

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AZITROMICINA NO TRATAMENTO DA ERLICHIOSE  
MONOCÍTICA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

**Daniela Torres Cantadori**

**CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
JULHO – 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AZITROMICINA NO TRATAMENTO DA ERLICHIOSE  
MONOCÍTICA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

**Daniela Torres Cantadori**

Orientadora Profa. Dra. Veronica Jorge Babo-Terra  
Co-orientadora Profa Dra. Ana Luiza A. R. Osório

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
JULHO - 2008

**Daniela Torres Cantadori**

**"Azitromicina no tratamento da erlichiose monocítica em cães naturalmente infectados"**

**"Azithromycin in the treatment of monocytic ehrlichiosis in naturally infected dogs"**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.  
Área de concentração: Saúde Animal

APROVADA: 28/07/2008

  
Dra. Verônica Jorge Babo Terra

  
Dr. Michael Robin Honer

  
Dra. Karine Bonucielli Brum

Dedico este trabalho à minha família e aos meus amigos, por estarem sempre presentes nos grandes momentos de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Odécio e Marisa, pelo amor, paciência e zelo.

À minhas amigas Cláudia e Larissa pela ajuda, amizade e apoio nos momentos mais difíceis desta jornada.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos pelo amor.

À minha orientadora Profa. Dra Veronica Jorge Babo-Terra, pela oportunidade, confiança e amizade.

À minha co-orientadora Profa. Dra Ana Luiza A. R. Osório, pela atenção, dedicação e por mais uma vez ter contribuído para a concretização de mais um sonho.

Às médicas veterinárias Thatianna Camillo Pedroso e Perla Noé pela amizade e apoio ao projeto.

Ao médico veterinário Thalles Ovando pela amizade e apoio à coleta dos materiais.

Ao médico veterinário Paulo Felipe e toda sua equipe da Solvet, pelo apoio técnico e amizade.

Ao Prof. Jair Soares Madureira pelo incentivo e amizade.

Ao Centro de Controle de Zoonoses e seus funcionários, em especial ao Roberval, pela atenção dedicada e disponibilidade dos animais.

Aos funcionários da UCDB, em especial ao Juvenil e Daniel, pelo auxílio com os animais.

À UCDB pela cedência das instalações e apoio técnico.

À médica veterinária Pamela pela ajuda na execução do projeto, pela responsabilidade e amizade.

À médica veterinária Leizinara Lopes pelo apoio e amizade.

À Marilete Otaño Peixoto Ferencz, pela simpatia, paciência e prontidão.

Aos amigos, nem sempre tangíveis, mas sempre presentes, pela compreensão e motivação.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela formação e disponibilização de oportunidades.

Aos animais Sofia, Jack, Dumba, Benji, Preto, Rebeca, Chiquinho, Pitiço, Brava e Branquinha, por se manterem carinhosos e amáveis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Punção de baço guiada por ultra-som .....	33
Figura 2 - Mórula de <i>E. canis</i> em monócito apresentando vacuolizações citoplasmáticas (monócito ativado).....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Animais que apresentaram sinais clínicos no dia zero (0), antes do tratamento; no dia 14, pós-tratamento, nos dois grupos experimentais. n=5 em cada grupo .....	34
Tabela 2 - Alterações hematológicas observadas no dia zero (0), antes do tratamento; no dia 14, pós-tratamento, nos dois grupos experimentais. n=5 em cada grupo .....	35
Tabela 3 - Resultados da pesquisa de mórula e da PCR pré e pós-tratamento .....	36
Tabela 4 - Médias ordenadas ( $\pm$ erro padrão) de mórulas e positividade na PCR pré e pós-tratamento .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAG – Alfa-1-ácido-glicoproteína  
ALT – Alanina aminotransferase  
CCZ – Centro de Controle de Zoonoses  
CRP- Proteína C-reativas  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
*E. canis* – *Ehrlichia canis*  
*E. chaffeensis* – *Ehrlichia chaffeensis*  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
ELISA – Imunoensaio de ligação enzimática  
FAS – Fosfatase alcalina  
Grupo C – Grupo controle, sem tratamento  
Grupo T – Grupo tratado com azitromicina  
IFI – Imunofluorescência indireta  
IM – Via intramuscular  
PCR – Reação em cadeia de polimerase  
*R. sanguineus* – *Rhipicephalus sanguineus*  
RNA – Ácido ribonucleico  
SC- Via sub-cutânea  
UCDB – Universidade Católica Dom Bosco  
UNESP – Universidade Estadual Paulista  
UV – Ultravioleta  
VO – Via oral  
WI – Western Immunoblotting



## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficácia do tratamento com azitromicina em cães naturalmente infectados por *E. canis* e acompanhar a evolução clínico-hematológica dos animais. Dez cães, com diagnóstico positivo para *E. canis* por meio do teste de Elisa Snap 4Dx, foram distribuídos em dois grupos, sem tratamento e tratamento com azitromicina, 20 mg/kg, via oral uma vez ao dia durante sete dias. Além do exame físico diário foram realizados exames hematológicos, esfregaços de ponta de orelha para a pesquisa de mórulas e *nested* PCR antes do tratamento e pós-tratamento. Verificou-se que o tratamento não foi eficiente, uma vez que não desapareceram os sinais clínicos, assim como não houve recuperação hematológica dos cães e nem eliminação de *E. canis*.

Palavras-chave: Azitromicina - *Ehrlichia canis* – PCR - Cães

## ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the efficacy of treatment with azithromycin in dogs naturally infected with *E. canis* and also to follow the clinical and hematological changes of the animals during both treatment protocols. Ten dogs suspected of *E. canis* infection were diagnosed through Elisa test kit Snap 4Dx. They were distributed in two groups: without treatment and treated with azithromycin, 20mg/kg orally once a day for seven days. The dogs were submitted to daily physical examination. Hematologic and direct visualization of morulae in blood smears made from ear margin, and nested PCR to detect *E. canis* were performed before and after treatment. We could assume that treatment with azithromycin in the protocol used was not effective, did not promote the resolution of clinical signs, nor the hematological recovery of the animals, and was not able to eliminate *E. canis*.

Key-words: azithromycin - *Ehrlichia canis* – PCR - Dogs.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	12
1.2 PATOGENIA .....	13
1.3 SINAIS CLÍNICOS .....	15
1.4 ASPECTOS LABORATORIAIS .....	16
1.5 DIAGNÓSTICO .....	17
1.6 TRATAMENTO .....	18
1.7 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO .....	19
1.8 PREVENÇÃO .....	21
<b>2 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>22</b>
<b>3 ARTIGO .....</b>	<b>27</b>
<b>Azitromicina no tratamento da erlichiose monocítica em cães naturalmente infectados .....</b>	<b>28</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>28</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>

# 1 INTRODUÇÃO

*Ehrlichia canis* é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória, pertencente à família Anaplasmataceae e à ordem Rickettsiales, responsável pela erlichiose monocítica canina (DUMLER et al., 2001). Sua primeira denominação foi *Rickettsia canis*, descrita em um cão Pastor Alemão, na Argélia (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935).

As pesquisas se intensificaram entre 1968 e 1970 quando uma importante epizootia da erlichiose canina ocorreu em cães da Armada Americana, em ação na guerra do Vietnã, onde cerca de 300 cães desenvolveram uma enfermidade hemorrágica fatal, chamada pancitopenia tropical canina, caracterizada por debilidade, epistaxe, anemia e leucopenia (HUXSOLL et al., 1970).

