

Prevalência de *Ehrlichia canis* pela *Nested-PCR*, correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo*

Mara Rúbia Rocha Pereira Sales¹⁺, Mariana Drummond Costa Ignacchiti², Aguinaldo Francisco Mendes Junior³, Weslem Garcia Suhett⁴, Lenir Cardoso Porfírio⁵, Mozart Marins⁶, Karina Preising Aptekmann⁵ e Olavo dos Santos Pereira Júnior⁷

ABSTRACT. Sales M.R.R.P., Ignacchiti M.D.C., Mendes Junior A.F., Suhett W.G., Porfírio L.C., Marins M., Aptekmann K.P. & Pereira Júnior O.S. [**Prevalence of *Ehrlichia canis* using the *nested-PCR*, correlation with the presence of morulae and thrombocytopenia in dogs treated in Veterinary Hospital of the Federal University of Espírito Santo.**] Prevalência de *Ehrlichia canis* pela *Nested-PCR*, correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(1):47-51, 2015. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Rua Projetada s/nº, Caixa Postal 25, Pontal, Marataízes, ES 29349-000, Brasil. E-mail: mararrps@yahoo.com.br

Ehrlichia canis, is the primary etiologic agent of canine monocytic ehrlichiosis. The disease is mainly transmitted by the brown dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* in different endemic regions of Brazil. The purpose of this study was determined using the Nested Polymerase Chain Reaction (*nested-PCR*) the prevalence of *Ehrlichia canis* in 85 dogs, regardless of race, age, sex or health status, treated at the Veterinary Hospital of Federal University of Espírito Santo, in Alegre-ES and evaluate its correlation with the presence of morulae and thrombocytopenia. It was observed that 1.17% of the samples were positive by blood smear, for the presence of morulae. However, the *nested-PCR* showed 5.88% positivity of samples. And 17.64% samples showed thrombocytopenia. By analyzing all the techniques, it was concluded that the introduction of diagnostic techniques such as *nested-PCR* is an important method for aid in early diagnosis of pathologies.

KEY WORDS. *Ehrlichia canis*, morulae, *nested-PCR*, thrombocytopenia.

RESUMO. *Ehrlichia canis* é o agente etiológico primário da erliquiose monocítica canina. A doença é transmitida principalmente pelo carrapato marrom

do cão, o *Rhipicephalus sanguineus*, sendo endêmica em diversas regiões do Brasil. A realização deste estudo teve como objetivo determinar, por meio da

* Recebido em 6 de janeiro de 2013.

Aceito para publicação em 6 de março de 2014.

¹ Médica-veterinária, MSc. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), Rua Projetada s/nº, Caixa Postal 25, Pontal, Marataízes, ES 29349-000, Brasil. *Autora para correspondência, E-mail: mararrps@yahoo.com.br

² Bióloga, DSc. CCA-UFES, Alto Universitário s/nº, Caixa Postal 16, Guararema, Alegre, ES 29500-000, Brasil. E-mail: marianadci@gmail.com

³ Curso de Medicina Veterinária, CCA-UFES, Alto Universitário s/nº, Guararema, Alegre, ES 29500-000. E-mail: aguinaldo_zootec@hotmail.com

⁴ Médico-Veterinário, Farmacêutico. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, s/n, Campus Universitário, Londrina, PR 86057-970, Brasil. E-mail: weslemsuhett@gmail.com - bolsista CNPq.

⁵ Médica-veterinária, DSc. CCA-UFES, Alto Universitário s/nº, Caixa Postal 16, Guararema, Alegre, ES 29500-000. E-mails: lenircp@yahoo.com.br; kapreising@yahoo.com.br

⁶ Biólogo, DSc. Departamento de Biotecnologia Vegetal de Plantas Mediciniais, Universidade de Ribeirão Preto, Av. Costabile Romano, 2201, Ribeirania, Ribeirão Preto, SP 14096-900, Brasil. E-mail: mmarins@unaerp.br

