comuns (Soares et al., 2006; Aguiar et al., 2007; Costa et al., 2015). As formas imaturas do carrapato (larvas e ninfas) se alimentam do sangue de animais infectados na natureza e transmitem para as formas sucessivas (ninfas e adultos) transestadialmente, e a transmissão entre animais ocorre durante o repasto sanguíneo, disseminando a bactéria no novo hospedeiro. A espécie *E. canis* tem como principal hospedeiro o cão, tanto nas áreas urbanas quanto rurais (Soares et al., 2006; Dantas-Torres, 2008 e Labarthe et al., 2007). A ocorrência de infecções erliquiais é marcante na primavera e no verão de acordo com o aumento da população do vetor no ambiente nestas épocas (McQuiston et al. 2003).

Na Europa, as espécies de *Erlíquia* e *Anaplasma* são mantidas por hospedeiros de vida selvagem como cervos e raposas e são transmitidas acidentalmente para seres humanos e animais domésticos como o cão, cavalos, ruminantes. O *A. phagocytophilum* é mantido por cervos e por roedores (*Peromyscus leucopus*), sendo que a transmissão para humanos ocorre através da picada do carrapato (*Ixodes scapularis*), que também é o vetor da *Borrelia burgdorferi* (agente da doença de Lyme) e da *Babesia microti* (agente de babesiose) (McQuiston et al., 2003). No Brasil, os estudos indicaram ocorrência de agentes da Erliquiose em cães, gatos selvagens e humanos (Vieira et al., 2011).

2.3 Erliquiose canina

O gênero *Ehrlichia* inclui as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. ewingii*, sendo *E. canis* o agente etiológico causador da Erliquiose Monocítica Canina (EMC), agente com a maior distribuição mundial e envolvimento nas doenças potencialmente fatais nos cães (Little, 2010). A Erliquiose pode acometer cães, gatos, animais selvagens e humanos, e no Brasil, Vieira et al. (2011) relataram que *E. canis* é o agente mais expressivo.

Estudos regionais no Brasil já foram realizados para se determinar a prevalência da *E. canis* e outros parasitas, mostrando que a infecção está presente de forma difusa. No Brasil, as regiões consideradas endêmicas mostram uma prevalência de 14,6% a 30,9% para este parasita. Estudos em Juiz de Fora – MG, Passo Fundo – RS, Petrolina – PE e Juazeiro – BA, e em 3 cidades do Maranhão – MA, revelaram 16%, 5,1%, 27,9%, 23% e 14% de *E. canis* nos cães respectivamente. *E. ruminantium*, e *E. muris*, ainda não foram identificadas no país; *E. chaffeensis* foi identificada em um Cervo-do-Pantanal; e os casos de *E. ewingii*, passíveis de infecção nos cães e nos seres humanos, ainda não tem confirmação molecular, apenas sorológica, sendo transmitidas por *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis*. *E. canis* é o agente mais frequente nas infecções transmitidas por carrapatos nos cães do Brasil (Costa et al., 2015).

Em 2007, Labarthe et al. encontraram prevalência de 27,8% de *E. canis* no Distrito Federal, portanto considerada uma região endêmica para este parasita, com 24 dos 101 cães sorologicamente testados positivos, sendo que a região Nordeste teve a maior prevalência no país com 43% e a região Sul a mais baixa, com 1,7%. Apesar da hipótese levantada por Souza et al., 2010 de que *E. ewingii* ou *E. chaffeensis* pudessem ser encontrados nos cães, associados a presença generalizada de *R. sanguineus* no Brasil, dos 472 cães testados sorologicamente para Erliquiose na região de Salvador - BA, 168 cães foram positivos, e através da biologia molecular encontraram 58 cães infectados por *E. canis* e nenhum cão ou carrapato estava infectado por *E. ewingii* ou *E. chaffeensis*. Os mesmos resultados já haviam sido encontrados por Diniz et al. (2007), onde cães doentes foram utilizados como sentinelas de doenças zoonóticas com nenhum animal positivo para *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, e negativos para *R. rickettsii*, *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi*. Outro estudo em Brasília e Goiás com canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro, comprovou a alta incidência de *E. canis* (30,76%) e *A. platys* (53,85%) nos animais, tornando importante mais estudos sobre a ocorrência e apresentação das hemoparasitoses nos cães domésticos na região, assim como a sua relevância para a saúde pública (Silva, 2015; Mazzotti et al., 2018).

2.4 Anaplasmosose Canina

A espécie *Anaplasma platys*, antes conhecida como *Ehrlichia platys*, infecta plaquetas e é o agente da Trombocitopenia Cíclica Canina (TCC). O estudo de Almazan et al. (2015) com 100 cães em uma cidade do México, evidenciou a presença de *Anaplasma spp.* associada a presença de *R. sanguineus* na região pela primeira vez, mostrando 31% de positividade para Anaplasma e de 10% para erliquia. No Brasil, em Ribeirão Preto – SP, a pesquisa realizada através de PCR e *Nested* PCR buscou determinar a incidência de *E. canis*, *A. platys* e *Babesia spp.* em 221 cães com ou sem trombocitopenia, e os valores encontrados são mais altos. Do número total, 38,9% dos animais eram positivos para *E. canis*, e outros 38% estavam parasitados por *A. platys* ou *Babesia spp.*, 14,9% e 8,1% respectivamente. Dentre os animais trombocitopênicos, as infecções por *A. platys* e *Babesia spp.* foram identificadas sozinhas ou como co-infecção com *E. canis*, e considerando a co-infecção de *E. canis* com esses agentes, há um aumento de 26,1% de infectados, dado bastante expressivo. Este fato pode estar associado a presença do vetor comum das 3 espécies, *R. Sanguineus*, reforçando a idéia de que o cão também pode ser reservatório de espécies perigosas para o ser humano, como *E. chaffeensis* (Santos et al., 2007).

O agente *A. phagocytophilum* é responsável pela Anaplasmosose Granulocítica Humana (AGH) e animal, e a co-infecção por mais de uma espécie de hemoparasitas é comum (Dagnone et al., 2006). A espécie *A. phagocytophilum* parasita neutrófilos espalhando-se pelo sistema circulatório, causando a AGH, e tem como reservatórios na Europa, os cães, ratos, pequenos mamíferos, ovelhas e carneiros (Gaff et al., 2014). No Brasil, em Jaboticabal – SP e Campo Grande - MT, o estudo de Dagnone et al., 2009 testou através de *Nested* PCR 51 cães, onde 90,2% eram positivos para a família *Anaplasmataceae*. Foram utilizados oligonucleotídeos para identificação de *E. canis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum*, onde 40% e 18,2% eram positivos para *E. canis*; e 3,9% e 21,5% positivos para *A. Platys* em Jaboticabal e Campo Grande, respectivamente. Em nenhum animal foi identificado *A. phagocytophilum*, mas em dois cães de Jaboticabal foi detectado co-infecção por *E. canis* e *A. platys*, não observadas nos esfregaços sanguíneos, reforçando que a técnica de PCR para estes dois parasitas confirma a presença destes no Brasil, assim como a co-infecção.

A co-infecção também foi relatada por Breitshweirdt et al. por meio de biologia molecular em 1998, na pesquisa feita em 12 cães com sinais similares àqueles causados por agentes do gênero, cinco eram positivos, e um destes estava parasitado por *E.canis*, *E. ewingii* e *E. equi* simultaneamente, 3 apenas por *E. canis* e 1 por *E. chaffeensis*. Esta foi a primeira evidência de sintomas em cães infectados por esta espécie, que também parasita seres humanos. A co-infecção de três espécies no cão aumenta a necessidade de diagnósticos baseados em tecnologia genômica para que se possa melhorar a compreensão das diferenças clínicas e patológicas associadas a um ou mais espécies (Breitshweirdt et al., 1998).

2.5 Fisiopatologia das Erliquioses

A Erliquiose Monocítica Canina e as demais hemoparasitoses estão associadas a deposição de imunocomplexos nas paredes dos vasos e formação de anticorpos, causando vasculites e sinais inespecíficos que tornam difícil a diferenciação das doenças. Os sinais comuns incluem pirexia, depressão, anorexia, linfadenomegalia, sinais oculares e neurológicos (Breitshweirdt et al., 1998; Leiva et al., 2005; Pinto & Carvalho, 2013), além de alterações marcantes em exames laboratoriais como trombocitopenia e anemia, que estão associadas a hemorragias em diversos sítios (Dagone et al., 2003; Soares et al. 2006; Cesar, 2008; Silveira et al., 2015; Gottlieb, 2016). A anemia pode estar relacionada a muitos mecanismos, incluindo hemólise, hipoplasia ou aplasia medular após supressão de citocinas da hematopoiese na medula óssea (De Tommasi et al., 2014). A trombocitopenia contribui para sangramentos nos cães com doença aguda ou crônica por queda na produção de plaquetas na medula óssea, associada ao sequestro das mesmas, aumento do consumo e ainda a redução da migração plaquetária por aumento da secreção inibitória pelos linfócitos expostos aos patógenos (Woody e Hoskins, 1991; Waner et al., 1997; Little, 2010).

Os sinais clínicos são gerados por múltiplos fatores, como a falta de entrega de oxigênio e nutrientes à parede dos vasos, gerando vasculite, anormalidades de coagulação e função plaquetária pelo aumento da proteína, mas ainda não são totalmente esclarecidos (Cullen & Webb, 2013). Possui 3 fases: aguda, subclínica e crônica, com sinais clínicos inespecíficos e variáveis. A fase aguda inicia de 8 a 20 dias, e continua por 2 a 4 semanas, período em que o

patógeno se espalha na corrente sanguínea, com alterações hematológicas como anemia e trombocitopenia branda, e alterações na contagem leucocitária. Os sinais incluem anorexia, emaciação, febre, secreção oculonasal e linfadenomegalia. Esta fase aguda geralmente é autolimitante e inicia-se a fase subclínica, com duração de 40 a 120 dias, ou podendo durar anos (Woody e Hoskins, 1991; Aguiar et al., 2007; Oriá et al., 2008; Little, 2010, Vieira et al., 2011). O animal se apresenta clinicamente recuperado, mas ainda com trombocitopenia, anemia não regenerativa, leucopenia (Waner et al., 1997; Woody e Hoskins, 1991; Aguiar et al., 2007; Oriá et al., 2008) e hiperglobulinemia, que sugere resposta imunológica exagerada com eficiência inadequada (Waner et al., 1997; Woody e Hoskins, 1991).

A anemia e a trombocitopenia são as alterações hematológicas mais marcantes em todas as fases e a leucopenia também pode ser encontrada (Woody & Hoskins, 1991; Waner & Harrus, 1997, Dagone et al., 2003; Bulla et al., 2004; Aguiar et al., 2007; Oriá et al., 2008; Bouzouraa et al., 2016). Estas alterações ocorrem na fase aguda devido ao sequestro e consumo por mecanismos imunológicos e na fase crônica devido a baixa produção pela medula óssea (Woody & Hoskins, 1991; Waner & Harrus et al., 1997). A hiperproteinemia e a hiperglobulinemia estão associadas a resposta imune exacerbada, com eficiência inadequada, e hiperviscosidade sérica (Woody & Hoskins, 1991).