Historicamente, a erlichiose canina já recebeu vários nomes, tais como: pancitopenia tropical canina (HUXSOLL et al., 1970), riquetsiose canina, tifo canino, síndrome hemorrágica idiopática, febre hemorrágica canina, moléstia do cão rastreador (GREENE e HARVEY, 1990) e atualmente é denominada erlichiose monocítica canina (HARRUS et al., 1998a; HARRUS et al., 1998b).

No Brasil, a doença foi diagnosticada pela primeira vez em 1973 (COSTA et al., 1973) e atualmente está presente em praticamente todo o território nacional (LABARTHE et al., 2003). É uma doença mundialmente descrita, cuja distribuição geográfica está relacionada à distribuição de seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, considerado também seu reservatório primário (BREITSCHWERDT, 1997; ANDEREG e PASSOS, 1999).

## 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Erlichiose monocítica canina tem sido comunicada em todo o mundo, causando alta morbidade e mortalidade (RIKIHISA, 1991). Os casos concentram-se nas áreas tropicais e subtropicais devido à distribuição geográfica de seu vetor (HARRUS et al., 1997; COHN, 2003).

No Brasil, o primeiro relato de erlichiose canina ocorreu em Belo Horizonte - MG, por Costa et al., em 1973, sendo este também o primeiro caso diagnosticado na América do Sul, e o segundo relato em Jaboticabal-SP, por Maregati, em 1978 (KAVINSKI et al., 1988). Hoje em dia, são relatados casos por todo o território nacional. Em Mato Grosso do Sul, a soroprevalência foi estimada em 35,7% (LABARTHE et al., 2003).

Diferentes espécies de carrapatos são capazes de realizar a transmissão horizontal da infecção erlichial do vetor aos hospedeiros vertebrados. A *E. canis* é usualmente disseminada durante o ectoparasitismo do carrapato vermelho do cão, *Rhipicephalus sanguineus* (COHN, 2003). Infecção concomitante com outros patógenos transmitidos por carrapatos tem sido documentada por vários pesquisadores (ANDEREG e PASSOS, 1999; BREITSCHWERDT et al., 1998). *R. sanguineus* é capaz de transmitir *E. canis*, *E. ewingii* e também *Babesia canis*, *B. gibsoni* e *Anaplasma platys* (COHN, 2003).

Além do vetor, *R. sanguineus* é considerado reservatório primário de *E. canis* (EWING, 1969; GROVES et al., 1975) por ser capaz de transmitir a bactéria por cerca de 155 dias em qualquer estágio de desenvolvimento (GREENE e HARVEY, 1990). O contágio ocorre com a ingestão de leucócitos infectados principalmente durante a fase aguda da doença no cão. Entre os carrapatos ocorre a transmissão transtadial, porém não ocorre a transmissão transovariana (GROVES et al., 1975). Do carrapato para o cão, a infecção ocorre durante o repasto sanguíneo; no entanto, os cães também podem se infectar por meio de transfusão sanguínea (EWING, 1969; REINE, 2004).

A erlichiose recebeu uma atenção especial em 1987 quando algumas observações sugeriram infecção também em humanos. No entanto, hoje se sabe que as infecções em humanos são causadas por *E. chaffeensis*, que também tem tropismo por células mononucleares e são geneticamente muito semelhantes à *E. canis*, por isso apresentam mórulas semelhantes e reação cruzada de anticorpos (DAWSON et al., 1991). Os principais animais acometidos por *E. canis* são os membros da família *Canidae*, que inclui cães, lobos e chacais (RIKIHISA, 2006).

## 1.2 PATOGENIA

Com infecções experimentais foi possível observar que o período de incubação da erlichiose varia de oito a vinte dias, observando-se sinais clínicos como febre, linfadenopatia, anorexia, petéquias, equimoses em pele e mucosas e prostração. Podem ser distintas três fases da doença: aguda, subclínica e crônica (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997; CASTRO et al., 2004).

A fase aguda da infecção por *E. canis* ocorre aproximadamente de oito a vinte dias após a infecção, e dura de duas a quatro semanas. Durante esse período, a bactéria invade as células mononucleares teciduais, multiplica-se e produz hiperplasia linforreticular no baço,

fígado e linfonodos acarretando um aumento de volume desses órgãos. As células infectadas são transportadas pela corrente sanguínea para pulmões, rins e meninges, aderindo ao endotélio vascular e produzindo vasculite e infecção do tecido subendotelial (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997). Também invade células mononucleares circulantes formando corpúsculos iniciais, corpos elementares e então mórulas (EWING, 1969; KUEHN e GAUNT, 1985; ELIAS, 1991).

A fase subclínica instala-se quando o cão sobreviveu à fase aguda. Geralmente surge hiperglobulinemia, relacionada à persistência de *E. canis* no hospedeiro, demonstrada através da reação em cadeia de polimerase (PCR) (GREENE e HARVEY, 1990). Testes de imunização em cães utilizando soro antilinfócitos conseguiram desencadear uma alta produção de anticorpos, mas não houve mudanças no curso da enfermidade. Os resultados dos testes indicaram que a resposta humoral parece eficiente apenas na eliminação de espécies extracelulares de *Ehrlichia*, enquanto a destruição das erlichias intracelulares depende da resposta imune celular (NYINDO et al., 1980).

Assim, cães imunocompetentes podem eliminar a bactéria e não entrar na fase crônica, enquanto aqueles sem resposta imune efetiva permanecem doentes e podem apresentar processos imunomediados (GREENE e HARVEY, 1990). Alguns cães, em áreas enzoóticas podem se manter infectados por longos períodos, inclusive durante anos (HARRUS et al., 1998a).

A fase crônica instala-se devido à deficiência imunológica do hospedeiro. É caracterizada pela pancitopenia decorrente do comprometimento de medula óssea, que pode ser causada por mecanismos imunomediados, infecção no interior da medula óssea ou exaustão devido à destruição contínua de plaquetas (GREENE e HARVEY, 1990).

A recente caracterização molecular de *E. canis* identificou uma deficiência de componentes estruturais, tais como peptídeoglicanos e lipopolissacarídeos. A falta desses componentes resultou no desenvolvimento de uma complexa estrutura de proteínas de membrana. Essas proteínas têm papel fundamental entre o patógeno e a célula hospedeira. Foi identificado um *set* de proteínas imunorreativas que inclui glicoproteínas importantes para a resposta imune e uma família de proteínas de membrana. Em outras espécies de *Ehrlichia*, essa família de proteínas possui 22 genes parálogos que podem se expressar diferentemente no carrapato e nos hospedeiros mamíferos, facilitando a diversidade antigênica e a imunoproteção, contribuindo para as infecções persistentes (MAVROMATIS et al., 2006). Anteriormente, já havia sido cogitada a possibilidade de que o baço hospedasse *E. canis* e que

ela se escondesse em macrófagos esplênicos escapando da resposta imune (HARRUS et al., 1998a).

