



Detecção e achados laboratoriais devido *Ehrlichia canis* em cães provenientes da zona sul de São Paulo - SP, Brasil

Stephanny Eringis de Queiroz¹, Daniel Moura Aguiar², Edilson Isídio da Silva Junior¹; Daniela Gabriel Reggiani¹, Tânia Regina Vieira de Carvalho¹, Rafael Garabet Agopian¹, Kleber da Cunha Peixoto Junior³, Adriana Cortez¹, Jonas Moraes-Filho^{1*}

¹Mestrado e Doutorado em Saúde Única, Universidade Santo Amaro, São Paulo, Brasil.

²Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Brasil.

³Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, Brasil.

RESUMO

OBJETIVO

Avaliar as alterações hematológicas em cães com diagnóstico de *Ehrlichia canis*.

MÉTODOS

Foram analisados 54 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro, São Paulo/SP, Brasil. Durante a consulta, a temperatura retal dos animais foi mensurada e amostras de sangue venoso foram coletadas para realização de hemograma e realização de testes sorológico e molecular, por meio de Imunofluorescência indireta e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, respectivamente.

RESULTADOS

Entre os 54 animais com suspeita de *E. canis*, 32 (59,3%) foram diagnosticados como positivos. Destes, 23 (42,6%) foram positivos apenas no teste sorológico, enquanto 9 (16,7%) apresentaram resultados positivos nos testes sorológicos e moleculares. A trombocitopenia foi a alteração mais importante encontrada neste estudo e foi o único parâmetro encontrado no hemograma que apresentou diferença estatística.

CONCLUSÕES

A trombocitopenia foi o principal achado em animais infectados e que a combinação dos diagnósticos moleculares e sorológicos pode aumentar as chances de detecção de infecção ou exposição ao agente.

DESCRITORES

Erlíquiose monocítica canina, Carrapato, Trombocitopenia, Anemia.

Autor correspondente:

Jonas Moraes-Filho.

Docente no Programa de Mestrado e Doutorado em Medicina e Bem-estar Animal e Saúde Única, Universidade Santo Amaro. R. Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 - Jardim das Imbuías, São Paulo - SP, Brasil

E-mail: jmfilho@prof.unisa.br

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4734-9512>

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

DOI: <https://doi.org/10.56242/globalhealth;2022;2;7;1-5>

INTRODUÇÃO

A Eritiquiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença transmitida no Brasil pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, cujo hospedeiro principal é o cão¹.

A apresentação da doença no cão pode variar de leve a grave, dependendo das condições imunológicas do hospedeiro, da virulência do isolado e da coinfeção com outros microrganismos^{2,3,4}. O suporte laboratorial é necessário para confirmação da infecção⁵. Os testes mais utilizados são Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e imunofluorescência indireta, mas o valor preditivo positivo e/ou negativo varia de acordo com o estágio de infecção no animal^{6,7,8,9,10}.

O Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro (HOVE-T-UNISA), localizado na zona sul da cidade de São Paulo/SP, Brasil, possui um alto número de casos de ehrlichiose canina, por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações hematológicas em cães com diagnóstico molecular e/ou teste sorológico para *Ehrlichia canis* tratados neste local.

MÉTODOS

Este estudo avaliou 54 (cinquenta e quatro) cães, do sexo masculino e feminino, de idades e raças variadas, que haviam sido atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro, localizado na Zona Sul de São Paulo. A amostragem de conveniência foi empregada entre cães que tiveram diagnósticos presuntivos para Eritiquiose Monocítica Canina (EMC), uma vez que apresentaram sinais clínicos relatados na literatura como sendo compatíveis com a doença, como anorexia, hiporexia, apatia, diarreia, hipertermia, emese, linfadenopatias, petéquias, neuropatias e alterações oculares¹¹. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de uso de Animais da Universidade Santo Amaro (CEUA-UNISA), com número de parecer: 16/2018.

Durante a consulta, a temperatura retal dos animais foi mensurada, e amostras de sangue venoso foram coletadas para realização de hemograma, testes sorológico e molecular. Foram obtidos valores de hematócrito, hemoglobina, glóbulos vermelhos, leucócitos e plaquetas em analisador automatizado. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada conforme Rosenfeld¹². Os parâmetros hematológicos relatados por Feldman et al.¹³ foram utilizados como valores de referência.