⁷ Farmacêutico, DSc. Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Av. Presidente Costa e Silva, 2999/3000, São Pedro, Juiz de Fora, MG 36037-000, Brasil. E-mail: olavoufesjr@gmail.com

técnica de *nested*-PCR, a prevalência da *Ehrlichia canis* em 85 cães, independente de raça, idade, sexo ou estado de saúde, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Alegre-ES, e avaliar sua correlação com a presença de mórula e trombocitopenia. Observou-se que 1,17% das amostras analisadas pelo esfregaço sanguíneo foram positivas para a presença de mórula. A *nested*-PCR demonstrou positividade para 5,88% das amostras. E 17,64% das amostras apresentaram trombocitopenia. Ao analisar as técnicas, conclui-se que a introdução de técnicas de diagnóstico molecular como a *nested*-PCR é um método importante para o auxílio no diagnóstico precoce de patologias.

PALAVRAS-CHAVE. *Ehrlichia canis*, mórula, *nested*-PCR, trombocitopenia.

INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC), foi a primeira espécie de *Ehrlichia* descrita no Brasil a infectar cães (Labruna & Pereira 2001). São bactérias gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórios de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, tais como monócitos e macrófagos e, para algumas espécies, em células mielóides, tais como neutrófilos (Dumler et al. 2001). É transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato marrom do cão, de distribuição cosmopolita, particularmente encontrado em regiões de climas tropicais e subtropicais (Waner & Harrus 2000, Aguirre et al. 2004). Caracterizada como uma enfermidade parasitária que acomete cães de todas as raças e idades. No Brasil, a EMC foi primeiramente descrita por Costa et al. (1973), em cães da raça Pastor Alemão, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

A patogênese da EMC envolve três fases consecutivas: aguda, subclínica com infecção assintomática persistente e a fase crônica (Harrus et al. 2002). As principais alterações hematológicas provocadas pela EMC incluem trombocitopenia, anemia e leucopenia (Dagnone et al. 2001, Harrus et al. 2002, Bulla et al. 2004, Machado 2004, Sousa et al. 2010).

O diagnóstico laboratorial da infecção causada por *E. canis* é de grande importância, uma vez que 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias em vários estados do Sudeste, Sul, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil, apresentam anticorpos contra antígenos de *E. canis* (Dagnone et al. 2001, Labarthe et al. 2003, Moreira et al. 2003). O diagnóstico pode ser feito através da visu-

alização de mórulas do parasito em células mononucleares, detecção de anticorpos contra *E. canis* ou ainda a amplificação de uma porção do genoma do parasito através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Breitschwerdt 2000). La Scola & Raoult (1997) relataram que a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) é técnica de escolha para o diagnóstico da EMC, pois pode detectar o agente mesmo antes da formação de mórulas ou de soroconversão. Porém, a identificação da espécie deve ser feita com a PCR tipo "*Nested*", que é uma técnica altamente sensível e específica para a detecção de *E. canis*, por incluir na sua execução uma etapa de re-amplificação do produto (Wen et al. 1997). Assim, esse estudo teve como objetivo determinar a prevalência da *Ehrlichia canis* em cães com e sem suspeita clínica para EMC, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Alegre-ES, por meio da técnica de *Nested*-PCR, e avaliar sua correlação com a presença de mórulas e trombocitopenia.

MATERIAL E MÉTODOS

População

O estudo incluiu 85 cães, independente de raça, idade, sexo ou estado de saúde, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET), localizado no município de Alegre-ES, no período de agosto a novembro de 2010.

Coleta de sangue, análise hematológica e parasitológica

Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em tubos contendo EDTA 10% (ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante. Parte do sangue foi destinado para a realização de exame hematológico e pesquisa de estruturas compatíveis com mórula de *Ehrlichia*, por meio do esfregaço sanguíneo.

Os esfregaços foram fixados com álcool metílico por 3 minutos, secado e corado por coloração do tipo Giemsa. Transcorridos de 10 a 20 minutos, foram enxaguados em água corrente e novamente secados, para então serem analisados no microscópio óptico com óleo de imersão em aumento de 100 vezes (Olicheski 2003). No hemograma, analisou-se a série plaquetária de acordo com Kaneko (1997). Foram considerados trombocitopênicos os animais que apresentaram valores inferiores ou iguais a $200.000.\mu\text{L}^{-1}$ plaquetas.