### **1.3 SINAIS CLÍNICOS**

Os sinais clínicos que estão associados à erlichiose monocítica canina são influenciados pela cepa infectante, imunidade individual, idade e raça do cão, re-exposição ao agente, presença de co-infecção e provavelmente também por fatores ainda desconhecidos (KUEHN e GAUNT, 1985; GREENE e HARVEY, 1990; BREITSCHWERDT et al., 1998; COHN, 2003). Cães da raça Pastor Alemão são considerados mais suscetíveis (NYINDO et al., 1980; ELIAS, 1991).

Na fase aguda, os sinais clínicos são mais aparentes, porém geralmente são insuficientes ou pouco específicos para o diagnóstico, passando despercebida pelo proprietário. Os sinais clínicos nesta fase incluem febre, depressão, anorexia, perda de peso, mucosas pálidas, secreção oculonasal, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997; COHN, 2003; CASTRO et al., 2004).

Na fase subclínica, que se inicia entre seis e nove semanas pós-infecção, os sinais clínicos geralmente desaparecem ainda que sem tratamento e os animais permanecem aparentemente saudáveis. Por isso, essa fase também é chamada assintomática (HARRUS et al., 1997; HARRUS et al., 1998a; COHN, 2003).

Na fase crônica, os sinais podem estar ausentes ou ainda exacerbados. Sinais de apatia, caquexia, tendência a hemorragias (sufusões, petéquias, epistaxe), palidez de mucosas, sensibilidade abdominal, uveíte anterior, hemorragia retiniana ou sinais de meningoencefalite são sugestivos da infecção. A glomerulonefrite é um achado comum nesta fase da doença devido à intensificação da resposta imune não protetora (HARRUS et al., 1997). Além disso, pode haver infecções secundárias (COHN, 2003).

O prognóstico na fase aguda é geralmente favorável. A antibioticoterapia promove melhora clínica em cerca de um a dois dias. Na fase subclínica, o prognóstico varia de favorável a reservado de acordo com a sintomatologia apresentada pelo animal e sua predisposição individual para evoluir para a fase crônica. Nesta última, o prognóstico é desfavorável, principalmente se tiver se instalado um quadro de hipoplasia arregenerativa na medula óssea (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997).

## 1.4 ASPECTOS LABORATORIAIS

Durante a fase aguda da erlichiose canina, as alterações laboratoriais frequentemente observadas são trombocitopenia associada ao aumento do número de macroplaquetas circulantes, que persiste por todo o período da doença na maioria dos animais (SMITH et al., 1975); observa-se anemia, regenerativa ou arregenerativa e contagens leucocitárias diversas. Leucocitose, monocitose e presença de mórulas são consideradas características desta fase da doença (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997), apesar de a leucopenia ser também descrita (CASTRO et al., 2004). As mórulas são comumente observadas em monócitos e linfócitos (EWING, 1969; KUEHN e GAUNT, 1985; ELIAS, 1991), mas também podem ser vistas no interior de neutrófilos (EWING, 1969; HUXSOLL et al., 1970).

Na fase subclínica, os achados laboratoriais incluem trombocitopenia, anemia, leucopenia variável, hiperglobulinemia progressiva e proteinúria (HARRUS et al., 1998a). A pancitopenia é o achado mais característico da fase crônica (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997). Hiperglobulinemia com gamopatia mono ou policlonal também são características desta fase (GREENE e HARVEY, 1990; COHN, 2003).

A trombocitopenia é um achado freqüente em qualquer uma das fases da erlichiose e é considerado um bom indicador de infecção (BULLA et al., 2004). As causas da trombocitopenia envolvem mecanismos diversos, tais como vasculite, aumento do consumo de plaquetas, presença de um fator inibidor da migração plaquetária, seqüestro de plaquetas pelo baço, supressão da medula óssea e trombocitopenia imunomediada (HARRUS et al., 1997; WANER et al., 2000). Na erlichiose também ocorre trombocitopatia, que compromete a adesão e agregação plaquetárias (HARRUS et al., 1997).

Outras alterações laboratoriais que podem ser observadas nas três fases são hipoalbuminemia; azotemia, elevação da atividade das enzimas séricas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina sérica (FAS), proteínas C-reativas (PCR) e alfa-1-ácido-glicoproteínas (AAG); aumento da bilirrubina total devido à hemólise intensa e em alguns casos, também icterícia (GREENE e HARVEY, 1990; COHN, 2003).



## 1.5 DIAGNÓSTICO

Não há um método simples de diagnóstico para a erlichiose, que pode ser realizado com uma combinação de sinais clínicos, alterações hematológicas, sorologia e confirmação molecular (COHN, 2003).

A observação das mórulas é o único achado laboratorial de rotina que confirma a presença de *E. canis*. No entanto, isso ocorre apenas nas duas primeiras semanas pós-infecção e em menos de 1% das células infectadas; por isso, a ausência das mórulas não exclui a possibilidade de infecção (ELIAS, 1991; MUTANI e KAMINJOLO, 2001). Nos esfregaços realizados com sangue da ponta de orelha pode ser mais fácil visualizar a mórula, que em esfregaço sanguíneo convencional (EWING, 1969; ELIAS, 1991).

Além da observação da mórula em esfregaço sanguíneo, é possível diagnosticar a erlichiose por outros métodos. Dentre os métodos indiretos inclui-se a Imunofluorescência Indireta (IFI), um método sorológico que utiliza anticorpos fluorescentes. A IFI é bastante sensível e específica, mas tem a desvantagem de apresentar resultados falso-negativos ou falso-positivos e não identifica a fase da doença. Na verdade, a presença de títulos de anticorpos apenas significa contato prévio com o agente (IQBAL e RIKIHISA, 1994b).

Outros testes sorológicos incluem o *Western Immunoblotting* (WI) e o teste de ELISA. O WI mostrou-se mais sensível que a IFI e seus resultados são objetivos, isto é, não sofrem interferência da sensibilidade visual do leitor, porém é mais demorado, dispendioso e necessita de tecnologia mais avançada (IQBAL et al., 1994). O teste de ELISA é tão sensível e específico quanto a IFI e dispensa equipamentos caros. No entanto, apesar da fácil leitura, seus resultados indicam apenas positivo ou negativo (LABARTHE et al., 2003).

Os testes sorológicos não possibilitam diferenciar a resposta imune de uma re-exposição ao agente; além disso, ocorrem reações cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* (BARTSCH e GREENE, 1996; WEN et al., 1997; MUTANI e KAMINJOLO, 2001).

Entre os métodos de diagnóstico direto, incluem-se o cultivo do agente *in vitro* e a reação em cadeia de polimerase (PCR). No cultivo tradicional, os leucócitos do animal suspeito são isolados e mantidos em meio próprio com linhagem celular específica, onde *Ehrlichia* se prolifera (IQBAL e RIKIHISA, 1994a). As técnicas recentes de cultivo celular utilizam apenas soro estéril e dispensam as linhagens celulares específicas para o crescimento. Em ambas técnicas é possível localizar as mórulas com maior facilidade, devido a sua maior

quantidade, em comparação ao esfregaço sanguíneo convencional (MUTANI e KAMINJOLO, 2001).

O cultivo celular *in vitro* é considerado o método mais sensível para o diagnóstico da erlichiose, pois detecta a bactéria a partir do segundo dia de infecção (IQBAL et al., 1994; MUTANI e KAMINJOLO, 2001). Contudo, ainda se trata de um método relativamente demorado, caro, exigente e quando usado isoladamente não revela a espécie de *Ehrlichia* (WEN et al., 1997; MUTANI e KAMINJOLO, 2001).