As amostras de sangue foram processadas individualmente para a extração de DNA usando o Kit de DNA Genômico Purelink por Invitrogen®.

O material obtido pela extração sanguínea canina foi analisado pela reação em cadeia de polimerase (PCR) com a intenção de amplificar a sequência parcial de nucleotídeos do gene *dsb*, utilizando os oligonucleotídeos iniciais denominados Dsb-321 (5'- TTGCAAAGAAGAAGATATGAAACA - 3'), Dsb-671 (5' - GCTGCTCCACAAAATATATCYCCTA - 3'), e a sonda TaqMan (5'- AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA - 3') 5' FAM/BHQ - 13', específico para o *E. canis* espécie, como previamente padronizado¹⁴. A amplificação, aquisição e análise de dados foram realizadas em um sistema de detecção multicolorcional para PCR em Tempo Real (7500 Sistemas PCR em Tempo Real - BioSystems Aplicados, Foster City, CA, EUA).

As amostras do soro dos animais foram submetidas à reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção e titulação de anticorpos anti-*E. canis*, de acordo com Aguiar et al.¹⁵. As placas para RIFI já haviam sido sensibilizadas com células DH82 infectadas pelo isolado Cuiabá#1. Foram considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência de intensidade na diluição superior a 1:40⁷.

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System¹⁶, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE). Os dados foram submetidos à análise de

variância utilizando o método dos quadrados mínimos empregando-se o procedimento PROC GLM do programa computacional Statistical Analysis System¹⁷. Foi adotado um nível de significância de 5% para todos os testes realizados e na análise de variância, quando observou efeito significativo, foi realizado comparação das médias pelo teste de Tukey.

RESULTADOS

Dos 54 cães suspeitos de *E. canis*, 32 (59,3%) foram diagnosticados como positivos. Desses, 23 (42,6%) foram positivos apenas no teste sorológico (denominado à partir desde momento como grupo 1), enquanto 9 (16,7%) apresentaram positividade tanto nos testes moleculares quanto nos sorológicos (denominado à partir desde momento como grupo 2).

As amostras positivas para *E. canis* nos testes sorológicos e moleculares apresentaram titulação sorológica variando entre 2.560 e 10.240. A média de idade desses animais foi de 5,74 anos. A temperatura retal média estava dentro da normalidade (38,6 °C) e nenhum dos animais apresentava hipotermia no momento da mensuração. Quanto aos leucócitos, 7/9 (77,8%) dos animais positivos em ambos os testes apresentaram leucócitos dentro da normalidade, mantendo uma média de 15.200 mil/mm³, com apenas 2/32 (6,2%) apresentando leucocitose, com valor máximo de 43.500 mil/mm³. A média total das plaquetas foi de 77.667 mil/mm³, e apenas 1/32 (3,1%) animal apresentou valor (205 mil/mm³) dentro dos referenciais de normalidade; sendo que, o animal com o caso mais grave de trombocitopenia apresentou 18.000 mil/mm³. Com relação aos valores encontrados de eritrócitos, apenas um animal apresentando valores totais de glóbulos vermelhos (6,4 milhões/mm³) acima do limite inferior de referência; os outros apresentaram baixos níveis de anemia. Por exemplo, a menor contagem de glóbulos vermelhos foi de 1,4 milhão/mm³, e a média foi de 4,34 milhões/mm³. Os valores de hemoglobina e hematócrito apresentaram média de 9,57 milhões/mm³ e 28,6% respectivamente (tabela 1).

Tabela 1. Valores de hemograma, idade e temperatura de cães atendidos no Hospital Veterinário da zona sul de São Paulo, SP, em 2018, apresentando alterações clínicas com diagnóstico molecular e sorológico positivos para *E. canis*.