Se o cão for imunocompetente poderá eliminar a *E. canis*, ou então entrará na fase crônica, onde os sinais reaparecem mais brandos ou mais severos a depender da cepa, da raça do cão, da idade, da imunocompetência e co-infecção com outros patógenos. Queixas em todas as fases incluem depressão, anorexia, e perda de peso em mais de 50% dos casos, apresentam tendências hemorrágicas, linfadenomegalia, esplenomegalia, sinais oculares e neurológicos, o que torna difícil a correlação de sinais com uma fase particular (Woody e Hoskins, 1991).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da Erliquiose deve incluir a associação de sinais clínicos, interpretação do perfil hematológico do cão, sorologias e testes moleculares devido à complexidade e variedade de sinais clínicos inespecíficos da infecção por espécies da família *Anaplasmataceae* (Waner et al., 2001; Martin et al., 2005; Oriá et al., 2008; Guedes et al., 2015; Dziegiel, 2016).

Atualmente existem vários exames para o diagnóstico para Erliquiose. Na rotina são utilizados com frequência os esfregaços sanguíneos, para a visualização das inclusões ou mórulas; as sorologias por Imunofluorescência Indireta (RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e a Reação de Polimerização em Cadeia (PCR). O esfregaço sanguíneo, apesar de ter boa especificidade, tem menor sensibilidade, e as sorologias e PCR maior especificidade e sensibilidade. (Guedes et al., 2015). A RIFI detecta anticorpos anti – *E. canis* e é considerada padrão ouro, revelando a exposição ao agente em casos agudos e crônicos, entretanto, não diferencia *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* e *E. ruminatum*, levando a reações cruzadas entre essas espécies e há relato de reação cruzada com anticorpos de *A. phagocytophilum*. Na fase aguda é recomendado repetir o exame dentro de um intervalo de 7 a 14 dias com aumento de quatro vezes na titulação para confirmação da infecção.

Os testes rápidos dot- ELISA para detecção de anticorpos IgG usados comumente nas clínicas veterinárias, foram comparados com a RIFI em estudo e concluíram que são específicos e sensíveis para títulos superiores a 1:320, sendo recomendado repetir após duas semanas para se evitar esse corte da sensibilidade (Harrus & Waner, 2011). O teste 4Dx plus, IDEXX Laboratories®, USA, foi utilizado em estudo para validação utilizando 1601 amostras sanguíneas, conferindo sensibilidade e especificidade acima de 89% para detecção de anticorpos contra *A. phagocytophilum*, *A. platys* e *E. canis*, sendo para *E. canis* houve 97,8% e 92,3% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, sendo recomendado para utilização na rotina clínica para indicar exposição a esses agentes (STLLES et al. 2014). O teste Erliquiose Ac test kit Alere® faz a detecção qualitativa de anticorpos IGg e IGm por

meio de Imunocromatografia e possui especificidade de 100% e 98,2% sensibilidade para *E.canis*, de acordo com a informação do fabricante.

Os testes moleculares têm sido utilizados para diagnosticar Erliquia tanto em animais infectados naturalmente quanto experimentalmente, em fase aguda ou crônica, e apesar de ser mais sensível quando comparado a outros métodos, os resultados falso-negativos também podem ocorrer (Dagone et al., 2009).

No Rio Grande do Sul, Gottlieb et al. (2016) observaram que os animais soropositivos para *E. canis* do estudo (5,1%) eram negativos na PCR, corroborando com a análise de Araes-Santos et al. (2015), em que 23% dos cães eram positivos pela sorologia enquanto por meio da PCR apenas 8,3% eram positivos. Estes estudos sugerem a existência de reação cruzada, pois várias espécies de hemoparasitas possuem antígenos em comum (gênero *Anaplasmataceae* ou *Babesia*). É incomum a reação cruzada em testes moleculares como acontece nas sorologias, e na fase aguda parece ser o teste mais adequado, enquanto as sorologias estão mais indicadas na detecção na fase crônica de infecções naturais (Nakaghi et al., 2008). Em outra pesquisa na Polônia, 400 cães passaram por testes sorológicos e moleculares para detecção de doenças transmitidas por carrapato, onde a maior prevalência foi *Borrelia burgdorferi*, depois de *Anaplasma phagocytophilum* e por último *E. canis*, que apresentou baixa soropositividade associada a totalidade de PCR negativos na região, sugerindo que a *E. canis*, assim como seu vetor, *R. sanguineus*, são parasitas escassos na Polônia (Dziegiel et al., 2016).

Testes genômicos como a PCR estão sendo cada vez mais utilizados em associação aos testes sorológicos como complemento no diagnóstico de doenças hemoparasitárias em cães (Murphy et al., 1998; Waner et al., 2001; Dagnone, 2006; Guedes et al., 2015). Estas informações a respeito dos testes utilizados para diagnóstico destas doenças são importantes, visto que as sorologias têm sua utilidade na questão epidemiológica, pois conferem baixa especificidade, podendo não estar associadas à infecção em regiões endêmicas, e que as análises moleculares são altamente específicas e sensíveis, fornecendo diagnóstico definitivo, uma vez que a clínica é muito parecida em todas as hemoparasitoses (Gottlieb et al., 2016).

2.7 As uveítes nas hemoparasitoses

As doenças sistêmicas que interferem no sistema vascular e nervoso são passíveis de apresentar manifestações oculares devido a alta taxa de fluxo sanguíneo na retina e na úvea, possibilitando disseminar organismos infecciosos (Cullen & Webb, 2013). A anemia é comum na doença e pode estar associada a mudanças na vascularização da retina em decorrência de hipóxia das paredes vasculares, já a trombocitopenia está mais relacionada a hemorragias retinianas, e essas alterações hematológicas podem levar à palidez dos vasos da retina, com aparência de degeneração ou atrofia.

A síndrome da hiperviscosidade pode ser causada pela Erliquiose e causar sinais clínicos oculares ainda não totalmente compreendidos, como baixo suprimento de oxigênio e nutrientes à parede dos vasos, hipertensão, coagulopatias pela alta taxa de proteína plasmática, pela trombocitopenia e pela alteração da função plaquetária (Cullen & Webb, 2013).

A infecção por *E. canis* possui três fases, aguda, subclínica e crônica, com grande variedade de sintomas inespecíficos e manifestações oculares. As alterações oftálmicas podem se apresentar em todas as fases da doença, sendo que em cães infectados experimentalmente, 50% apresentaram alteração ocular na fase aguda, e 10 a 15% dos cães apresentaram alterações unicamente oftálmicas (Oriá et al., 2008). Opacidade de córnea, miose, flare, hemorragias conjuntivais e irídicas e pressão intraocular baixa são os sinais oftálmicos mais encontrados (Massa et al., 2002; Komnenou et al., 2007; Oriá et al., 2008). Neiva, Naranjo e Peña (2005) identificaram manifestações oculares da *E. canis* em 17 dos 46 cães, sendo que 11 deles apresentavam exclusivamente sinais oculares, e Nakaghi et al. (2008) encontraram a uveíte em 33,3% dos cães do estudo como sinal da doença, demonstrando a importância de se considerar este sinal como suspeita diagnóstica de hemoparasitoses na ausência dos sinais clássicos.

Na infecção por *A. platys*, a inflamação ocular se mostrou menos frequente, com apenas 12,5% dos casos, sendo mais comum a presença de sinais inespecíficos associados à anemia e

trombocitopenia, como distúrbios hemorrágicos. Apenas um relato de sinais oculares foi descrito nos Estados Unidos por infecção por *A. platys*, entretanto, não houve confirmação por PCR (Bouzouraa et al., 2016).

A deposição de imunocomplexos pode causar lesões na úvea e no nervo óptico, mostrando correlação da severidade das alterações oculares com a titulação encontrada (Leiva et al., 2005), com o tipo de parasita, infecções concomitantes e a resposta imunitária do paciente (Komnenou et al., 2007). Um caso de vasculite retiniana e edema macular em paciente humano com alta titulação para *E. chaffeensis* foi relatado por Raja et al. (2016), com a informação de que manifestações oculares em decorrência de erliquiose em humanos são raras. Entretanto, em cães, as manifestações oculares são mais comuns, Panciera et al. (2001) fez um estudo histopatológico sobre *E. Ewingii*, *E. Platys* e *E. Chaffeensis* e *E. Canis*, sendo a *E. Canis* o único agente que causou lesões oculares e meningite em 14 dos 27 cães. Foram observadas inflamações de corpo ciliar, íris, coróide e retina, com ação direta do agente no olho, confirmada por infiltrados linfoplasmocitários perivasculares, predominantemente por linfócitos e alguns granulócitos, que se estendiam até a esclera. Neste estudo, as uveítes anteriores eram mais marcantes, concordando com os estudos clínicos de Massa et al. (2002), Komnenou et al. (2007), e Pinto & Carvalho (2013), que relataram também maior ocorrência bilateral. Casos de glaucoma secundário ao depósito de células inflamatórias na malha trabecular, catarata, ceratoconjuntivite seca, úlceras profundas e esclerite necrotizante também estão relatadas (Oriá et al., 2008; Komnenou et al., 2007).

Nas uveítes anteriores, estão descritos sinais como edema de córnea, pressão intraocular baixa, miose, precipitados ceráticos, sinéquias, hipópio e hifema. Para Massa et al. (2002) a maior ocorrência foi o flare, em 86% dos casos, valor bastante discrepante ao observado por Oriá et al. (2008), onde apenas 22,54% apresentavam este sinal. A observação do edema corneano foi bem próxima nestes dois estudos, 65% e 62,7% respectivamente. No estudo de Oriá et al. (2008), 25,49% dos cães apresentavam rubeosis iridis, 15,68% precipitados ceráticos e 8,82% hifema. O hifema está associado à trombocitopenia, assim como as hemorragias conjuntivais e petéquias que aparecem em 29,4% dos casos segundo Leiva et al. (2005).

A maioria dos trabalhos concorda que a manifestação ocular mais comum na erliquiose é a uveíte anterior, mas para Leiva et al. (2005) a localização mais comum foi no segmento posterior, com descolamento de retina exudativo. Além do descolamento de retina (D.R.) e panuveíte que atingiram 64% dos animais, áreas escurecidas na retina e neurite óptica também foram observadas. As alterações de segmento posterior secundárias a erliquiose mais relatadas são o descolamento de retina exudativo ou hemorrágico, coriorretinite, neurite óptica, tortuosidade e engurgitamento dos vasos retinianos e degeneração retiniana (Massa et al., 2002; Leiva et al., 2005; Komnenou et al. 2007; Oriá et al., 2008; Pinto & Carvalho, 2013). Komnenou et al. (2007) relataram uveíte anterior em 64,5% dos cães, uveíte posterior em 8,9% e panuveíte em 26,6%, mostrando a grande variação na apresentação das lesões oftálmicas observadas pelos pesquisadores.