Devido a essas desvantagens fez-se necessário a busca de um método diagnóstico sensível, específico, mais simples e que também detectasse a bactéria de forma direta. Com isso surgiram as primeiras PCR para detecção de *E. canis* (IQBAL et al., 1994; IQBAL e RIKIHISA, 1994a).

Na PCR, realiza-se o isolamento genômico e a amplificação de porção do DNA do patógeno que permite seu reconhecimento específico; para isso são utilizados fragmentos sequenciais de DNA, chamados *primers*. Na *nested* PCR ou PCR de dois ciclos, um par de *primers* reconhece o gênero *Ehrlichia* a partir da amplificação de uma porção da sequência gênica do 16S RNA ribossomal e outro par diferencia a espécie, amplificando um segmento específico localizado dentro da primeira porção amplificada anteriormente. Por isso, também é considerado um método muito sensível e específico (IQBAL e RIKIHISA, 1994a; WEN et al., 1997). A PCR pode ser aplicada tanto em amostras de sangue como de tecidos (IQBAL e RIKIHISA, 1994a; HARRUS et al., 1998a).

## 1.6 TRATAMENTO

Existem vários medicamentos eficientes no combate à erlichiose canina, sendo que o tratamento deve se estender por pelo menos três a quatro semanas ou por períodos maiores do que oito semanas nos animais na fase crônica da doença (HUXSOLL et al., 1970).

Os derivados da tetraciclina, há muitos anos, são considerados de eleição para o tratamento da erlichiose (HUXSOLL et al., 1970). Atualmente, o consenso sugere o uso da doxiciclina na dosagem de 10 mg/kg via oral (VO) uma vez ao dia durante 28 dias (NEER et al., 2002). A doxiciclina é uma tetraciclina lipossolúvel muito eficiente, pois os animais geralmente apresentam melhora clínica depois de três dias de medicados (SAINZ, 1996). É também o medicamento de eleição para tratamento de filhotes, cadelas em gestação ou animais portadores de nefropatias (COHN, 2003).

O tratamento com dipropionato de imidocarb também se mostrou efetivo na eliminação de *E. canis* (PRICE e DOLAN, 1980; MATTHEWMAN et al., 1994). No entanto, estudos mais recentes não observaram diferenças na resposta clínica quando comparado à doxiciclina, associado a esta droga (SAINZ, 1996; SOUSA et al., 2004; PEDROSO, 2006) ou utilizado isoladamente (SAINZ, 1996; SOUSA et al., 2004; EDDLESTONE et al., 2006; PEDROSO, 2006). A dose recomendada do dipropionato de imidocarb é de 5 mg/kg SC ou IM com intervalo de 14 dias. O pré-tratamento com atropina 0,04 mg/kg, é recomendado a fim de minimizar os efeitos adversos da droga (MATTHEWMAN et al., 1994; NEER et al., 2002).

Outros antibióticos já foram utilizados, como enrofloxacin, cloranfenicol, penicilinas e sulfonamidas. Eles melhoraram o quadro clínico, mas não foram capazes de eliminar *Ehrlichia* (BREITSCHWERDT et al., 1998; COHN, 2003). A Azitromicina foi sugerida pelo laboratório veterinário Labyes para tratamento contra *E. canis*, com indicação na bula do medicamento<sup>1</sup>, mas a sua eficácia ainda não foi comprovada. Estudos *in vitro* e *in vivo*, mostraram que a azitromicina está concentrada em células fagocíticas (GLAUDUE et al., 1989) e que o acúmulo do medicamento em fagócitos está associado com sua atividade contra microorganismos intracelulares (WILDFEWER et al., 1989). Em alguns casos, pode ser necessário instituir terapia de apoio com fluidos, transfusão sanguínea, vitaminas, corticóides ou esteróides anabólicos (COHN, 2003).

A atividade da azitromicina tem sido amplamente avaliada na medicina humana em casos de infecção por riquetsias como *Orientia tsutsugamushi* (WATT et al., 1999; PHIMDA et al., 2007), e até mesmo no tratamento da infecção por *Leishmania major* (KROLEWIECKI et al., 2002) e da leishmaniose cutânea (TEIXEIRA et al., 2006), além de ser largamente comparada à doxiciclina no tratamento de diversas infecções sexualmente transmissíveis, com bons resultados (LAU e QURESHI, 2002; RUSTOMJEE et al., 2002).

## 1.7 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO

Devido à falta de imunidade protetora e à latência da *E. canis*, em muitos animais, torna-se necessária e recomendável a avaliação da eliminação terapêutica do agente para evitar agravamentos ou o estado de portador crônico (IQBAL e RIKIHISA, 1994a). Existem

---

<sup>1</sup> Aziplus® (Azitromicina), Laboratório Labyes.

relatos de isolamento do DNA de *E. canis* 34 meses após a inoculação experimental e os cães encontravam-se aparentemente saudáveis (HARRUS et al., 1998a).

A contagem de plaquetas é considerada um indicador seguro da recuperação do animal, pois a plaquetometria geralmente se normaliza dentro de duas a quatro semanas de tratamento (IQBAL e RIKIHISA, 1994b; BREITSCHWERDT et al., 1998; HARRUS et al., 1998b). Porém, deve-se considerar a fase da doença e a interferência da droga utilizada. Animais na fase aguda geralmente se recuperam mais rapidamente que aqueles na fase crônica (COHN, 2003), e animais tratados com dipropionato de imidocarb parecem normalizar o número de plaquetas mais lentamente do que os tratados apenas com doxiciclina (SAINZ, 1996; NEER et al., 2002).

Os testes sorológicos não são considerados bons indicadores, pois não diferenciam falha no tratamento, persistência da resposta imune ou re-infecção (BARTSCH e GREENE, 1996). Na IFI, os anticorpos são detectáveis por seis a nove meses após o tratamento (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998a; HARRUS et al., 1998b). O teste de ELISA é ainda mais limitado por apenas indicar resultados positivos e negativos, visto que muitos cães apresentam resultado positivo após terem sido tratados (COHN, 2003; LABARTHE et al., 2003). E inclusive ensaios de WI que detectam antígenos têm seu uso limitado devido à variabilidade antigênica de *E. canis* durante as etapas da enfermidade e podem apresentar reação cruzada com proteínas de *E. chafeensis* (RIKIHISA et al., 1994).

O cultivo celular também é considerado sensível para avaliação da eficiência de protocolos de tratamento (PRICE e DOLAN, 1980; WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998b). O cultivo e a PCR são os métodos mais confiáveis para avaliação da eliminação terapêutica de *E. canis*. Contudo, a última apresenta vantagens, pois é mais rápida, apresenta custo menor (IQBAL e RIKIHISA, 1994a; NEER et al., 2002) e também é bastante sensível e específica (BREITSCHWERDT et al., 1998; NEER et al., 2002).

A PCR pode determinar se um antibiótico é eficiente na eliminação de *E. canis* ao demonstrar a presença de seu DNA antes e a ausência depois do tratamento. Os resultados obtidos com a PCR podem ser complementados com resultados de outros testes e também com o perfil hematológico do animal, especialmente a plaquetometria (WEN et al., 1997; BREITSCHWERDT et al., 1998; HARRUS et al., 1998b; NEER et al., 2002).