Animal No.	Idade (anos)	Temperatura retal (°C)	Leucócitos cel./mm ³	Plaquetas mil/mm ³	Eritrócitos milhões/mm ³	Hemoglobina g/dl	Ht %	PT g/dl
3	5	38.1	5,100	50,000	4.39	10	30	7.2
6	1	38.7	14,000	41,000	6.4	15.1	45	6.2
11	9	38.1	33,200	59,000	1.4	3.9	11	5.6
16	10	38.6	7,800	70,000	5.26	11.5	32	8.4
27	8	38.7	5,200	205,000	4.45	9.3	28	11.6
31	9	38.6	14,600	18,000	3.3	6.9	19	3.6
47	0,5	39	5,100	55,000	4.89	10.4	36	6.8
49	4	39.2	43,500	132,000	5.3	10.9	32	6
52	5	38	6,400	69,000	3.7	8.2	24	6

Os 23 (42,6%) animais positivos apenas no exame sorológico apresentaram titulação variando entre 40 e 10.240. A idade média desses animais foi de 6,43 anos, com temperatura média dentro da normalidade (38,7 °C); no entanto, quatro animais apresentaram hipertermia no momento da medição. Quanto aos leucócitos, 4/23 (17,4%) dos cães apresentaram leucopenia; 23/8 (34,8%), leucocitose; e 23/11 (47,8%) estavam dentro da normalidade. De todos os cães testados, foi mantida uma média de 13.020 mil/mm³, com valor máximo de 29.200 mil/mm³ e mínimo de 400 mil/mm³ leucócitos. A média total de plaquetas foi de 149.520 mil/mm³, com apenas 6/23 (26%) animais apresentando contagem de plaquetas dentro da normalidade. O animal com trombocitopenia mais grave apresentou 13 mil/mm³. 30,4% (23/7) dos animais apresentaram anemia, apresentando uma média de glóbulos vermelhos de 5,41 milhões/mm³, sendo a maior e menor contagem de glóbulos vermelhos 0,8 milhão/

mm³ e 8 milhões/mm³, respectivamente. Os valores de hemoglobina e hematócrito apresentaram média de 12,42 milhões/mm³ e 36,4% respectivamente (tabela 2).

Tabela 2. Valores de hemograma, idade e temperatura de cães atendidos no Hospital Veterinário da zona sul de São Paulo, SP, em 2018, apresentando alterações clínicas com diagnóstico sorológico positivo para *E. canis*.

Animal No.	Idade (anos)	Temperatura retal (°C)	Leucócitos cel./mm ³	Plaquetas mil/mm ³	Eritrócitos milhões/mm ³	Hemoglobina g/dl	Ht %	PT g/dl
1	6	39	18,300	90,000	5.5	13.2	37	6.6
2	8	39.6	9,500	70,000	5.9	14.2	40	5.6
4	-	36.6	18,500	237,000	5	11.4	36	12
7	10	39	8,200	35,000	4.67	9.7	32	7.4
9	4	38.4	10,700	66,000	3	5.9	19	6.2
13	9	37.7	12,500	92,000	5.4	12.1	34	12
14	13	39.1	4,700	350,000	7.4	18.7	53	7
17	15	37.9	12,700	83,000	7.1	16.7	49	9.2
22	4	39	5,300	53,000	5.5	13.3	40	7.2
23	5	39.3	19,600	377,000	7.1	17.7	49	7.6
24	2	37.9	21,780	492,000	4.63	8.7	24,8	6.8
26	1	38.7	22,200	100,000	3.1	7.3	22	5.8
28	6	39.3	7,700	131,000	1.7	3.3	12	6.8
29	4	40.4	29,200	166,000	8	18.3	53	8.8
33	1	39.9	400	15,000	0.8	1.9	6	4.4
36	3	38.7	16,000	255,000	7.4	17.9	50	7.2
38	4	38.5	8,000	144,000	7.8	19	53	5.4
40	8	38.2	6,600	60,000	6.9	17.7	49	6
44	9	39.3	16,100	142,000	6.99	15.4	48	7.6
46	-	39.9	3,100	13,000	5.84	10.7	33	6.2
48	13	39.1	19,200	99,000	3.9	8.2	24	8.6
50	4	37.5	9,700	161,000	5.8	13.6	41	12
51	6	38.2	19,900	208,000	5.03	10.8	32	10.4

A partir das análises estatísticas dos parâmetros avaliados e apresentados na tabela 3, é possível confirmar diferença significativa entre os valores das plaquetas dos animais com ou sem diagnóstico de CME ($p=0,0245$). Quanto aos valores de outros parâmetros de glóbulos vermelhos e temperatura retal, não foram observadas diferenças estatísticas (tabela 3).