Em relação à infecção por *A. platys*, o parasita se replica nas plaquetas, causando queda na contagem em poucos dias, podendo causar uveíte no cão, mas geralmente é moderada e melhora em poucos dias. Os demais agentes erliquiais incluindo *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. equi* e *A. phagocytophilum* poderão causar uveíte em decorrência da queda de plaquetas ou vasculite, ou ambos (Cullen & Webb, 2013).

Devido a alta incidência de uveítes em cães com quadros hematológicos sugestivos da doença, a erliquiose deve ser um diagnóstico diferencial em potencial, principalmente em áreas endêmicas. Os estudos sugeriram alta ocorrência de déficit ou perda visual (43,4%) relacionada à erliquiose canina, com resolução completa (55%), parcial (24,5%) ou pobre (20%) da alteração ocular após o tratamento com Doxiciclina e Anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (Komnenou et al., 2007). Leiva et al. (2005) observaram resposta pobre ao tratamento em 14,7% dos casos, sendo que 2 dos 46 cães ainda apresentavam panuveíte após 3 meses de doxiciclina, com recorrências da doença após 30 dias da interrupção do tratamento.

CAPITULO 2

**ALTERAÇÕES OCULARES E HEMATOLÓGICAS EM CÃES
ACOMETIDOS POR *Ehrlichia canis* E CO-INFECÇÕES**

CRISTIANE SEIDE PEIXOTO

ORIENTADORA: Prof. Dra. GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO 213/2019

BRASÍLIA – DF

JUNHO/ 2019

RESUMO

A erliquiose é uma enfermidade encontrada em todo o Brasil, sendo frequentemente diagnosticada nas uveítes infecciosas em cães. O objetivo deste estudo foi relatar a ocorrência da infecção natural por agentes da família *Anaplasmataceae* em cães com alterações oculares, a presença de co-infecção, e documentar as alterações oculares e hematológicas presentes. Foram incluídos no estudo 33 cães com queixa primária de alteração ocular, onde foram realizados exame oftálmico completo, hemograma e exames para erliquiose (teste rápido e PCR). Como resultado, 5/33 (15,3%) cães foram positivos no teste rápido e na PCR e 4/33 cães foram positivos apenas no teste rápido, totalizando nove amostras positivas (27,3%). Os cinco cães positivos na PCR estavam infectados por *E. canis*, sendo que três deles estavam co-infectados por *A. platys* (9,1%). As uveítes anteriores dos cães com erliquiose foram mais frequentes (66,7%) e os sinais mais comuns foram hiperemia e edema corneano (100%), flare (77,8%), pressão intraocular baixa (77,8%) e neurite óptica (44,4%). Ainda nos positivos, as alterações oculares apresentaram-se bilateralmente em 88,9% ($P < 0,047$), com associação positiva da infecção com trombocitopenia ($P < 0,001$), com anemia associada à trombocitopenia ($P < 0,0001$) e com a presença de neurite óptica ($P < 0,013$). A uveíte e a neurite óptica, quando associadas à presença de anemia e trombocitopenia são fortemente indicativas de infecção por erliquiose ($P < 0,0001$ e $P < 0,003$, respectivamente). Conclui-se que a erliquiose deve ser considerada suspeita diagnóstica na presença de neurite óptica e de uveítes associadas à anemia e trombocitopenia em cães, mesmo na ausência de outros sinais clínicos comuns. A identificação do agente envolvido por meio da PCR permite maximizar o conhecimento das características da apresentação da infecção de acordo com a espécie envolvida.

Palavras-chave: 1. Erliquiose. 2. Cães. 3.Uveíte. 4. PCR. 5. Neurite óptica.

ABSTRACT

Ehrlichiosis, a disease caused by *Ehrlichia canis*, is widespread in Brazil and frequently diagnosed in infectious uveitis in dogs. The objective of this study was to report the occurrence of natural infection by agents of the *Anaplasmataceae* family in dogs with ocular alterations, to investigate the presence of co-infection and to document the ocular and hematological alterations present. The 33 dogs in this study were seen primarily for ocular changes only with no other symptoms. After undergoing complete ophthalmic examination, blood count and tested for ehrlichiosis (rapid in-clinic test and PCR), the results indicated that 5/33 (15.3%) dogs were positive in both rapid in-clinic test and PCR while 4/33 (12.1%) dogs were positive only in rapid in-clinic test, totaling nine positive samples (27.4%). The five dogs positive in PCR were infected with *E. canis*, 3 of which were also co-infected with *A. platys* (9.1%). Of the dogs with ehrlichiosis, 66.7% also had anterior uveitis and the most frequent symptoms were hyperemia and corneal edema (100%), flare (77.8%), low intraocular pressure (77.8%), and neuritis optica (44.4%). In addition, ocular changes were bilateral in 88.9% ($P < 0.047$), and positively associated with thrombocytopenia infection ($P < 0.001$), anemia associated with thrombocytopenia ($P < 0.0001$), and presence of optic neuritis ($P < 0.013$). Uveitis and optic neuritis, when associated with anemia and thrombocytopenia, are strongly indicative of ehrlichiosis infection ($P < 0.0001$ and $P < 0.003$, respectively). It is concluded that ehrlichiosis should be considered as a differential diagnosis in the presence of optic neuritis and uveitis associated with anemia and thrombocytopenia in dogs, even in the absence of other common clinical symptoms. The agent involved in the infection should be determined by PCR to optimize the diagnosis of the infection according to the species involved.

Key-words: 1.Ehrlichiosis. 2.Dogs. 3.Uveitis. 4. PCR. 5. Optic neuritis.

INTRODUÇÃO

A Erliquiose está presente em todas as regiões do Brasil devido a ampla distribuição de seu vetor, o *Rhipicephalus sanguineus*, sendo frequentemente diagnosticada na presença de uveíte infecciosas em cães. Outros agentes da família *Anaplasmataceae* possuem o mesmo vetor, tornando a utilização da biologia molecular necessária para maximizar o conhecimento do parasita envolvido e suas particularidades, além da importância para a saúde pública, já que podem acidentalmente acometer seres humanos.

Existem vários testes laboratoriais para diagnóstico da doença, incluindo sorologias e PCRs, onde se observa maiores índices de positividade nas sorologias em relação a PCR, o que pode ser justificado pela presença de diferentes espécies de microrganismos, já que os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* possuem vários antígenos em comum. A PCR é um teste molecular com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico preciso destes agentes e contribui para o conhecimento da ocorrência e caracterização da doença em diversas regiões (Waner et al. 2001; Oriá, 2008; Costa et al, 2015; Guedes et al., 2015; Gottlieb, 2016).

A *Ehrlichia canis* está envolvida na maioria dos casos infecciosos de déficit visual e cegueira total em cães (Leiva et al.; 2005; Komnenou et al., 2007; Panciera et al., 2010), e os estudos sugerem grande incidência de manifestações oculares na Erliquiose canina (Leiva et al.; 2005; Komnenou et al., 2007; Oriá et al., 2008; Panciera et al., 2010; Pinto & Carvalho, 2015) tornando necessária a inclusão dessa doença no diagnóstico diferencial de Oftalmopatias, principalmente na presença de descolamento de retina exudativo e uveíte anterior (Massa et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi investigar, através da técnica de PCR, a ocorrência da infecção natural por espécies da família *Anaplasmataceae* envolvidas em casos de uveíte, neurite óptica e glaucoma em cães atendidos em uma clínica particular no Distrito Federal, Brasil.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos experimentais desse projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso Animal - CEUA – UnB (Protocolo 40/2017).

Foram incluídos no estudo cães, machos ou fêmeas, de qualquer idade, selecionados por apresentarem uveíte anterior, posterior, panuveíte ou glaucoma como primeiro ou único sintoma de infecção natural por *Ehrlichia*. Foram admitidos 501 cães no setor de oftalmologia de uma clínica veterinária de Brasília - DF, Brasil, entre fevereiro de 2017 a agosto de 2018, por motivos diversos como úlcera de córnea, perfurações, glaucoma, anomalias de cílios, alterações palpebrais, traumas, neoplasias, ceratoconjuntivite seca, alterações congênitas, doenças endócrinas, catarata e uveítes, e somente 33 animais possuíam uveíte ou glaucoma sem causa conhecida e preenchiam os critérios para o estudo. Os seguintes critérios de inclusão foram utilizados: (1) possuir como primeira ou única queixa do tutor qualquer alteração oftálmica como déficit visual, hiperemia, opacidade, neovascularização, úlceras, ceratoconjuntivite seca, déficit visual ou cegueira, associados à uveíte, neurite ou glaucoma; (2) Nenhum histórico de doença neoplásica, metabólica, autoimune ou trauma ocular; (3) nenhum tratamento anterior no período de 30 dias que antecedeu a inclusão.

Os cães foram submetidos a exame oftálmico completo, incluindo testes visuais, teste de fluoresceína, teste de Schirmer®, teste de tempo de quebra do filme lacrimal (BUT), oftalmoscopia indireta, Biomicroscopia com lâmpada de fenda (SL 17 Kowa®), aferição da pressão intraocular (Tonovet Icare®, Icare Finland OV, Vanaa, FI ou Tonopen Aviavet®, Reichert Technologies, NY, EUA), documentação das alterações oculares presentes e de segmento posterior, quando possível, por meio de retinografia (ClearView Optical Imaging System®), realizada na própria clínica.

A uveíte anterior foi definida pela presença de sinais como: miose, pressão intraocular baixa, injeção ciliar, edema corneano, flare, espessamento de íris ou *Rubeosis Iridis*, hifema,

hipópio e precipitados ceráticos. A uveíte posterior definida por meio de fundoscopia, com a observação de áreas descoloridas ou escuras na região tapetal e não tapetal, presença de hemorragias ou exudatos na retina, e alterações vasculares. A presença de neurite óptica pela observação de edema ou hiperemia da cabeça do nervo, e imagem “borrada” do disco óptico, ou quando não possível a visualização do fundo, a realização de ultrassonografia ocular. O glaucoma foi identificado por sinais frequentes como buftalmia, ingurgitamento e tortuosidade de vasos episclerais, escavação de nervo óptico ou atenuação de vasos retinianos e aumento da pressão intraocular.

As manifestações oculares foram documentadas como ausentes ou presentes no caso de hiperemias, edema corneano, espessamento de íris, flare, miose, hifema, pressão baixa, neurite óptica, hemorragia de retina e descolamento de retina.