A sensibilidade e a especificidade da PCR dependem dos *primers* utilizados. A *nested* PCR para *E. canis*, que amplifica um fragmento do gene 16S rRNA, utiliza dois pares de *primers* e é capaz de detectar 0,2 pg de DNA purificado de *E. canis* a partir do quarto dia pós-inoculação (WEN et al., 1997). Isto significa que esta técnica é até cem vezes mais sensível

que os primeiros *primers* delineados para PCR de *E. canis* e por isso tem sido amplamente empregada em experimentos que desejam avaliar a eficiência da antibioticoterapia (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998b).

Apesar de a validade da PCR ser questionada por ela detectar o DNA de *E. canis* e não diferenciar os organismos vivos dos mortos (COHN, 2003), seus resultados, quando comparados aos de cultivo celular a partir de amostras de sangue e tecidos pós-tratamento com doxiciclina foram concordantes, o que demonstrou a efetividade e sensibilidade do método para avaliação da eliminação terapêutica (IQBAL e RIKIHISA, 1994a).

## 1.8 PREVENÇÃO

A prevenção deve ser feita principalmente através do controle de carrapatos. Quando animais de áreas endêmicas forem transportados para áreas livres, estes devem ser testados e se necessário tratados preventivamente (HUXSOLL et al., 1970). Cães doadores de sangue deverão passar por triagem com testes sorológicos ou moleculares (REINE, 2004).

Também pode ser feita a quimioprevenção com tetraciclina, na dose de 6,6 mg/kg uma vez ao dia, durante o período de uma geração de carrapatos ou até dois anos em áreas endêmicas (GREENE e HARVEY, 1990), ou ainda 100 mg de doxiciclina uma vez ao dia (DAVOUST et al., 2005).

## REFERÊNCIAS

- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, n.19, p.31-38, 1999.
- BARTSCH, R. C.; GREENE, R. T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10, n.4, p.271-274, 1996.
- BREITSCHWERDT, E. B. As riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: moléstias do cão e do gato**. 4ª ED. São Paulo: Manole, v. 1, cap. 67. p.543-553, 1997.
- BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.2, p.362-368, 1998.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO JR., J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, n.35, p.141-146, 2004.
- CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunological findings. **Veterinary Parasitology**, n.119, p.73-86, 2004.
- COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinical Small Animal**, n.33, p.863-884, 2003.
- COSTA, J. O.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M. P.; BATISTA JUNIOR, J. A. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brasil. **Arquivo da Escola de Veterinária UFMG**, v.25, n.2, p.199-200, 1973.
- DAVOUST, B.; KEUNDJIAN, A.; ROUS, V.; MAURIZI, L.; PARZY, D. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. **Veterinary Microbiology**, v.107, p.279-283, 2005.
- DAWSON, J. E.; ANDERSON, B. E.; FISHBEIN, D. B.; SANCHEZ, J. L.; GOLDSMITH, C. S.; WILSON, K. H.; DUNTLEY, C. W. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.12, p.2741-2745, 1991.
- DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin of the Society Pathology Exotic**, v. 28, p.418-419, 1935.

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*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.51, p.2145-2165, 2001.

EDDLESTONE, S. M.; NEER, T. M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R.; GILL, A.; HOSGOOD, G.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E. B. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 4, p.840-844, 2006.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusions bodies or morulae of *E. canis*. **Journal of Small Animal Practice**, v.33, n.11, p.540-543, 1991.

EWING, S. A. Canine ehrlichiosis. In: BRANDLY, C. A.; CORNELIUS, C. E. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**. New York: Academic Press, v.13, p.331-353, 1969.

GLAUDUE, R. P.; BRIGHT G. M.; ISAACSON R. E.; NEWBORG M. F. *In vitro* and *in vivo* uptake of azithromycin (CP-62.993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p.277-282, 1989.

GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, p.545-561, 1990.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.7, p.937-940, 1975.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **The Compendium**, v.19, n.4, p.431-444, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; 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, 1998a.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; BARK, H. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.7, p.2140-2142, 1998b.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALJKER, J. S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.157, n.11, p.1627-32, 1970.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p.1658-1662, 1994.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Veterinary Microbiology**, v.42, n.4, p.281-287, 1994a.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p.1644-1649, 1994b.

KAVINSKI, L. C.; FLORIANO, B.; CARON, P. E.; BRONZE, S. J. M. Ocorrência de um caso de erliquiose em Curitiba-PR. **Revista Set. Ciências Agrárias, Curitiba**, v.10, n.1-2, p. 217-219, 1988.

KROLEWIECKI, A.; LEON S.; SCOTT, P.; ABRAHAM, D. Activity of azithromycin against *Leishmania major* in vitro and in vivo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n.3, p. 273-277, 2002.

KUEHN, N. F.; GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, n.4, p.355-358, 1985.

LABARTHE, N.; de 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. **Veterinary Therapeutics**, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

LAU, C. Y.; QURESHI, A. K. Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Sexually Transmitted Diseases**, Sep, v. 29, n. 9, p. 497-502, 2002.

MATTHEWMAN, L.A.; KELLY, P. J.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.65, n.3, p.104-107, 1994.

MAVROMATIS, K.; DOYLE, C. K.; LYKIDIS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M. P.; CHAIN, P.; SHIN, M.; Malfatti, S.; LARIMER, F.; COPELAND, A.; DETTER, J. C.; LAND, M.; RICHARDSON, P. M.; YU, X. J.; WALKER, D. H.; McBRIDE, J. W.; KYRPIDES, N. C. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.11, p.4015-4023, 2006.

MUTANI, A.; KAMINJOLO, J. S. The value of *in vitro* cell culture of granulocytes in the detection of *Ehrlichia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.4, p.377-380, 2001.

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 ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.309-315, 2002.



NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, C.A.; STEPHENSON, E. H. Cell-mediated and humoral immune responses of german sheperd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, n.2, p.250-254, 1980.

PEDROSO, T. C. Efficacy of doxycycline and combination with imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* in dogs. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, **Dissertação de Mestrado**, 56p. 2006.

PHIMDA, K.; HOONTRAKUL, S.; SUTTINONT, C.; CHAREONWAT, S.; LOSUWANALUK, K.; CHUEASUWANCHAI, S.; CHIERAKUL, W.; SUWANCHAROEN, D.; SILPASAKORN, S.; SAISONKORH, W.; PEACOCK, S. J.; DAY, N. P. J.; SUPUTTAMONGKOL, Y. Doxycycline versus Azithromycin for treatment of Leptospirosis and Scrub Typhus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, sept, p. 3259-3263, 2007.

PRICE, J. E.; DOLAN, T. T. A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. **The Veterinary Record**, n.107, p.275-7, 1980.

REINE, N. J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.19, n.2, p.68-74, 2004.

RIKIHISA, Y. The Tribe *Ehrlichieae* and Ehrlichial Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.3, p.286-308, 1991.

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western Immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.9, p.2107-2112, 1994.

RIKIHISA, Y. New taxonomy of the family *Anaplasmataceae* and phylogram of the of the family *Anaplasmataceae*. On-line, acesso em 02/06/2006, <http://riki-lb1.vet.ohioo-state.edu/ehrlichia/background.php>.