Tabela 3. Valores médios e desvios padrão dos parâmetros de hemograma e temperatura retal de pacientes com diagnóstico presuntivo de EMC atendidos no Hospital Veterinário da zona sul de São Paulo, SP, em 2018.

	Positivo nos testes moleculares e sorológicos		Positivo apenas no teste sorológico		Negativo nos testes moleculares e sorológicos		P=
	Média	CV%	Média	CV%	Média	CV%	
Temperatura	38.55 ^a ± 0.41	1.07	38.69 ^a ± 0.77	2.00	38.30 ^a ± 1.36	3.56	0.3897
Hemácias	4.34 ^a ± 1.43	33.02	5.41 ^a ± 1.92	35.51	4.87 ^a ± 2.10	43.19	0.3454
Hb	9.57 ^a ± 3.12	32.63	12.42 ^a ± 4.97	40.05	11.42 ^a ± 4.83	42.33	0.3070
Hto %	28.55 ^a ± 9.82	34.40	36.39 ^a ± 13.55	37.23	33.04 ^a ± 13.90	42.08	0.3124
Pt	6.82 ^a ± 2.21	32.39	7.68 ^a ± 2.15	28.08	6.75 ^a ± 1.63	24.16	0.2529
Plaquetas x10 ³	77.66 ^c ± 56.82	73.16	149.52 ^b ± 122.29	81.78	251.19 ^a ± 228.45	90.94	0.0245
Leucócitos x10 ³	15.2 ^a ± 13.97	93.23	13.02 ^a ± 7.25	55.69	19.25 ^a ± 13.91	72.29	0.2003

DISCUSSÃO

A trombocitopenia foi o fator estatístico mais importante encontrado neste estudo, mostrando diferentes graus de intensidade, estando presentes em 88% (8/9) dos pacientes testados positivos para *E. canis* com diagnóstico molecular e sorológico; 73% (11/15) em cães testados positivos apenas com diagnóstico sorológico; e 45% (22/10) daqueles testados negativos com os métodos de diagnóstico utilizado neste estudo.

Em estudo realizado com o objetivo de verificar a confiabilidade da contagem de plaquetas como teste de triagem para EMC, 63% (84/146) de animais trombocitopenicos apresentaram diagnóstico positivo para *E. canis*². Trombocitopenia também foi descrita em outros estudos envolvendo animais com a doença^{18,19,20}.

Trombocitopenia é o achado mais comum em todas as três fases da doença e pode ocorrer devido a perdas por consumo no caso de vasculite, destruição imunomediada e/ou sequestro de plaquetas no baço causado pela estimulação do sistema imunológico e, em parte, devido à resposta inflamatória^{21,22}.

A patogênese da trombocitopenia em cães causada pela EMC permanece pouco compreendida, porém acredita-se que pode estar associado a alterações no endotélio dos vasos sanguíneos e por coagulação intravascular disseminada^{20,21,23}. Weisiger et al.²⁴ relata que a resposta imune de cães a *E. canis* pode potencializar a patogenia da doença, com base na presença de hipergamaglobulinemia e plasmacitose sistêmica²⁴. Estudos demonstram que anticorpos antiplaquetários séricos em cães pós infecção por *E. canis*, possivelmente é uma das causas imunopatológicas responsáveis pela trombocitopenia²⁵, no qual o declínio no número de plaquetas pode ser explicado pelo aparecimento prematuro desta resposta imunológica, ocasionando remoção de células plaquetárias pelo sistema fagocítico mononucleares no fígado e baço^{25,26}. Propõe-se que a presença de anticorpos antiplaquetários seja uma das principais causas de trombocitopenia observada na EMC, embora outras doenças não imunológicas e mecanismos mediados também podem estar envolvidos²⁶.

Todos os achados hematológicos encontrados, ainda que presentes na EMC, não apontam exclusivamente para esse tipo de doença, por serem inespecíficos e inconstantes, também podem ser indicativos de outras doenças, bem como de alterações fisiológicas transitórias relacionadas à fase de vida do sujeito²⁷.