Foi realizada a coleta de sangue dos 33 cães do estudo, por meio de punção da jugular, para realização de hemograma, de teste rápido para Erliquiose (Ehrlichiosis Ac Test Kit Alere®, EUA ou SNAP 4Dx Plus IDEXX Laboratories®, EUA) e análise molecular (PCR) para Família *Anaplasmataceae* (Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília). As amostras de sangue total foram coletadas durante o primeiro atendimento e armazenadas em tubos com EDTA para realização dos exames, e mantidas a 4°C até a realização da PCR. O hemograma buscou revelar a presença de anemia, trombocitopenia ou leucopenia nos cães com a doença, realizado pelo analisador hematológico Sysmex Poch Vet 100i Diff® (tecnologia de impedância e foco hidrodinâmico empregada com reagente específicos para animais) confirmadas por meio de esfregaços sanguíneos e microhematócrito, assim como relacionar essas alterações a algum sinal oftálmico.

A Erliquiose foi tratada com Doxiciclina na dose de 5mg/kg a cada 12 horas, durante 28 dias. As uveítes anteriores foram tratadas topicamente com acetato de Prednisolona 1% colírio (Predfort®) 4 vezes ao dia até a remissão, e cicloplégico quando indicado. Nos casos de neurite óptica e uveíte posterior/panuveíte foi usado por via oral prednisona 2-4 mg/kg uma vez ao dia, por 5 a 10 dias e 0,5 a 1mg/kg uma vez ao dia por 5 a 10 dias, respectivamente.

Nos casos de glaucoma, foi prescrito Dorzolamida 2% colírio a cada 8 ou 12 horas e um lubrificante quando necessário. Os animais que permaneceram visuais e sem recidiva da inflamação ocular até a conclusão deste estudo, apresentaram boa recuperação; os animais que permaneceram visuais, mas tiveram recidiva do quadro ocular foram classificados como parcialmente recuperados e os que perderam a visão ou o olho, foram descritos como perda visual.

3.1 Testes rápidos utilizados

Os testes rápidos são cada vez mais utilizados nas clínicas veterinárias pela sua praticidade e rapidez de resultado. Os testes utilizados no experimento encontravam-se armazenados entre 18 e 25 °C, como recomendado pelo fabricante, e para realização do teste o sangue do animal estava na temperatura ambiente.

3.1.1 Erliquiose Ac test kit Alere®

O Erliquiose Ac test kit Alere® faz a detecção qualitativa de anticorpos IGg e IGm por meio de Imunocromatografia e possui especificidade de 100% e 98,2% sensibilidade para *E.canis*, de acordo com a informação do fabricante.

3.1.2 SNAP 4Dx Plus IDEXX®

O teste SNAP 4Dx Plus IDEXX Laboratories® possui tecnologia de ELISA, com sensibilidade de 97,1% e especificidade de 95,3%, para o gênero *Ehrlichia* (*E. canis* e *E. ewingii*) e de 90,3% e 94,3% para o gênero *Anaplasma* (*A. platys* e *A. phagocytophilum*), respectivamente, de acordo com a informação do fabricante. O agente *E. canis* é detectado pela presença de anticorpos contra peptídeos derivados da principal proteína imunodominante P 30 e P30-1 do parasita e pela reação cruzada com *E. ewingii* usando o peptídeo derivado da

proteína de membrana externa P28 da família. O agente *A. platys* é detectado pela reação cruzada com *A. phagocitophilum*, que encontra sua proteína de membrana dominante, a P44 (STILLES et al., 2014).

3.2 Análise Molecular (PCR)

Os exames de PCR foram processados no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB). O DNA foi extraído das amostras coletadas (200µL) com a utilização do kit comercial Illustra™ (Blood GenomicPrep Mini Spin Kit, GE, UK), seguindo as instruções do fabricante.

A reação para PCR foi realizada primeiramente com oligonucleotídeos para família *Anaplasmataceae* EHR16SD (5'-GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC-3') e EHR16SR (5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3'), para amplificação do fragmento 345 bp (Inokuma et al., 2000). Posteriormente, as amostras positivas para família *Anaplasmataceae* (Figura 2) foram amplificadas com os oligonucleotídeos específicos para *E. canis* (ECAN5 – 5' – CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA – 3', e HE3 – 5' – TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT – 3', fragmento 396bp) (Murphy et al., 1998); para *A. platys* EHR16SR (5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3') e PLATYS (5'-GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG-3', fragmento 678 bp) (Inokuma et al., 2000); e *A. phagocitophilum* (MSP3F (5'CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG-3' e MSP3R 5'GCC CAG TAA CAT CAT AAGC-3') para amplificação do fragmento 334bp (LEVIN et al., 2002).

Também foram pesquisados através de PCR *Leishmania spp* e *Piroplasmida* de todas as amostras, para fins de exclusão de co-infecção com outros parasitas e relação causal apenas com espécies da família *Anaplasmataceae*. Para piroplasmídeos foram utilizados os oligonucleotídeos BTBABE BT1-F (5'-GGTTGATCCTGCCAGTAGT-3') e BT1-R (5'-GCCTGCTGCCTTCCTTA-3') para amplificação do fragmento 400bp (Gimenez et al., 2009). Na reação para *Leishmania*, para amplificação do fragmento 500bp foram utilizados os

oligonucleotídeos R221 (5' GGTTTCCTTTCCTGATTTACG- 3') e R332 (5' - GGCCGGTAAAGGCCGAATAG – 3'), descritos por Schonian et al.; 2003.

Todas as reações foram realizadas em duplicata para garantir maior confiabilidade dos testes, utilizando como controle negativo água ultra pura miliQ autoclavada, e como controle positivo, as amostras disponíveis no laboratório já sequenciadas e armazenadas para cada agente. Para garantir a qualidade das extrações, as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3fosfato desidrogenase (GAPDH) utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R (Birkenheuer et al. 2003).

As amplificações, anelamentos e desnaturações foram feitas no Termociclador C1000 thermal cyler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), e posteriormente separados através de eletroforese com gel de agarose a 1,5 ou 2% (aproximadamente 40 minutos a 65V) e fixados em brometo de etídio (0,2mg/μL), para visualização em câmara com Luz ultravioleta (UV transilluminator® UVP LLC, Upland, CA).

3.3 Protocolos de amplificação

3.3.1 GAPDH

A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, 10ng de DNA, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1μL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25μL. O protocolo de amplificação foi composto de etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.2 Família *Anaplasmataceae* (EHR16SD e SR)

A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, 10ng de DNA, 25 mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 3µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol, 2,4 mM MgCl₂ e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.3 *E. canis* (ECAN5 e HE3)

A mistura da PCR foi composta de tampão 1X, MgCl₂ a 1,5mM (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 10ng de DNA, 25mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 63°C por 2 minutos e 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.4 *A. platys* (EHR16SR e PLATYS)

Mistura composta de tampão 1X, MgCl₂ a 3,2mM (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 10ng de DNA, 25mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.5 *A. phagocytophilum* (MSP3 – F e MSP3 – R)

Mistura composta de tampão 1X já acrescido de MgCl₂ a 1,5mM (Promega Corporation®, WI EUA), 10ng de DNA, 25 mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 2µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de Taq DNA polimerase (Promega Corporation®, WI EUA), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.6 Piropasmídeos (BTBABE 18S BT1-F e BT1-R)

A composição da mistura foi formada com tampão 1X da Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 3 mM de Mgcl₂, 10ng de DNA, 25mM de deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1 U de taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.7 *Leishmania spp.* (R221 e R332)

A composição da mistura foi formada com tampão 1X da Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1,5mM de MgCL₂, 10ng de DNA, 25mM de deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1 U de taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos,

seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste exato de Fisher foi utilizado para testar a associação entre as variáveis nominais e a positividade (avaliada pela sorologia e PCR) para Erliquiose. O teste t de student para amostras independentes foi conduzido para comparar as médias das variáveis quantitativas entre os animais infectados e não-infectados. As variáveis nominais foram apresentadas na forma de frequência absoluta e ou relativa, enquanto que as variáveis quantitativas foram apresentadas na forma de média \pm desvio-padrão. Todas as análises estatísticas acima descritas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Statistical Package for Social Science (IBM SPSS, versão 17, IBM Corp., Armonk, NY, EUA) e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de sangue total de cães domiciliados em Brasília-DF, sendo 14 machos e 19 fêmeas, de raças variadas (Shih Tzu, Schnauzer, Pit Bull, Teckel, Fox Paulistinha, Fila Brasileiro, Akita, Beagle, Bull Terrier, Buldog Campeiro, Chow Chow, Australian Cattle Dog, Cocker Spaniel, Labrador e cães sem raça definida), de 1 a 13 anos, com idade média de $7,9 \pm 3,6$ anos.

Todos os cães foram testados com teste rápido disponível (Tabela 1; Figura 1) e posteriormente através de PCR. Dos 33 cães, cinco eram positivos tanto no teste rápido quanto na PCR (15,2%, 3 fêmeas e 2 machos), e quatro apenas no teste rápido, totalizando nove amostras positivas (27,3%, seis fêmeas e três machos). Os quatro cães positivos no teste rápido, foram considerados doentes pela associação desse resultado com sinais oftálmicos ativos e com as alterações de hemograma. Os sinais oculares presentes nos cães infectados e não-infectados estão relacionados na Tabela 2.

A média de idade e desvio padrão dos cães positivos foi de $4,9 \pm 3$ anos ($P < 0,038$). Os cinco cães positivos para família *Anaplasmataceae* (Figura 2A) através da PCR estavam infectados por *E. canis* (Figura 2B), sendo que três deles estavam co-infectados por *A. platys* (9,1%) (Figura 3). O teste SNAP 4Dx Plus® não identificou nenhum agente além da *E. canis*, mesmo a PCR tendo mostrado 3 cães positivos para *A. platys*. Todas as amostras foram negativas na PCR para *A. phagocytophilum*, Piroplasmídeos ou Leishmaniose através de PCR.

Tabela 1 Testes rápidos realizados nos cães do estudo e seus resultados

RG	TESTE UTILIZADO	RESULTADO
C1	SNAP 4Dx®	N
C2	SNAP 4Dx®	N
C3	SNAP 4Dx®	N
C4	ALERE®	P
C5	SNAP 4Dx®	P
C6	ALERE®	N
C7	SNAP 4Dx®	P
C8	SNAP 4Dx®	P
C9	SNAP 4Dx®	N
C10	SNAP 4Dx®	N
C11	SNAP 4Dx®	N
C12	SNAP 4Dx®	P
C13	SNAP 4Dx®	P
C14	SNAP 4Dx®	N
C15	ALERE®	N
C16	ALERE®	N
C17	ALERE®	N
C18	SNAP 4Dx®	N
C19	SNAP 4Dx®	N
C20	SNAP 4Dx®	P
C21	SNAP 4Dx®	N
C22	SNAP 4Dx®	P
C23	SNAP 4Dx®	N
C24	SNAP 4Dx®	N
C25	ALERE®	N
C26	SNAP 4Dx®	N
C27	SNAP 4Dx®	N
C28	SNAP 4Dx®	N
C29	SNAP 4Dx®	N
C30	SNAP 4Dx®	N
C31	SNAP 4Dx®	N
C32	SNAP 4Dx®	N
C33	SNAP 4Dx®	P



Figura 1 Teste rápido para erliquiose SNAP 4Dx Plus® IDEXX Laboratories® do cão C33. A seta vermelha mostra o resultado positivo para *E. canis*.