RUSTOMJEE, R.; KHARSANY, A. B. M.; CONNOLLY, C. A.; ABDOOL KARIM, S. S. A randomized controlled trial of azithromycin versus doxycycline/ciprofloxacin for the syndromic management of sexually transmitted infections in a resource-poor setting. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 875-878, 2002.

SAINZ, A. Aspectos clinicos y epizootiologicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapeutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb. Universidad Complutense de Madrid. **Tese de Doutorado**. 255p.1996.

SMITH, R. D.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; BAYLOR, R. A. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infection and Immunity**, v.11, n.6, p.1216-1221, 1975.

SOUSA, M. G.; HIGA, A. C.; GERARDI, D. G.; TINUCCI-COSTA, M.; MACHADO, R. Tratamento da erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. **Revista de Ciência Agroveterinárias**, v. 3, p. 126-130, 2004.

TEIXEIRA, A. C.; PAES, M. G.; GUERRA, J. O.; PRATA, A.; SILVA-VERGARA, M. L. Low efficacy of azithromycin to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n.4, 2006.

WANER, T.; LEYKIN, I.; SHINITSKY, M.; SHARABANI, E.; BUCH, H.; KEYSARY, A.; BARK, H.; HARRUS, S. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, n.77, p.145-150, 2000.

WATT, G.; KANTIPONG, P.; JONGSAKUL, K.; WATCHARAPICHAT, P.; PHULSUKSOMBATI, D. Azithromycin Activities against *Orientia tsutsugamushi* Strains Isolated in Cases of Scrub Typhus in Northern Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, nov, p. 2817-2818, 1999.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.7, p.1852-1855, 1997.

WILDFEWER, A.; LAUFEN G.; MULLER-WENING, D.; HAFERKAMP, O. Interaction of azithromycin and human phagocytic cells. Uptake of the antibiotic and the effect on the survival of ingested bacteria. **Arzneimittel-Forschung**, v.39, p. 755-758, 1989.

### **3 ARTIGO**

**Azitromicina no tratamento da erlichiose monocítica em cães naturalmente infectados****Azithromycin in the treatment of monocytic ehrlichiosis in naturally infected dogs**

**Daniela Torres CANTADORI<sup>1</sup>, Ana Luiza A. R. OSÓRIO<sup>2</sup>, Veronica Jorge BABO-TERRA<sup>2</sup>**

**RESUMO**

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficácia do tratamento com azitromicina em cães naturalmente infectados por *E. canis* e acompanhar a evolução clínico-hematológica dos animais. Dez cães, com diagnóstico positivo para *E. canis* por meio do teste de Elisa Snap 4Dx, foram distribuídos em dois grupos, sem tratamento e tratamento com azitromicina, 20 mg/kg, via oral uma vez ao dia durante sete dias. Além do exame físico diário foram realizados exames hematológicos, esfregaços de ponta de orelha para a pesquisa de mórulas e *nested* PCR antes do tratamento e pós-tratamento. Verificou-se que o tratamento não foi eficiente, uma vez que não desapareceram os sinais clínicos, assim como não houve recuperação hematológica dos cães e nem eliminação de *E. canis*.

Palavras-chave: Azitromicina - *Ehrlichia canis* – PCR - Cães

---

<sup>1</sup> Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Rua Alfenas, 135, apto 23, CEP 79100-000, Campo Grande, MS, e-mail: danicantadori@uol.com.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Médica Veterinária, Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

## ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the efficacy of treatment with azithromycin in dogs naturally infected with *E. canis* and also to follow the clinical and hematological changes of the animals during both treatment protocols. Ten dogs suspected of *E. canis* infection were diagnosed through Elisa test kit Snap 4Dx. They were distributed in two groups: without treatment and treated with azithromycin, 20mg/kg orally once a day for seven days. The dogs were submitted to daily physical examination. Hematologic and direct visualization of morulae in blood smears made from ear margin, and nested PCR to detect *E. canis* were performed before and after treatment. We could assume that treatment with azithromycin in the protocol used was not effective, did not promote the resolution of clinical signs, nor the hematological recovery of the animals, and was not able to eliminate *E. canis*.

Key-words: azithromycin - *Ehrlichia canis* – PCR - Dogs.

## INTRODUÇÃO

A *Ehrlichia canis* é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória, responsável pela erlichiose canina. Doença esta que, ao longo de sua história já recebeu vários nomes (HUXOLL et al., 1970; BREITSCHWERDT, 1997; HARRUS et al., 1998a; HARRUS et al., 1998b). É uma doença descrita mundialmente, cuja distribuição geográfica está relacionada à presença de seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, considerado também o seu reservatório primário (BREITSCHWERDT, 1997; ANDEREG e PASSOS, 1999). No Brasil, sabe-se que a *E. canis* está presente em praticamente todos os Estados do território nacional, sendo que o maior número de animais positivos encontra-se nas regiões mais quentes do país, incluindo o Estado de Mato Grosso do Sul (LABARTHE et al., 2003).

Experimentalmente, a doença apresenta três fases distintas: a aguda, a subclínica e a crônica (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997a). Na fase aguda, geralmente os sinais clínicos são mais evidentes; podendo ocorrer febre, anorexia, perda de peso e secreção oculonasal. Na fase subclínica, o animal torna-se assintomático ou com sinais brandos ainda que sem tratamento (BREITSCHWERDT, 1997; ANDEREG e PASSOS, 1999). Nesta fase, alguns cães podem eliminar a bactéria enquanto outros evoluem para a fase crônica como

portadores assintomáticos ou gravemente doentes (BREITSCHWERDT, 1997; HARRUS et al., 1998a; ANDEREG e PASSOS, 1999).

O prognóstico para a erlichiose canina depende da fase da doença em que o animal se encontra, da precocidade do diagnóstico e da terapêutica (BREITSCHWERDT, 1997). A profilaxia deve se concentrar no controle efetivo dos carrapatos, mas também pode ser feita com o uso prolongado da tetraciclina, pois não existe vacina e os animais não desenvolvem imunidade protetora (NYINDO et al., 1980; BREITSCHWERDT, 1997; BREITSCHWERDT et al., 1998; ANDEREG e PASSOS, 1999).

Em muitos animais é necessária e recomendável a eliminação terapêutica do agente para evitar agravamentos e o estado de portador crônico (HARRUS et al., 1998b; MUNHÓZ e BABO, 1998; ANDEREG e PASSOS, 1999).

Para o tratamento, várias drogas são indicadas: doxiciclina, dipropionato de imidocarb, tetraciclina, oxitetraciclina, minociclina, enrofloxacina, cloranfenicol. Podem ser administradas algumas associações (SAINZ, 1996) e ainda terapia de apoio quando necessário (BREITSCHWERDT, 1997; ANDEREG e PASSOS, 1999).

A azitromicina é o primeiro antibiótico macrolídeo que estruturalmente difere da eritromicina pela presença de um metil-nitrogênio substituído no anel lactose. Essa modificação tem produzido um comportamento farmacocinético distinto, o qual é caracterizado por alto nível tecidual e uma longa eliminação, aproximadamente 90 horas em doses múltiplas acima de cinco administrações (GIRARD et al., 1987).