A anemia pode ser encontrada em fases agudas e crônicas da doença²⁸. No presente estudo, essa alteração hematológica apresentou-se em animais que apresentaram positividade molecular e sorológica para as bactérias, algo também encontrado em estudo realizado em Minas Gerais com 203 animais diagnosticados com *E. canis*, nos quais 82,3% apresentaram essa alteração hematológica^{27,28}.

Segundo Hasegawa²⁹, a leucopenia é comum nos estágios terminais da doença, raramente em sua fase aguda. Esse achado tem sido presente não apenas nos animais que testaram positivo no diagnóstico molecular e sorológico, mas também naqueles que deram negativo para *E. canis*. Isso sugere que, quando a leucopenia está presente, a doença deve ser considerada uma hipótese; mas outras causas, como a variação transitória normal relacionada à fase de vida do sujeito, causas inflamatórias, parasitárias, tóxicas e anafiláticas não podem ser ignoradas²⁷; nem doenças virais e neoplasias^{21,30}.

O método sorológico não é capaz de distinguir uma infecção presente de uma exposição ao agente, uma vez que a titulação permanece alta por algum tempo¹¹. A presença de sorologia positiva e PCR negativo pode indicar uma memória imunológica presente ou uma situação no qual o animal encontra-se em tratamento, uma vez que os antibióticos eliminam os microrganismos circulando na corrente sanguínea¹¹. Porém, o diagnóstico molecular negativo, embora soropositivo, pode sugerir que as bactérias podem estar presentes em outros tecidos, como baço e medula, indetectáveis em amostras de sangue periférico^{6,10,11}. De acordo com Harrus et al.⁹, a detecção molecular de *E. canis* obtida a partir de sangue periférico é inferior quando comparada à encontrada no baço ou medula; fazendo com que falsos negativos podem ocorrer em infecções crônicas da doença, pois nesta fase da doença, a bacteremia na corrente sanguínea periférica é escassa³¹. No presente estudo, 23 (42,6%) animais apresentaram positividade apenas no diagnóstico sorológico, sugerindo nestes pacientes a possibilidade

de estarem em quadros de infecções crônicas, sendo recomendável pesquisa molecular à nível tecidual³¹.

Sorologia e PCR são os exames mais adequados para confirmar o diagnóstico de Erliquiose monocítica canina; no entanto, devem ser sempre utilizados em conjunto com avaliações clínicas e hematológicas. Para uma melhor interpretação dos resultados laboratoriais, é importante levar em conta o estágio de infecção, limitação desses exames e dados epidemiológicos da área em estudo. Na fase aguda, o PCR pode detectar DNA *E. canis* antes que os testes sorológicos entrem em contato com a presença de anticorpos contra o agente etiológico. Além disso, a reação cruzada dos testes moleculares é incomum, embora falsos positivos possam ocorrer na sorologia devido à reação cruzada com outras espécies ou titulações de anticorpos que são persistentes após o tratamento³².

Os altos valores de titulação sorológica encontrados neste estudo já foram mencionados na literatura, como em Frank et al.¹⁸. A maioria dos animais apresentou titulação de anticorpos entre 2.560 e 10.240, sugerindo infecção recente ou persistente possivelmente relacionada à cronicidade da doença e tipo excepcional de resposta ao antígeno⁷, originado por estímulos antigênicos prolongados³³.

CONCLUSÃO

Este estudo conclui que a trombocitopenia foi o único parâmetro hematológico que apresentou diferença estatística nos grupos analisados e pode ser considerado um dado laboratorial importante em conjunto com testes molecular e sorológico, para a detecção da doença.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) por todo o apoio financeiro (processo nº 2016/00167-0).