Nos cães positivos por teste rápido ou PCR, a apresentação bilateral das uveítes foi significativamente maior (8 animais) do que a unilateral (1 animal) com $P=0,047$. Não houve associação da Erliquiose com sexo ($P=0,698$), mas houve significância na média de idade dos cães positivos, $4,9 \text{ anos} \pm 3$, com $P= 0,038$ (Tabela1). A alteração mais frequente foi a uveíte anterior (6/9), seguida de neurite óptica (4/9) e panuveíte (3/9), sem associação significativa da doença com a localização da inflamação ocular e da presença de uveíte com a positividade dos testes. Um total de 10 animais com glaucoma foram incluídos no estudo e dois eram positivos para Erliquiose por meio do teste rápido. A pressão intraocular baixa foi observada em 7 dos 9 cães infectados (77,8%), sendo que dois deles apresentavam hipotonia em um olho e glaucoma secundário no olho contralateral (Figura 3 - A e B). Todos os animais apresentavam hiperemia conjuntival em um ou nos dois olhos e 7/9 (77,8%) apresentaram edema corneano em um ou nos dois olhos (Figura 4). O flare ocorreu bilateralmente em 7/9 (77,8%), e apenas 2/9 apresentaram miose nos dois olhos (22,2%). A injeção ciliar, o espessamento de íris e o hifema se manifestaram em 3 animais uni ou bilateralmente (33,3%). Observou-se 3 casos de hemorragia retiniana e 3 casos de descolamento de retina nos 33 animais incluídos, sendo que 2 deles estavam relacionados à EMC (Figura 5). O resumo da apresentação dos sinais oculares dos cães positivos para infecção está descrito na Tabela 4.

Tabela 2 Apresentação dos sinais oculares dos cães infectados e não- infectados

Sinais Oculares	N	Infectados		Não-Infectados	
		Presente	Ausente	Presente	Ausente
Unilateral		1		13	
Bilateral	14	8		11	
Uveíte anterior	19	6		16	
Uveíte Posterior	22	0		1	
Panuveíte	1	3		2	
	5				
Neurite	5	4*	5	1	23
Descolamento de retina	4	2	7	1	23
Hemorragia de retina	4	3	6	1	
Glaucoma	10	2	7	8	
					16

* 4 positivos por meio de teste rápido (80%) e 3 por meio de PCR (60%) com $P= 0,013$ e $0,017$, respectivamente, no Teste de Fischer.

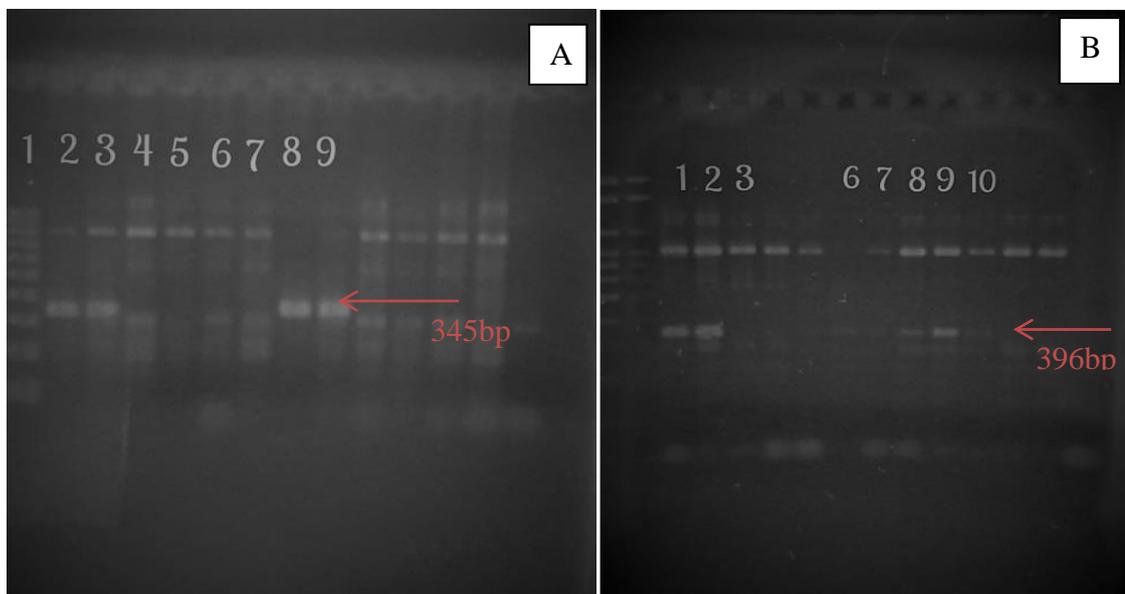


Figura 2 Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR para família *Anaplasmataceae* e para *E. canis* em cães. A- Amplificação para Família Anaplasmataceae utilizando os oligonucleotídeos EHR SD/SR. 1: Marcador de peso Molecular; 2 e 3: controle positivo em duplicata; 4, 5, 6, 7: negativos; 8 e 9: positivos em duplicata. B – Amplificação de *E. canis* utilizando os oligonucleotídeos ECAN e HE3 1 e 2: Controle positivo; 3 e 7: negativos; 6, 8, 9 e 10: positivos.

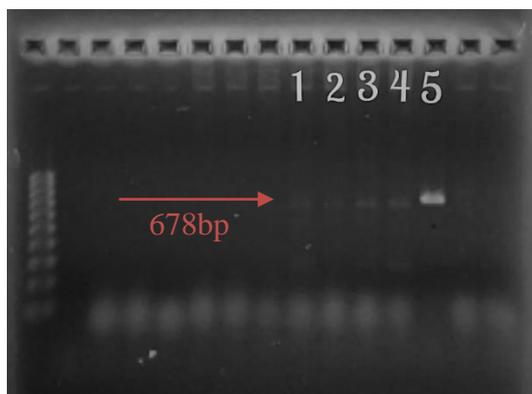


Figura 3 Eletroforese em gel agarose corado com brometo de etídio mostrando o resultado da PCR para *A. platys* utilizando os oligonucleotídeos EHRSR e PLATYS. 1,2,3 positivos, 4 e 5 controles positivos.

Treze cães apresentavam anemia ($HCT \leq 36.9\%$), dez apresentavam trombocitopenia (Plaquetas ≤ 199.000) e três apresentavam leucopenia (leucócitos $\leq 5.9 \times 10^3/\mu L$). Os nove animais positivos no teste rápido para Erliquiose apresentavam anemia, representando 69,3% do total de animais anêmicos, 2 apresentavam leucopenia e 2 leucocitose, sendo a alteração menos comum. Os valores de Hematócrito e Plaquetas possuem média e desvio padrão com valor estatístico significativo (Tabela 3).

Dos dez cães que apresentavam trombocitopenia, sete tiveram a doença confirmada. A anemia associada à trombocitopenia representou 24,2% de todos os cães do estudo, entretanto, dentre os nove cães positivos, o número de animais com essa alteração foi significativamente maior ($P=0,0001$), representando 77,8%. A anemia e a trombocitopenia estiveram associadas à infecção erliquial nos cães. Os valores hematológicos dos cães positivos para a infecção e as alterações hematológicas associadas à presença de uveíte ou neurite óptica estão descritas nas Tabelas 4 e 5 respectivamente.

Tabela 3 Valores das médias e desvio padrão de idade e dos achados laboratoriais dos 33 cães positivos e negativos para Erliquiose no teste rápido ou na PCR

Variável		MÉDIA	DESVIO PADRÃO	P-valor
Idade(anos)	Positivos	4,93	3	0,038*
	Negativos	7,9	3,5	
Leucócitos(/μl)	Positivos	10373,33	6323,11	0,618
	Negativos	11703,7	6892,3	
Hematócrito(%)	Positivos	27,25	5,08	<0,0001*
	Negativos	42,7	5,8	
Plaquetas(/μl)	Positivo	129.700	132667,1	<0,0001*
	Negativos	402.904	225394,6	

N= 32 cães, 01 cão sem dado de idade; * Test T-student.

Tabela 4 Valores hematológicos dos cães naturalmente infectados, diagnosticados por meio do teste rápido e por meio da PCR para família *Anaplasmataceae*

ID	HCT (%)	Plaquetas(/ μ l)	Leucócitos (/ μ l)	Teste rápido	PCR EHR SD/SR
C4	34.6	410.000	9.000	+	-
C5	27.8	174.000	20.100	+	-
C7	23	47.000	21.800	+	+
C8	21.2	84.000	9.400	+	-
C12	28	108.000	3.700	+	+
C13	26	249.000	9.880	+	+
C20	34	130.000	5.380	+	+
C22	30	29.000	6.900	+	+
C33	20.7	119.000	7.200	+	-

Tabela 5 Alterações laboratoriais e associações das alterações laboratoriais com a presença de uveíte e neurite nos animais infectados (9) e não-infectados (24)

ALTERAÇÃO	Infectados		Não-Infectados	
	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Anemia	9	0	4	20
Trombocitopenia	7	2	3	21
Leucopenia	2	7	1	23
Leucocitose	2	7	2	22
Anemia e Trombocitopenia	7	2	1	23
Uveíte associada à anemia e trombocitopenia	8*	1	1	23
Neurite associada à Anemia e trombocitopenia	4*	5	0	24

* $P < 0,01$. Teste de Fischer.

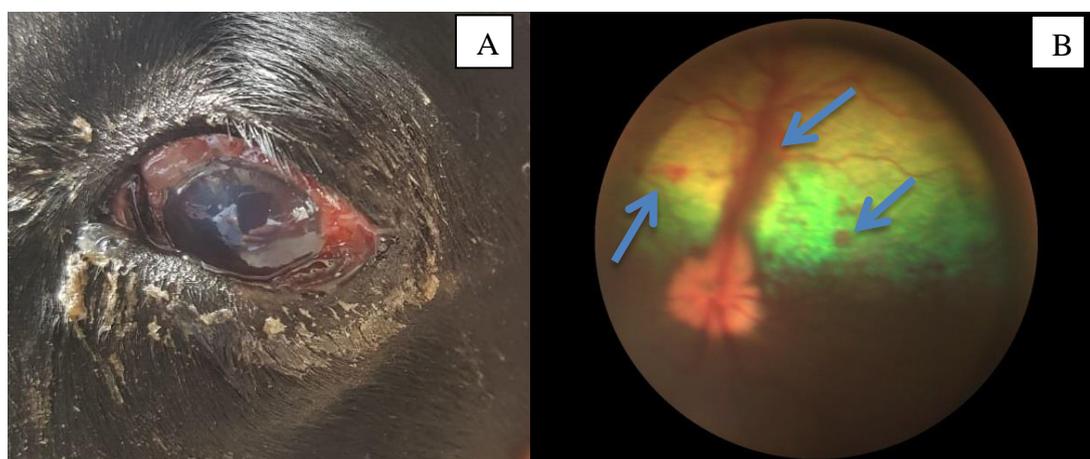


Figura 4 Glaucoma secundário no olho esquerdo de cão da raça Labrador, positivo para Erliquiose no teste rápido (cão C33). A - Observa-se hiperemia conjuntival, congestão conjuntival e buphthalmia. B – foto da fundoscopia do olho contralateral (direito) do mesmo cão, observa-se neurite óptica e focos hemorrágicos na retina (setas).