É essencial que um agente antimicrobiano com atividade contra organismos intracelulares tenha habilidade de penetrar nas células (SCHWAB e MANDELL, 1989). Glaudue et al. (1989) mostraram em experimentos *in vitro* e *in vivo* que a azitromicina está concentrada em células fagocíticas. Wildfewer et al. (1989) sugerem que o acúmulo da azitromicina em fagócitos está associado com sua atividade contra microrganismos intracelulares.

A atividade da azitromicina tem sido amplamente avaliada na medicina humana em casos de infecção por riquetsias como *Orientia tsutsugamushi* (WATT et al., 1999; PHIMDA et al., 2007), e até mesmo no tratamento da infecção por *Leishmania major* (KROLEWIECKI et al., 2002) e da leishmaniose cutânea (TEIXEIRA et al., 2006), além de ser largamente comparada à doxiciclina no tratamento de diversas infecções sexualmente transmissíveis, com bons resultados (LAU e QURESHI, 2002; RUSTOMJEE et al., 2002).

Na medicina veterinária, entretanto, devido à escassez de referências, clínicos de pequenos animais vêm utilizando o medicamento como opção terapêutica em casos de

reinfeção por *E. canis*, ou em situações como animais gestantes e filhotes, devido à melhor aceitação da azitromicina por causar menos efeitos colaterais.

A fácil administração da azitromicina (uma dose diária) e o curto período de tratamento em comparação com a doxiciclina, favorecem sua prescrição por parte dos médicos veterinários, por ter melhor aceitação do proprietário em relação ao período de 21 a 28 dias necessário para o tratamento com doxiciclina. Ainda, o custo final do tratamento com azitromicina, de forma geral, é menor do que a terapia com doxiciclina.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficácia da azitromicina no tratamento da erlichiose monocítica canina, em cães naturalmente infectados e acompanhar a evolução clínico-hematológica dos animais tratados em relação ao grupo controle.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram pesquisados 44 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), município de Campo Grande-MS, os quais foram entregues pelos proprietários ao CCZ ou recolhidos das ruas.

O critério de inclusão adotado foi a escolha dos animais baseada na presença de carrapatos e sorologia positiva para *E. canis*. O critério de exclusão foi a sorologia positiva para *Leishmania* sp ou infecção concomitante por hemoparasitos como *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys*.

De início, foram coletadas amostras de sangue, através da punção venosa para obtenção do soro sanguíneo, em frascos siliconizados sem anticoagulante. Em seguida os soros foram pesquisados quanto à presença de anticorpos anti-*E. canis*, pelo teste de Elisa, por meio do *kit* comercial<sup>3</sup>, seguindo as instruções do fabricante. Dez animais sorologicamente positivos para *E. canis* foram mantidos no Hospital Veterinário da Universidade Católica Dom Bosco-UCDB de Campo Grande-MS, durante o período experimental.

Todos os animais selecionados receberam água e ração comercial seca à vontade e foram submetidos a controle de ectoparasitos com pulverização com talco à base da associação de isopropoxifenil e metilcarbamato<sup>4</sup> que permaneceu em cada animal durante 24 horas. Após serem banhados foi aplicado outro princípio ativo, o fipronil<sup>5</sup>, para melhor

---

<sup>3</sup> *Snap 4Dx*®, laboratório Idexx

<sup>4</sup> talco Bolfo® (1% de 2-isopropoxifenil-N-metilcarbamato), laboratório Bayer

<sup>5</sup> *Frontline Top Spot*® (fipronil), laboratório Merial Saúde Animal

eliminação dos carrapatos e prevenção de reinfestação. Para o controle de endoparasitas foi utilizada a associação dos princípios ativos pamoato de pirantel, sulfóxido de albendazole e praziquantel<sup>6</sup>.

Os animais sorologicamente positivos para *E. canis* foram distribuídos em dois grupos: controle (C, n=5), não tratados e tratamento (T, n=5). O tratamento instituído foi a suspensão de azitromicina<sup>7</sup> na dose de 20 mg /kg VO a cada 24 horas durante 7 dias consecutivos. Nenhum outro antibiótico ou tratamento de suporte foi administrado no grupo T.

Os cães foram acompanhados diariamente durante o período de tratamento e pós-tratamento e os dados foram registrados em fichas clínicas. Registraram-se os sinais vitais, consumo de alimento e qualquer sinal clínico. Foi considerado dia zero (0), o dia do início do tratamento, e dias dez (10) e quatorze (14) os dias para coleta de amostras de sangue para hemograma, punção de baço para a PCR e esfregaço sanguíneo de ponta de orelha para pesquisa de mórula. Estes intervalos foram determinados com o objetivo de diminuir a interferência do efeito residual da azitromicina que é de aproximadamente 90 horas (PECHÈRE, 1991).

Foram colhidas amostras de sangue de 3 ml cada, por punção da veia jugular e/ou cefálica com auxílio de seringa de 5 ml e agulha 25x7 descartáveis, de cada animal para a realização do hemograma. Esse sangue foi acondicionado em frascos siliconizados contendo 0,1 ml de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), em solução a 10%. No hemograma foram avaliados volume globular, hematimetria, hemoglobinometria, leucometria global e específica, hematoscopia e leucocitoscopia realizados de acordo com Kaneko et al. (1997). A contagem de plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer utilizando-se como diluente oxalato de amônio a 5% (KANEKO et al., 1997). As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica, utilizando objetiva com aumento de 100 X (Olympus®).

A pesquisa de mórulas foi feita em esfregaços de sangue confeccionado a partir de punção com agulha fina na ponta de orelha, corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica, utilizando objetiva com aumento de 100 X (Olympus®).

Para a PCR no pré-tratamento (dia zero) utilizou-se das amostras de sangue previamente colhidas para o hemograma. Para a PCR no pós-tratamento foram colhidas amostras de sangue de punção de baço, guiada por ultra-som e acondicionadas em frascos

---

<sup>6</sup> Rico composto® (pamoato de pirantel, sulfóxido de albendazole e praziquantel), laboratório Ouro Fino

<sup>7</sup> Azitromed® (azitromicina diidratada- 200mg/5ml), laboratório Medquímica



siliconizados com EDTA. Para esta coleta, os cães foram anestesiados com tiletamina e zolazepan<sup>8</sup>, na dose de 0,12 mg/kg.



Figura 1. Punção de baço guiada por ultra-som.

A *nested* PCR foi realizada no Instituto de Biociências do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Botucatu-SP. Foram utilizados 350 µl de sangue para extração de DNA por meio do *kit* comercial<sup>9</sup>, seguindo as orientações do fabricante. Na última etapa da extração, o DNA foi ressuspendido em 100 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura. A concentração do DNA foi avaliada por eletroforese em gel agarose 0,8% com marcador lâmbda ( $\lambda$ ) 50 pb<sup>10</sup>. Para amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA de *E. canis* foi seguida a metodologia de Went et al. (1997) com as seguintes adequações: foram utilizados 2 µl de DNA em reações de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão 10x, 0,8 µl de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 0,25 mM de trifosfato deoxinucleotídeos, 2,5 U de taq polimerase, 100 ng do *primer* EHO (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'), 100 ng do *primer* EHO (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3') e 17,7 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura. A PCR foi realizada a 94°C por 1 minuto, 67,5°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto em termociclador MJ PTC-200.