REFERÊNCIAS

- Moraes-Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *Plos One*, v. 10, p. e0139386, 2015.
- Bulla C, Takahira RK, Araújo Júnior JP, Trinca LA, Lopes RS, Wiedmeyer CE. The Relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet. Res*, v. 35, n. 9, p. 141-146, 2004.
- Dagnone AS, Morais HSA, Vidotto MC, Jojima FS, Vidotto O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.
- Unver, A., Rikisa, Y., Karaman, M., Ozen, H. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.15, suppl.2, p.59-61, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02634.x>.
- Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*, v. 187, n. 3, p. 292-296, 2011.
- Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998.
- Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y., Keysary, A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, v. 95, p. 1-15, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01130-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01130-2).
- Mylonakis ME, Siarkou V, Leontides L, Bourtzzi-Hatzopoulou E, Kontos VI, Koutinas AF. Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Microbiology*, v. 138, p. 390-393, 2009.
- Harrus S, Alleman AR, Bark H, Mahan SM, Waner T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol.*, v. 86, p. 361-368, 2002.
- Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Diniz, P.P.V.P., Caprariis, D., Lia, R.P., Mencke, N., Stanneck, D., Capelli, G., Breitschwerdt, E.B. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, n.9, p.3316-3324, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.00379-10>.
- Harrus S, Waner T, Neer TM. *Ehrlichia canis* infection. In: Greene C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Elsevier, Missouri, p. 227-238, 2012.
- Rosenfeld, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, v.20, p.329-335, 1947.
- Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 787p.
- Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang YW, Corstvet RE, Hegarty BC, Bloch KC, Li P, Walker DH, McBride JW. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. *J Mol Diagn.*, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.
- Aguiar DM, Calvacante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LMA, Labruna MB. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) ticks from Brazil. *J Med Entomol.*, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.
- SAS Institute. SAS user's guide: Statistics. Cary, NC, USA, 1985.
- SAS Institute. SAS user's guide: Statistics. Cary, NC, USA, 2001.
- Frank JR, Breitschwerdt EB. A Retrospective Study of Ehrlichiosis in 62 Dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med.*, v. 13, p. 194-201, 1999.
- Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T., Lappin, M.R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the American College of Veterinary Internal Medicine. *J. Vet. Intern. Med.*, v.16, p.309-315, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02374.x>.
- Waner, T., Harrus, S., 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. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01130-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01130-2).
- Buhles, W. C.; Huxoll, D. L.; Hilderbrandt, P. K. Tropical Canine Pancytopenia: Role of Aplastic Anemia in the Pathogenesis of Severe Disease. *J. Comp. Path.*, v. 85, p. 511-521, 1975.
- Souza, B.M.P.S., Leal, D.C., Barboza, D.C.P.M., Uzeda, R.S., Alcântara, A.C., Ferreira, F., Labruna, M.B., Gondim, L.F.P., Franke, C.R. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.19, p.89-93, 2010. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01902002>.
- Abeygunawardena, I., Kakoma, I., Smith, R.D. Pathophysiology of canine ehrlichiosis. In: J.C. Williams and I. Kakoma (Editors), *Ehrlichiosis. A Vector-Borne Disease of Ani-*

- mals and Humans. **Kluwer Academic Press**, Dordrecht, pp. 78-92, 1990.
24. Weisiger, R.M., Ristic, M., Huxsoll, D.L. Kinetics of antibody response to Ehrlichin canis assayed by the indirect fluorescent antibody method. **Am. J. Vet. Res.**, v. 36, p. 689-694, 1975.
 25. Warier, T., Harms, S., Weiss, D.J., Bark, H., Keysary, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 48, p.177- 182, 1995.
 26. HARRUS, S. et al. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **The Veterinary Record**, v. 139, n. 12, p. 290-293, 1996.
 27. Maekawa N, Konnai S, Balbin MM, Mingala CN, Francis KRBG, Bernardo AEM, Murata S, Ohashi K. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in a Philippine dog. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 9, n. 2, p. 266-269, 2018.
 28. Borin S, Crivelenti LZ, Ferreira FA. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
 29. Hasegawa MY, Kohayagawa A, Brandão LP, Morgulis MSFA, Mitika K Hagiwara MK. Evaluation of neutrophil oxidative metabolism in canine monocytic ehrlichiosis. **Vet Clin Pathol**, v.34, p. 213-217, 2005.
 30. Faro AM, Daleck CR, Santana AE, Nardi AB, Motta FR, Eurides D. Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida - Estudo Experimental. **ARS Veterinaria**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2008.
 31. Cohn LA. Ehrlichiosis and related infections. **The Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, p. 863-884, 2003.
 32. Nakaghi ACH, Machado RZ, Costa MT, Andre MR, Baldani, C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, p. 766-770, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300027>.
 33. Perrile, A.L., MATUS, R.E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, p. 195-198, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1991.tb00947.x>.