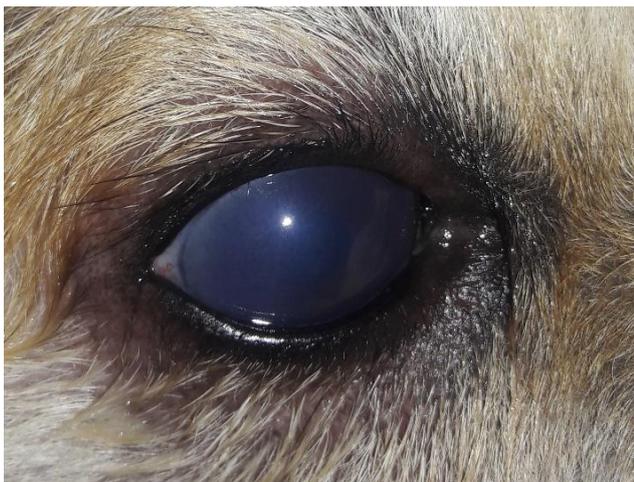


Figura 5 Fotografia do olho direito de cão da raça Akita com uveíte anterior bilateral (Cão C16). Observa-se a opacidade corneana por edema.

Os três cães co-infectados por *E. canis* e *A. platys* apresentavam anemia associada à trombocitopenia, entretanto os sinais oculares eram diversos, um com uveíte anterior, um com uveíte anterior e neurite, e um com panuveíte e neurite. O cão co-infectado que apresentava panuveíte e neurite óptica era adulto (4 anos) da raça Bull Terrier, e o tutor relatou cegueira súbita como única queixa. No exame oftálmico notou-se midríase (Figura 6), alterações no teste de obstáculos, reflexos pupilares lentos bilateralmente e resposta negativa ao teste de ameaça em ambos os olhos. Na fundoscopia foram observadas hemorragias retinianas, neurite óptica e descolamento parcial da retina (Figura 7. A a F) e este cão apresentou recuperação total da visão após o tratamento. Os outros dois cães co-infectados que apresentavam uveíte anterior, e uveíte anterior associada à neurite óptica bilateral, tiveram recuperação total após o tratamento da EMC e o tratamento ocular.

A neurite óptica foi identificada em 4 cães com Erliquiose (3 tanto no teste rápido quanto na PCR, e apenas um por meio do teste rápido), representando uma frequência de 44,4% nos animais parasitados ($P=0,013$) e a doença foi responsável por 80% das causas de neurite observadas. A Erliquiose esteve associada a neurite óptica diagnosticada tanto por sorologia ($P= 0,013$) como por PCR ($P= 0,017$). Um animal apresentou uveíte anterior associada à neurite, e três cães apresentaram panuveíte associada à neurite. Além disso, a neurite e a uveíte quando associadas à trombocitopenia e anemia, demonstram correlação com o teste positivo (PCR e Sorologia) para Erliquiose ($P= 0,003$ e $P= 0,0001$, respectivamente).

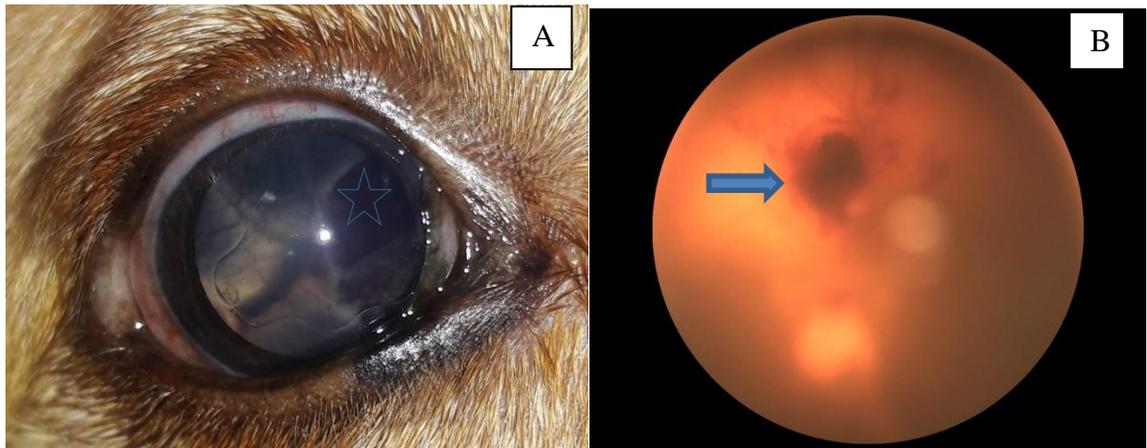


Figura 6 Fotografias das alterações do olho direito do cão SRD C12, positivo para *E. canis* através de PCR. A - Observa-se descolamento de retina total e presença de hemorragia (estrela azul). B: fotografia do fundo desse mesmo olho, observa-se a falta de foco devido ao descolamento de retina e focos hemorrágico na retina (seta azul).

Após o tratamento da doença e das alterações oftálmicas, observou-se boa resposta em 5 cães (dois deles eram co-infectados), 55,6%, que permaneceram visuais e sem recidivas. Um cão (co-infectado) teve resolução parcial, pois apresentou recidiva da inflamação ocular após o tratamento e continua sob acompanhamento (11,1%). Houve perda visual em três animais (33,3%), sendo que dois perderam um globo ocular devido a glaucoma secundário, e um cão permanece em acompanhamento das sequelas oculares, sem visão dos dois olhos.

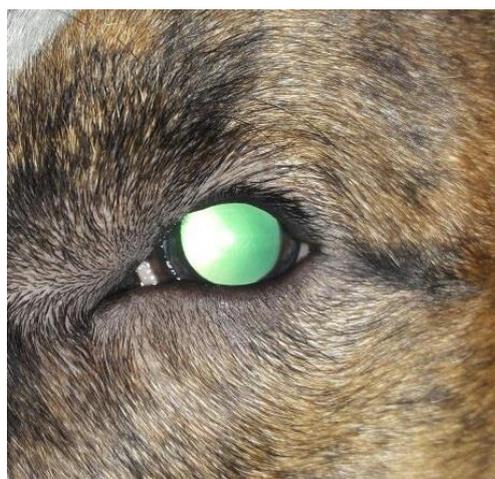


Figura 7 Fotografia do olho esquerdo do cão C-20, da raça Bull Terrier, avisional no primeiro atendimento, co-infectado por *E. canis* e *A. platys* na PCR. Observa-se midríase.

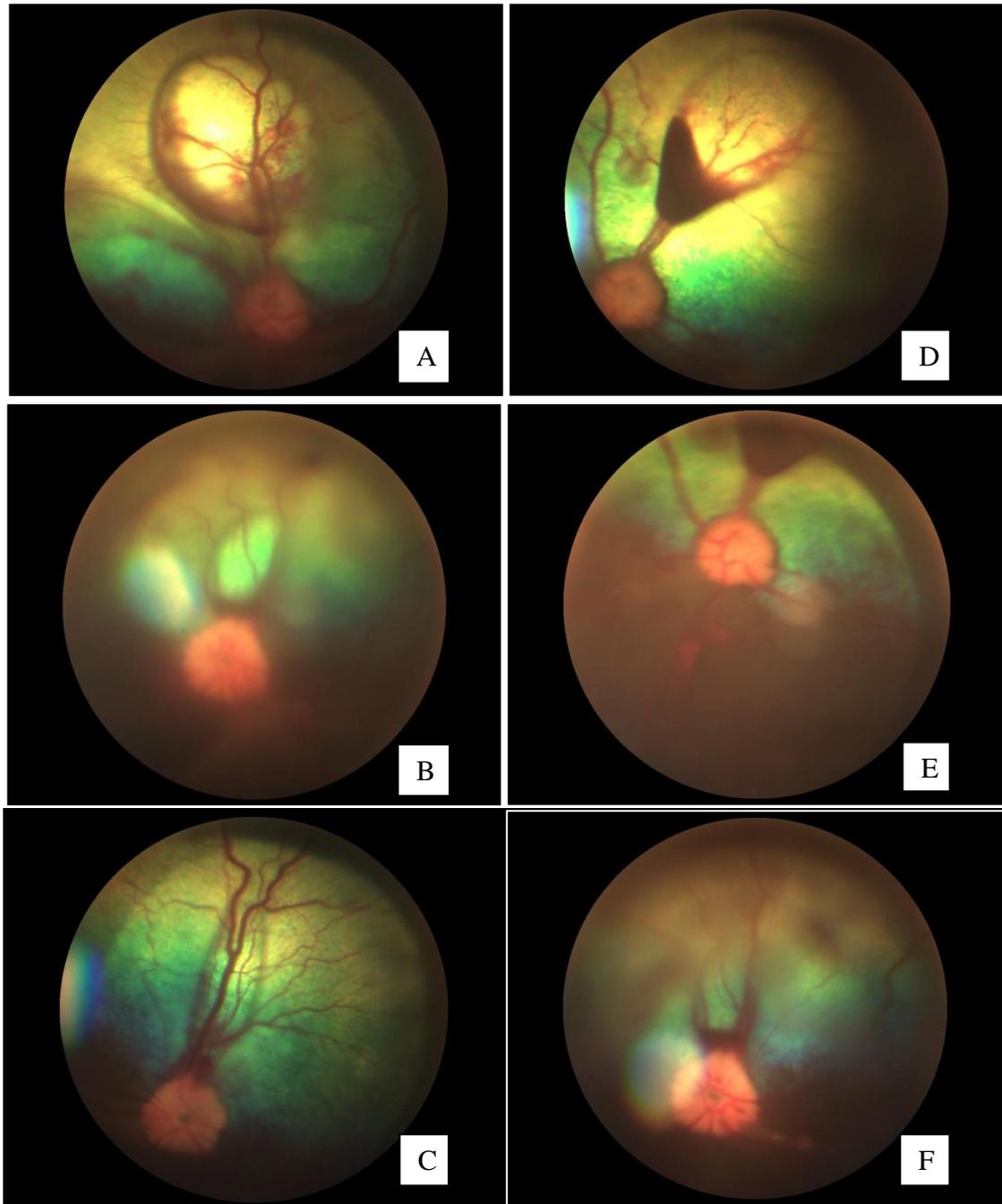


Figura 8 Sequência de fotografias de fundo de olho do cão C-20 (Bull Terrier) do primeiro atendimento e após o tratamento. A, B e C – Retinografia do olho direito do cão. A: primeiro atendimento, observa-se descolamento de retina focal, hemorragias retinianas e neurite óptica; B: Após 3 dias de tratamento, início da remissão das alterações, ainda presença de neurite óptica e descolamento focal de retina; C: Retinografia após 14 dias de tratamento; D, E e F: Retinografia do olho esquerdo do mesmo cão. D: Descolamento de retina fica com hemorragia retiniana e neurite óptica; E: Após 3 dias de tratamento, ainda com mesmo quadro; F: Retinografia após 14 dias de tratamento.