Extração do DNA e técnica de *Nested*-PCR

A extração de DNA das amostras foi realizada com o auxílio do Kit Blood GenomicPrep de acordo com o boletim técnico do fabricante (GE Healthcare). Todas as amostras foram analisadas quanto a integridade do DNA em gel de agarose 0,7%. O DNA foi armazenado a -30°C até sua utilização pela técnica de *Nested*-PCR.

Para verificar a presença de *E. canis*, as amostras de DNA foram testadas como o auxílio da técnica de *Nes-*

ted-PCR de acordo com Wen et al. (1997) e Murphy et al. (1998), como descrito abaixo.

Para a primeira mistura reacional foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ECC (5'-AGAACGAACGC-TGGCGGCAAGC-3') e ECB (5'-CGTATTACCGCGGC-TGCTGGCA-3') na concentração de 20 nmols cada, que direcionaram a amplificação de um fragmento de 458 pares de bases (pb) do gene 16S rRNA de todas as *Ehrlichia* sp., 5,0 µl de tampão (10x), 3,0 µl de MgCl₂ (25mM), 2,0 µl de dNTP (0,25µmol), 1,0 µl de Taq DNA polymerase (1,5U - Fermentas), 10 µl de DNA genômico (20ng/µl) e água ultrapura q.s.p. para um volume total de 50 µl.

Para a segunda reação, em 1 µl da primeira, foram adicionados os oligonucleotídeos específicos ECAN (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') e HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') que direcionam a amplificação de um fragmento de 398pb *E. canis* específica. Os demais componentes da mistura reacional foram mantidos como descrito para a primeira amplificação, em um volume final de 50 µl.

Ambas as reações de amplificação foram conduzidas no termociclador (Techne® TC-412) em programa constituído um etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida por 1 minuto para a ligação dos oligonucleotídeos à temperatura de 55°C, e 1 minuto de extensão a 72°C. Após os 40 ciclos, as reações foram mantidas a 72°C por 7 minutos para extensão final. As reações foram avaliadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão de corrida TBE 1X e visualizadas no transluminador, acoplado a um sistema de fotodocumentação (L-PIX HE, Loccus Biotecnologia).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 85 amostras caninas avaliadas por meio da técnica de PCR, 5,88% (05/85) se mostraram positivas para *Ehrlichia* sp., sendo observado a amplificação de um fragmento de DNA de 458pb a partir do gene 16S rRNA, como exemplificado na Figura 1, linha 2. Ao serem submetidas à reação da nPCR, em 100% (05/05) das amostras foram detectados fragmentos de aproximadamente 398pb, característicos para *E. canis*, como descrito por Murphy et al. (1998) (Figura 1).

Entre as amostras analisadas, de acordo com médico veterinário clínico do HOVET 10 foram de animais com alguma suspeita clínica de EMC, dentre elas: anemia, hipertermia, petéquias, perda de peso. A amplificação de DNA da *E. canis* foi confirmada por meio da técnica de nPCR em 30% (03/10) dessas amostras. Este dado foi similar ao encontrado por Bulla et al. (2004), em Botucabu, São Paulo, e inferior ao encontrado em Jaboticabal, São Paulo (Nakaghi et al. 2008). Já 2,35% (02/85) das amostras não tiveram suspeita clínica para o parasito, e se mostraram positivas. O que demonstra que a

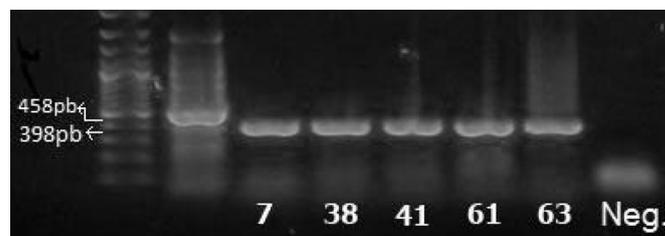


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio do produto de PCR de amostras de sangue de cães atendidos no HOVET. Fragmentos de 458pb, caracteriza positivo para *Ehrlichia* sp., e 398pb, caracterizam os produtos amplificados positivo para *Ehrlichia canis*. Linha 1, marcador de peso molecular (100pb); linha 2, controle positivo *Ehrlichia* sp.; linhas 3 a 7, amostras testadas, positivas para *E. canis*; linha 8, controle negativo (cão sabidamente negativo para a doença). CCA-UFES, Campus de Alegre, 2011.