6 DISCUSSÃO

A manifestação ocular de doenças sistêmicas representa um importante papel na suspeita diagnóstica de neoplasias, infecções e alterações imunológicas. Esse experimento incluiu 33 cães que foram levados para atendimento devido a alteração ocular, onde o exame oftálmico sugeria causa sistêmica. Segundo estudos prévios, o Distrito Federal é considerado endêmico para Erliquiose com 27,8% de prevalência da doença (Labarthe et.al., 2007), e alta incidência de *E. canis* e *A. platys* em animais selvagens de cativeiro em Brasília, (30,76%) e (53,85%) respectivamente, o que demonstra a importância de se pesquisar a ocorrência destes parasitas nos cães domésticos desta região (Silva et al., 2015). A média de idade dos cães infectados foi 4,9 anos, podendo estar relacionada à maior atividade dos cães nessa idade, ou passeios com seus tutores, portanto maior exposição ao vetor, tendo em vista que a maioria dos estudos não correlacionam a presença da infecção com idade (McQuiston et al., 2003; Silva et al., 2011; Harrus & Waner, 2011; Ribeiro et al. 2017). Entretanto, a média de idade pode estar relacionada com a melhor resposta de recuperação desses pacientes. Não houve associação com o sexo.

A pesquisa da manifestação ocular na Erliquiose torna-se importante pela variedade de apresentação da clínica geral, com sinais inespecíficos, podendo ser desde assintomática a severa, com variação de resposta de indivíduos, diferentes quantidades de patógenos e co-infecção (Little et al., 2010), portanto esse estudo procurou selecionar apenas cães com sintomatologia ocular, condição relativamente comum (Leiva et al., 2005), com objetivo de se estabelecer novos caminhos para a suspeita da doença.

A uveíte não esteve significativamente relacionada à Erliquiose, como descrito por Oriá et al. (2008) ($P=0,545$), entretanto a apresentação bilateral foi significativamente mais comum que a unilateral ($P< 0,047$) concordando com os demais estudos (Massa et al., 2002; Leiva et al., 2005; e Komnenou et al., 2007), entretanto, apesar da frequência maior de uveítes

anteriores (6/9) nos trabalhos, essa localização não apresentou significância em relação à presença da doença ($P= 0,288$), resultado também observado no estudo de Leiva et al. (2005), onde a panuveíte foi mais frequente do que a uveíte anterior.

Os sinais mais frequentes foram hiperemia (100%), edema (100%), flare (77,8%) e pressão intraocular baixa (77,8%), o hifema, a hemorragia de retina, a injeção ciliar e o espessamento de íris apresentaram uma frequência de 33,3%. Os sinais menos comuns foram miiose e descolamento de retina (22,2%). Dados semelhantes são encontrados de forma dividida, pois a diversidade de frequência e localização dos sinais oculares varia nos estudos (Massa et al., 2002; Leiva et al., 2005; Komnenou et al., 2007 e Oriá et al. 2008). Esse fato pode estar relacionado ao estágio da doença, carga parasitária e a resposta do hospedeiro (Little et al., 2010), de toda forma, essa pesquisa corrobora com o relato de que a manifestação é mais frequentemente anterior, com a presença de flare aquoso e hipotonia ocular, de apresentação bilateral e fortemente associada à neurite óptica.

Como resultado importante, encontrou-se forte correlação entre a positividade para erliquiose, tanto no teste rápido quanto na PCR, e a presença de neurite óptica ($P= 0,013$), o que sugere que a erliquiose deve ser incluída como diagnóstico diferencial. A associação dos sinais oculares com as alterações hematológicas mostrou-se uma ferramenta útil quando não é possível realizar os testes de anticorpos ou de DNA, pois a trombocitopenia e anemia, clássicas na erliquiose, quando associadas à presença de uveíte ou de neurite óptica apresenta correlação significativa ($P= 0,0001$ e $P=0,003$, respectivamente). A resposta ao tratamento das alterações oculares causadas por Erliquiose foram boas em 55,6% dos casos, parciais em 11,1%, e pobre em 33,3%, em acordo com o relato de Komnenou et al. em 2007 e Leiva et al. em 2005, mostrando que a taxa de perda visual com possibilidade de perda do globo ocular em 33,3% dos casos é bastante importante para consideração desta morbidade na suspeita diagnóstica frente a presença de uveíte.

A Erliquiose possui diagnóstico complexo, baseado em história, sinais inespecíficos e exames laboratoriais associados, pois a doença possui diferentes estágios e diferentes respostas do organismo (Waner et al., 2001; Martin, 2005; Oriá, 2008; Guedes et al., 2015;

Dziegiel, 2016). De acordo com esse consenso, os quatro cães desse estudo que tiveram resultado positivo para erliquiose apenas no teste rápido foram considerados doentes com base na associação deste resultado com a presença dos sinais oculares ativos compatíveis com a hemoparasitose e nas alterações hematológicas associadas. É importante a associação desses fatores para diagnóstico visto que os sinais inespecíficos das hemoparasitoses podem estar presentes em todas as fases, mais brandos ou mais severos a depender da cepa, da imunocompetência e da co-infecção com outros patógenos (Woody & Hoskins, 1991), e na crônica a carga parasitária é menor, contribuindo para maior taxa de negatividade no exame de PCR.

O presente estudo corrobora com os resultados de Souza et al. (2010), Araes-Santos (2015) e Gotlieb et. al (2016), visto que 27,3% (9/33) dos cães estudados foram positivos para erliquiose por meio de teste rápido e apenas 15,2% (5/33) por meio de PCR. Os cães positivos no teste rápido apresentavam sinais oftálmicos e alterações hematológicas sugestivas de hemoparasitose, entretanto, somente 5 cães puderam ter o agente da doença identificado. Este resultado pode ser explicado pela presença de reação cruzada nos testes rápidos, já que os agentes do gênero compartilham antígenos idênticos, ou ainda, por ser um teste que atua na detecção de anticorpos, podendo estar associado à exposição do agente ou infecção crônica, mas sem relação causal com a doença em curso (Waner et al., 2001; Guedes et al., 2015). Esse achado corrobora com outros estudos que mostram a importância da complementação diagnóstica com testes moleculares (Dagone et al., 2006; Araes-Santos e al. 2015; Guedes et al., 2015) e a utilização dos testes rápidos para se conhecer a distribuição geográfica e possíveis ameaças à saúde pública causadas por esses agentes (Little et al., 2014).

A realização do teste molecular no presente trabalho foi importante para a identificação de *E. canis* em 5 cães, onde 3 deles também estavam infectados por *A. platys*, confirmando a existência de co-infecção nos cães domésticos da região. A existência de infecção por *E. canis* e *A. platys* no mesmo cão também foi observada por Santos et al. (2007) em Ribeirão Preto-SP, Dagone et al. (2009), em Jaboticabal-SP e por Almazán et al. (2015), no México, fato possibilitado pela presença do vetor em comum, o *R. sanguineus*. Em contrapartida, a positividade para *E. canis* em 4 cães que tiveram a PCR negativa podem estar associada à

baixa carga parasitária, nas fases crônicas da doença, ou pela eliminação do agente pelo sistema imunológico (Guedes et al., 2015, Dziegiel et al., 2016). Recentemente, Ribeiro et al. (2017) relataram a presença de 32,9% de cães infectados por *A. platys* no Paraná, ausência de infecção por *E. canis*, e a detecção inédita da co-infecção por *A. platys* e *Babesia vogeli* na região (3,8%), diferentemente do que foi encontrado nessa amostragem de Brasília, o que pode ser justificado pela população diferente de patógenos na nossa região.

Neste estudo não foram detectadas discordâncias dos resultados de sorologias negativas com o exame de PCR, sugerindo que não houve resultado falsos-negativos nas sorologias ou que os animais positivos não estavam na fase aguda da doença quando testados (Harrus & Waner, 2011). O teste rápido SNAP 4Dx foi utilizado em dois animais co-infectados, entretanto, apesar da reação cruzada entre *A. phagocytophilum* e *A. platys* estar descrita experimentalmente, nenhum dos dois tiveram resultados positivos para Anaplasma, como visto no estudo de Dziegill et al., 2016, que relacionou esse resultado com a utilização do teste SNAP 4Dx em fases iniciais da doença, onde os anticorpos ainda não podem ser identificados.

Os resultados das médias de hematócrito e plaquetas dos cães positivos para erliquiose nesse estudo vão ao encontro ao descrito na literatura, onde a anemia e a trombocitopenia são alterações hematológicas comuns (Dagone et al., 2003; Soares et al. 2006; Cesar, 2008; Silveira et al., 2015; Gottlieb, 2016). Os nove cães positivos (sorologia e/ou PCR) apresentavam anemia ($P < 0,0001$) e 7/9 apresentavam trombocitopenia ($P < 0,0001$). Um estudo anterior revelou que 66,3% dos cães trombocitopênicos e 33,7% dos cães não trombocitopênicos estavam infectados *E.canis*, mostrando que a espécie é mais comum em animais trombocitopênicos, assim como observado no presente trabalho, onde 77,8% dos cães que apresentavam redução na quantidade de plaquetas, estavam infectados por *E.canis*, e 22,2% dos cães com Erliquia não eram trombocitopênicos. Bulla et al. (2004) descreveram sobre o grau da trombocitopenia e a infecção por *E. canis*, sugerindo que animais trombocitopênicos sejam sempre testados para Erliquiose.

Ainda sobre as alterações hematológicas, a anemia esteve associada à trombocitopenia em cães com Eriquiiose, com $P < 0,0001$ e com a co-infecção ($P=0,015$). Esses resultados permitem inferir que cães com anemia e trombocitopenia tem alta possibilidade de diagnóstico de *E. canis*, como já descrito por Silva et al. (2012). Além dessa associação, também foi relatada a presença de *A. platys* com a trombocitopenia, discordando da pesquisa de Ribeiro et al. (2017) onde os cães infectados somente por *A. platys* apresentavam trombocitopenia, mas sem associação significativa com a infecção desse agente. No presente estudo, não foi encontrada mono – infecção por *A. platys* para avaliar essa associação.

Nessa pesquisa não foi identificada a presença de *A. phagocytophilum*, *Babesia spp.* e *Leishmania spp.*, ou algum cão infectado somente por *A. platys*, o que sugere que as alterações oculares encontradas nos animais estão associadas à infecção por *E.canis*, corroborando com relatos previamente descritos, onde a inflamação ocorre predominantemente no corpo ciliar e na íris, podendo afetar também, em menor grau a coróide e a retina (Panciera et al., 2001). A realização de PCR para *Babesia spp.* investiga a co-infecção de *E. canis* com *Babesia spp*, tendo em vista que as duas possuem o mesmo vetor, o *R. sanguineus*, ectoparasita de interesse para a saúde pública, uma vez que pode transmitir doenças aos seres humanos (Dantas-Torres et al., 2008).

CONCLUSÃO

No presente trabalho, a infecção natural por agentes da família *Anaplasmataceae* foi identificada em cães que apresentavam apenas alterações oculares. Os cinco cães positivos para a família *Anaplasmataceae* na PCR estavam infectados por *E.canis* e três deles estavam co-infectados por *A. platys*. A neurite óptica foi fortemente indicativa de Erliquiose, e a uveíte associada a alterações hematológicas como trombocitopenia e anemia também, sendo assim, cães aparentemente assintomáticos para EMC poderão apresentar alterações visuais ou lesões exclusivamente oftálmicas e o tratamento precoce poderá determinar o prognóstico de visão do cão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M.A.; LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhiphicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **J Med Entomol.** V. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.

ARAES-SANTOS, A.I.; MORAES-FILHO, J.; PEIXOTO, R.M.; SPOLIDORIO, M.G.; AZEVEDO, S.S.; COSTA, M.M.; LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C. Ectoparasite Infestations and Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in a Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Vetor-borne and Zoonotic Diseases.** v.15, n.11, p.645-651, 2015.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVI, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of clinic and microbiology**, v. 41, p. 4172-4177, 2003.

BOUZOURAA, T.; RENE-MARTELLET, M.; CHÊNE, J.; ATTIPA, C.; LEBERT, I.; CHALVET-MONFRAY, K.; CADORÉ, J.L.; HALOS, L.; CHABANNE, L. Clinical and Laboratory Features of Canine *Anaplasma platys* Infection in 32 Naturally Infected Dogs in Mediterranean basin. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.004>. 2016.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO JR, J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic área. **Veterinary Research.** V.35, p. 141–146, 2004.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, or Bartonella vinsonii. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO Jr, J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WEYDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in an endemic area. **Veterinary Research**. v. 35, p. 135-146, 2004.

COSTA, A.P.; COSTA F.B.; LABRUNA, M.B.; SILVIERA, I.; MORAES-FILHO, J.; SPOLIDORIO, M.G.; GUERRA, R.M.S.N.C. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Parasitology**. v. 24, n. 1, p. 28-35, 2015.

CULLEN, C.L.; WEBB, A. Ocular Manifestations of Systemic Disease – Part 1: The Dog. In: GELLAT, K.C. **Veterinary Ophthalmology**. 5th.ed. Wiley-Blackwell, 2013. Chapter 35, p.1897- 1977.

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

DAGNONE, A.S. Caracterização molecular de espécies da família *Anaplasmataceae* em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal – SP e de Campo Grande – MS. Tese apresentada à faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de doutor em medicina veterinária (Patologia Animal), setembro de 2006.

DAGONE A.S.; SOUZA A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of *Anaplasmataceae* organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.18, n. 4, p. 20-25, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v.1, n.25, 2008.

DE TOMMASI, A.S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T.; TASCA, S.; CANTACCESSI, C.; BREITSCHWERDT E.B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.; CAPELLI, G.; CAPRARIIS, D. Evaluation of Blood and Bone Marrow in Selected Canine Vector-Borne Diseases. **Parasites & Vectors**, v.7, p. 534, 2014.

DINIZ, P. P. V. P.; SCHWARTZ, D.S.; MORAIS, H.S.A.; BREITSCHWERDT, E.B. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 7, n. 4, p. 689-697, 2007

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

DZIEGIEL, B.; ADASZEK, L.; CARBONERO, A.; LYP, O.; WINIARCZYK, M.; DEBIAK, P.; WINIARCZYK, S. Detection of canine vector-borne diseases in eastern Poland by ELISA and PCR. **Parasitology Res**. v. 115, p. 1039-1044, 2016

EIRAS, D.F.; CRAVIOTTO, M.B.; VEZZANI, D.; EYAL, O.; BANETH, G. First description of natural Ehrlichia canis and Anaplasma platys infections in dogs from Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** (2012) , <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.11.008>

GAFF, H.D.; KOGAN, K.M; SONENSHINE, D.E. Tick-borne Rickettsiosis II (*Anaplasmataceae*) in: **Biology of Ticks**. 2th ed. Oxford University Press, 2013. Chapter 9, p. 251-277.

GIMENEZ, C.; CASADO, N.; CRIADO-FORNELIO, A.; MIGUEL, F.A.; DOMINGUEZ-PENAFIEL, G. A molecular survey of Piroplasmida and Hepatozoon isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain). **Veterinary Parasitology**. V.162, P. 147-150, 2009.

GOTTLIEB, J.; ANDRE, M.R.; SOARES, J.F.; GONÇALVES, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; COSTA, M.M.; LABRUNA, M.B.; BORTOLINI, C.E.; MACHADO, R.Z.; VIEIRA, M.I.B. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 172-178, 2016.

GUEDES, P.E.B.; OLIVEIRA, T.N.A.; CARVALHO, F.S.; CARLOS, R.S.A; ALBUQUERQUE, G.R.; MUNHOZ, A.D.; WENCESLAU, A.A.; SILVA, F.L. Canine Ehrlichiosis: Prevalence and Epidemiology in northeast Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 115-121, 2015.

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

KOMNENOU, A.A.; MYLONAKIS, M.E.; KOUTI, V.; TENDOMA, L.; LEONTIDES, L.; SKOUNTZOU, E.; DESSIRIS, A.; KOUTNASS, A.F.; OFRI, R. Ocular manifestations of natural Canine Monocytic Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 3, p. 137-142, 2007.

INOKUMA, H, RAOLT D, BROUQUI P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 38, p. 4219-4221, 2000.

LABARTHE, N.; PEREIRA, M.C.; BARBARINE, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C.A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**. v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LEIVA, M.; NARANJO, C.; PEÑA, M.T. Ocular signs of Canine Monocytic Ehrlichiosis: A retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 6, p. 387-393, 2005.

LEVIN, L.M.; NICHOLSON, W.L.; MASSUNG, R.F.; SUMNER, J.W.; FISH, D. Comparison of the Reservoir Competence of Medium-Sized Mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v.2, n.3, 2002.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinic of Small Animals**. v. 40, p. 1121–1140, 2010.

MARTIN, ANTONY R., BROWN, GRAEME K.; DUNSTAN, R. HUGH; ROBERTS, TIMOTHY K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**. V.109, p. 176–180, 2005.

MASSA, K.L.; GILGER, B.C; MILLER, T.L.; DAVIDSON, M.G. Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, n. 2, p. 93-98, 2002.

MAZZOTTI, G.A.; SILVA, W.A.C.; CARNEIRO, F.T.; SCALON, M.C.; LIMA, M.A.; TEIXEIRA, M.A.; LIMA, A.C.F.; PALUDO, G.R. Investigação molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia spp.* em felídeos selvagens cativos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 38, n. 3, p. 528-535, 2018.

McQUISTON, J.H.; McCALL, C.L.; NICHOLSON, W.L. Ehrlichiosis and related infections. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.223, n.12, p. 1750–1756, 2003.

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

NAGAKHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRE, M.R.; BALDANI, C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.766-770, 2008.

ORIÁ, A.P.; NETO, F.A.D.; MACHADO, R.Z.; SANTANA, A.E.; GUERRA, J.L.; SILVA, V.L.D.; BEDFORT, P.G.C.; LAUS, J.L. Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 95-97, 2008.

PANCIERA, R.J.; EDWING, S.A.; CONFER, A.W. Ocular Histopathology of Ehrlichial Infections in the Dog. **Veterinary Pathology**, v.38, p. 43-46, 2001.

PINTO, A.B.T.; CARVALHO, C.B. Oftalmopatias na erliquiose monocítica canina. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**. v.6, n. 12, p. 442-452, 2013.

RAJA, H.; MERCER, R.C.; BAKRI, S.J. Presumed posterior uveitis related to ehrlichia exposure. **Retinal cases & brief reports**, v.10, p. 134-136, 2016.

RIBEIRO, C.M.; MATOS, A.C., AZZOLINI, T.; BONES, R.B.; WASNIESKI, E.A.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; LUCHEIS, S.B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.37, n.2, p. 129-133, 2017.

SANTOS, F., COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.A.; OLIVEIRA, L.P.; ROBERTO, P.G.; BENEDETTI, R.B.R.; ZUCOLOTO, L.B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia spp.* in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Local and Imported Clinical Samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 47, p. 349–358, 2003.

SILVA, G.C.F.; BENITEZ, A.N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M.C.; GARCIA, J.L.; FREITAS, J.C.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 21, n. 4, p. 379-385, out.-dez. 2012

SILVA, M.U.M.; FERNANDES, R.A.; NOGUEIRA, J.L.; AMBRÓSIO, C.E. Erliquiose Canina: Revisão de Literatura. **Arq. Ciência Vet. Zool.** v. 14, n.2, p. 139-143, 2011.

SILVA, W.A.C. Ocorrência da infecção por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Distrito Federal e Goiás. Dissertação de mestrado apresentada pelo programa de saúde animal da Universidade de Brasília, 2015.

SILVEIRA, J.A.G.; VALENTE, P.C.L.G.; PAES, P.R.O.; VASCONCELOS, A.V.; SILVESTRE, B.T.; RIBEIRO, M.F.B. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. **Ticks and Tick-borne diseases**. v. 6, n. 3, p. 242-5, 2015.

SOARES, A.O.; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A., RODRIGUES, A.F.S.F; D'AGOSTO, M.; DAEMON, M. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.15, n. 1, p. 13-16, 2006

SOUZA, B.M.P.S.; LEAL, D.C.; BARBOZA, D.C.P.M.; UZÊDA, R.S.; ALCÂNTARA, A.D.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M.B.; GONDIM, L.F.P.; FRANKE, C.R. Prevalence of Ehrlichial Infection among dogs and ticks in northeastern Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 19, n. 2, p. 89 – 93, 2010.

STILLMAN, B.A.; MONN, M.; LIU, J.; THATCHER, B.; FOSTER, P.; ANDREWS, B.; LITTLE, S.; EBERTS, M.; BREITSCHWERDT, E.B.; BEALL, M.; CHANDRASHEKAR, R. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **Journal, of American Veterinary Medical Association**, v. 245, n.1, 2014.

VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOD, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.V.P.; MORAIS, H.A.; MESSICK, J.B.; LABRUMA, M.B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, jan.-mar. 2011.

WANER T.; HARRUS S.; BARK H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 69, p.307-317, 1997.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, S.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for Ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of Canine Monocytic Ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Vet Parasitology**. v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

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