técnica pode ser utilizada no auxílio do diagnóstico, culminando em tratamentos mais eficazes, uma vez que a nPCR é um teste que tem a capacidade de detectar baixa parasitemia e inferir se um cão soropositivo é portador ou não do parasito (Iqbal et al. 1994, Harrus et al. 1998).

Na pesquisa realizada por meio da técnica de esfregaço sanguíneo, foi observada a presença de mórula em 1,17% (01/85) das amostras. Este dado corrobora com o estudo de Nakaghi et al. (2008), que ao analisarem 30 cães, detectaram-se apenas um animal positivo (3,33%), e inferior ao encontrado em Uberlândia, Minas Gerais (Borin et al. 2009), no qual evidenciaram-se 251 cães (5,69%) portadores de mórula de *Ehrlichia* sp., e 219 cães (13,89%), positivos para corpúsculos iniciais, elementares ou mórulas em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Albernaz et al. 2007). Sendo que, a amostra que se mostrou positiva por meio da técnica de esfregaço sanguíneo, foi considerada negativa para a nPCR. Para Mylonakis et al. (2003), um grande fator gerador de falso-positivo, seria a inobservância de mórulas e, de fato, inclusões intracitoplasmáticas em leucócitos, incluindo material de fagocitose ou grânulos azurófilos, dados que corroboram com o estudo de Ramos et al. (2009), Ueno et al. (2009) e Sousa et al. (2010). Vale ressaltar que, os valores encontrados em amostras de esfregaços sanguíneos podem ser inferiores aos encontrados através de outras técnicas de diagnóstico, pois em infecções subagudas ou crônicas, a parasitemia é muito baixa (Castro et al. 2004, Moreira et al. 2005). O estudo de Nakaghi et al. (2008) demonstra tal afirmação, pois dos 30 animais analisados, apenas 01 demonstrou positividade pela técnica de esfregaço sanguíneo, e 16 amostras (53,33%) foram positivas para a nPCR.

Na avaliação hematológica observaram-se, nos casos positivos por meio da nPCR, a presença de

trombocitopenia. Este resultado está em concordância com outros estudos realizados no Brasil (Albernaz et al. 2007, Meneses et al. 2008, Borin et al. 2009, Sousa et al. 2010).

A infecção por *E. canis* pode levar à supressão difusa da medula óssea, induzindo trombocitopenia, anemia e leucopenia (Gould et al. 2000), sendo que a trombocitopenia é o principal achado hematológico observado em todas as fases da EMC (Almosny et al. 2000, Pagani et al. 2000, Moreira et al. 2003), embora não seja exclusivo desta patologia, mesmo em área geográfica com a prevalência da doença relativamente elevada (Macieira et al. 2005). Assim, das 85 amostras avaliadas em nosso estudo, 17,64% (15/85) apresentaram trombocitopenia, no entanto, apenas 13,33% (02/15) destas foram positivas para EMC pela nPCR. Esses achados mostram que a presença de trombocitopenia não deve ser indicativo da presença de *E. canis*, sendo prudente a realização de testes complementares.

De acordo com Santos et al. (2009), em estudo realizado no município de Ribeirão Preto, São Paulo, de 221 cães avaliados, 107 (48,4%) apresentavam trombocitopenia. Embora 57 (53,3%) desses animais foram positivos para *E. canis*, com auxílio da técnica de nPCR, em 50 (46,7%) animais trombocitopênicos não foi detectado o parasito. De acordo com os autores, esse resultado reforça que a trombocitopenia não é específica para a detecção de infecção por *E. canis* e não deve ser utilizado exclusivamente para estabelecer um diagnóstico para esse parasito. Estudo realizado por Sousa et al. (2010) demonstraram que em 48 cães infectados com o parasito, 14 apresentaram trombocitopenia, não sendo observada diferença significativa com os cães negativos. Macieira et al. (2005), demonstraram que em 112 cães com diagnóstico positivo para EMC, com auxílio de oligosiniciadores específicos para *E. canis*, 30 (26,8%) apresentavam-se trombocitopênicos. Esses dados indicam que a presença ou ausência de trombocitopenia, não deve ser indicativo de EMC, pois animais sem essa alteração hematológica podem apresentar o parasito.

Em virtude de a EMC ser uma infecção causada por agentes rickettsiais em carrapatos, que possuem prevalência bastante variável em todo o mundo, tal disparidade ocorrida entre vários estudos, em relação a presença do parasito diagnosticada através da técnica da nPCR e sua correlação com a presença de mórulas e trombocitopenia pode estar associada com fatores climáticos, como à exposição da população canina ao vetor (Aktas et al. 2009, Ramos et al. 2009, Almeida et al. 2012).

O sucesso do tratamento dessa parasitose depende de um diagnóstico precoce, que deve ser realizado no início da patologia (Dagnone et al. 2001) pois os achados laboratoriais dos cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* são bastante similares com outras patologias e a duração e severidade dos sinais clínicos são variados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram a importância da técnica de nPCR no auxílio do diagnóstico de EMC na clínica de pequenos animais, em virtude de ser uma técnica sensível e específica quando comparada ao diagnóstico, por meio da detecção de mórula ou pela presença de trombocitopenia.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao técnico Jorge Pinto da Silva Filho, pela ajuda com a leitura das lâminas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES e FAPES).

REFERÊNCIAS

- Aguirre E., Sainz A., Dunner S., Amusatogui L., Lopz L., Rodríguez-Franco F., Luaces I., Cortés O. & Tesouro M.A. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet. Parasitol.*, 125:365-372, 2004.
- Aktas M., Altay K., Dumanli N. & Kalkan A. Molecular detection and identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species in ixodid ticks. *Parasitol. Res.*, 104:1243-1248, 2009.
- Albernaz A.P., Miranda F.J.B., Melo Jr O.A., Machado J.A. & Farjardo H.V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.*, 8:799-806, 2007.
- Almeida A.B.P.F., Paula D.A.J., Dahroug M.A.A., Feitas A.G., Silva J.N., Dutra V., Nakazato L. & Sousa V.R.F. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. *Ciênc. Agrar.*, 33:1123-1126, 2012.
- Almosny N.R.P., Massard C.L., Silva G.V.O., Rodrigues L.M. & Xavier M.S. Avaliação hematológica de cães infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, 7(Supl.1):111, 2000.
- Borin S., Crivelenti L.Z. & Ferreira F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61:566-571, 2009.
- Breitschwerdt E.B. The rickettsioses, p.400-407. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 5th ed. v.1, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000.
- Bulla C., Takahira R.K., Araújo 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 area. *Vet. Res.*, 35:141-146, 2004.
- Castro M.B., Machado R.Z., Aquino L.P.C.T., Alessi A.C. & Tinucci-Costa M. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.*, 119:73-86, 2004.
- Costa J.O., Silva M., Guimarães M.P. & Batista Junior J.A. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte-Brazil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, 25:199-200, 1973.
- Dagnone A.S., Morais H.S.A. & Vidotto O. Erliquiose nos animais e no homem. *Ciênc. Agrar.*, 22:191-201, 2001.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Becker C.P.J., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangurwa F.R. Reorganization of genera in the families' Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order

- Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51:2145-2165, 2001.
- Gould D.J., Murphy K., Rudolf H. & Crispin S.M. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *J. Small Anim. Pract.*, 41:263-265, 2000.
- Harrus S., Waner T., Aizeberg I., Foley J.E., Poland A.M. & Bark H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.*, 36:73-76, 1998.
- Harrus S., Allemar A.R., Bark H., Mahan S.M. & Waner T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet. Microbiol.*, 86:361-368, 2002.
- Iqbal Z., Chaichanasriwithaya W. & Rikihisa Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, 32:1658-1662, 1994.
- Kaneko J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. Academic Press, San Diego, 1997. 932p.
- Labarthe N., Campos Pereira M., Barbarini O., Mckee W., Coimbra C.A. & Hoskins J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Vet. Ther.*, 4:67-75, 2003.
- Labruna M.B. & Pereira M.C. Carrapato em cães no Brasil. *Clin. Vet.*, 30:24-31, 2001.
- La Scola B. & Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsiosis: current approach to diagnosis on fan old and new rickettsial disease. *J. Clin. Microbiol.*, 35:2715-2727, 1997.
- Macieira D.B., Messick J.B., Cerqueira A.M.F., Freire I.M.A., Linhares G.F.C., Almeida N.K.O. & Almosny N.R.P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Clin. Pathol.*, 34:44-48, 2005.
- Machado R.Z. Ehrlichiose canina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 13:53-57, 2004.
- Meneses I.D.S., Souza B.M.P.S., Teixeira C.M.M. & Guimarães J.E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, 9:770-776, 2008.
- Moreira S.M., Bastos C.V., Araújo R.B., Santos M. & Passos L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 55:141-147, 2003.
- Moreira S.M., Machado R. & Passos L.F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Ciênc. Rur.*, 35:958-960, 2005.
- Murphy G.E., Ewing S.A., Whitworth L.C., Fox J.C. & Kocan A.A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffensis*, and *E. ewingii* in dogs from Oklahoma. *Vet. Parasitol.*, 79:325-339, 1998.
- Mylonakis M.E., Koutinas A.F., Billinis C., Leontides L.S., Kontos V., Papadopoulos O., Rallis T. & Fytianou A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet. Microbiol.*, 91:197-204, 2003.
- Nakaghi A.C.H., Machado R.Z., Costa M.T., André M.R. & Baldani C.D. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciênc. Rur.*, 38:766-770, 2008.
- Olicheski A.T. *Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e Giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero Babesia (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero Ehrlichia (Ehrlich, 1888) em cães (Canis familiaris) no município de Porto Alegre, RS, Brasil*. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2003. 87f. (Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/2472/000370440.pdf?sequence=1>>). Acesso em: 20 dez, 2011.
- Pagani F., Rodrigues L.M., Pinto A.R.S., Gomes F.A., Mendonça R.B. & Almosny N.R.P. Alterações hematológicas observadas em casos de Ehrlichiose canina: Estudo retrospectivo. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, 7:108-108, 2000.
- Ramos C.A.N., Ramos R.A.N., Araújo F.R., Guedes Jr D.S., Souza I.I.F., Ono T.M., Vieira A.S., Pimentel D.S., Rosas E.O., Faustino M.A.G. & Alves L.C. Comparação de *nested*-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cão. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18:58-62, 2009.
- Santos F., Coppede J.S., Pereira A.L.A., Oliveira L.P., Roberto P.G., Benediti 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. *Vet. J.*, 179:145-148, 2009.
- Sousa V.R.F., Almeida A.B.P.F., Barros L.A., Sales K.G., Justino C.H.S., Dalcin L. & Bomfim T.C.B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. *Ciênc. Rur.*, 40:1309-1313, 2010.
- Ueno T.E.H., Aguiar D.M., Pacheco R.C., Richtzenhains L.J., Ribeiro M.G., Paes A.C., Megid J. & Labruna M.B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18:57-61, 2009.
- Waner T. & Harrus S. Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In: Carmichael L.E. (Ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, International Veterinary Information Service, Ithaca, 2000. (Disponível em: <http://www.ivi.org/advances/infect_dis_carmichael/waner/ivi.pdf>). Acesso em: 20 dez, 2011.
- Wen B., Rikihisa Y., Mott J.M., Greene R., Kim H.Y., Zhi N., Couto G.C., Unver A. & Bartsc R. Comparison of Nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.*, 35:1852-1855, 1997.