Para a segunda PCR, foram alteradas apenas as quantidades de DNA (1 µl), H<sub>2</sub>O ultrapura (18,7 µl) e os *primers* utilizados, que foram 100 ng do *primer* ECA (5'-CCATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3') e 100 ng do *primer* ECA (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'). Um controle positivo com DNA de *E. canis* e um controle negativo sem DNA foram inclusos em cada PCR. Os produtos da *nested* PCR foram avaliados em gel da agarose 0,8%, após eletroforese (BULLA et al.;2004). Os géis

<sup>8</sup> Zoletil® (tiletamina e zolazepan), laboratório Virbac

<sup>9</sup> Easy-DNA™, laboratório Invitrogen Corporation

<sup>10</sup> Laboratório Invitrogen Corporation

foram corados em brometo de etídeo e a massa molecular aparente das bandas protéicas foi determinada conforme mobilidade relativa, com a utilização de *software* próprio<sup>11</sup>.

A presença de mórula e positividade na PCR foram avaliadas antes e após o tratamento por meio do teste de Duncan, com nível de significância de 5% ( $p=0,05$ ).

## RESULTADOS

Os resultados de exames clínicos realizados no dia 0 e 14 estão sumarizados na Tabela 1. Os animais do grupo de tratamento (grupo T) se mantiveram ativos e comendo, com exceção de um animal que apresentava muita apatia e escore corporal ruim. Somente um cão, que inicialmente tinha febre, manteve o quadro febril até o dia sete, último dia de administração da azitromicina. Todos os animais deste grupo apresentaram uma significativa melhora no quadro de tosse e secreção nasal e ocular. Somente um animal não apresentava mucosas hipocoradas.

Tabela 1 – Cães com erlichiose pertencentes ao grupo controle (sem tratamento) e tratados com azitromicina, que apresentaram sinais clínicos no dia zero (antes do tratamento) e no dia 14 (pós-tratamento). n=5 em cada grupo

<i>Sinal clínico</i>	<i>Grupo Tratamento</i>		<i>Grupo Controle</i>	
	Antes	Depois	Antes	Depois
Febre ( $T^{\circ} > 39,5$ )	1	0	2	2
Emagrecimento	2	1	3	3
Anoexia	0	1	0	1
Apatia	1	1	1	2
Mucosas hipocoradas	1	4	2	3
Linfadenopatia	0	0	2	2
Secreção ocular	4	2	4	3
Tosse	4	2	4	4

As alterações hematológicas observadas nos exames realizados nos dias 0 e 14 estão sumarizados na Tabela 2. Os achados mais freqüentes nos dois grupos foram diminuição da hematimetria e trombocitopenia. No grupo T, todos os animais apresentavam valores de hematimetria no limite inferior de referência ( $5,5$  a  $8,5 \times 10^3$  hemácias/mm<sup>3</sup>) no momento do diagnóstico; no final do experimento, 3 animais apresentavam valores de hematimetria abaixo do limite mínimo (Tabela 2). No grupo C, apenas um animal apresentou redução da

<sup>11</sup> AlphaDigiDoc™ - Molecular Weight Calculation - Alpha Innotech Corporation

hematimetria no início e todos terminaram o experimento anêmicos, sendo que um deles apresentou anemia microcítica hipocrômica.

Tabela 2 - Alterações hematológicas em cães observadas no dia zero (0), antes do tratamento; no dia 14, pós-tratamento, nos dois grupos experimentais. n=5 em cada grupo

<i>Sinal clínico</i>	<i>Grupo Tratamento</i>		<i>Grupo Controle</i>	
	Antes	Depois	Antes	Depois
Anemia ( $<5,5 \times 10^6/\text{mm}^3$ )	0	3	1	5
Trombocitopenia ( $<2 \times 10^4/\text{mm}^3$ )	3	2	4	1
Leucocitose ( $>17 \times 10^3/\text{mm}^3$ )	1	0	0	0
Leucopenia ( $>6 \times 10^3/\text{mm}^3$ )	2	4	3	1
Neutrofilia ( $> 11.500$ )	1	0	0	0
Monocitose ( $> 1.350$ )	1	0	0	0
Linfopenia ( $< 1.000$ )	4	5	3	3
Presença de Mórula	5	1	3	2

Os resultados da pesquisa de mórula (Figura 2) em esfregaços sanguíneos e da *nested* PCR pré-tratamento e pós-tratamento estão apresentados na Tabela 3.

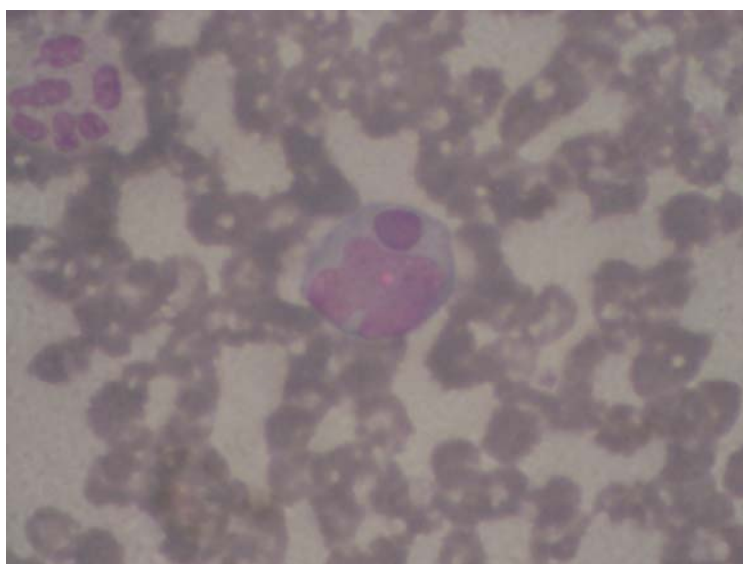


Figura 2. Mórula de *E. canis* em monócito apresentando vacuolizações citoplasmáticas (monócito ativado). Aumento de 100 X (Olympus®).

Tabela 3 - Resultados da pesquisa de mórula e da PCR pré e pós-tratamento

Tratamento						
Animal	Dia 0		Dia 10		Dia 14	
	mórula	PCR	mórula	PCR	mórula	PCR
T1	+	+	-	+	-	+
T2	+	+	-	+	-	-
T3	+	-	-	+	-	+
T4	+	+	+	+	-	+
T5	+	+	+	+	+	+
Controle						
Animal	Dia 0		Dia 10		Dia 14	
	mórula	PCR	mórula	PCR	mórula	PCR
C1	+	+	-	+	-	+
C2	-	-	-	+	-	+
C3	-	-	+	-	+	+
C4	+	+	+	+	+	+
C5	+	+	-	+	-	+

Positivo (+) Negativo (-)

Tanto os resultados da *nested* PCR como presença de mórulas no grupo tratado com azitromicina mostraram que não houve eliminação terapêutica, quando comparados ao grupo controle, já que os dois grupos não diferiram entre si pelo teste de Duncan ( $p>0,05$ ) (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias ordenadas ( $\pm$  erro padrão) de mórulas e positividade na PCR pré e pós-tratamento

Grupo	Dia = 0		Dia = 10		Dia = 14	
	Mórula	PCR	Mórula	PCR	Mórula	PCR
Tratamento	4,5 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
Controle	6,5 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	5,5 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra, (a) não diferem entre si pelo Teste de Duncan ( $p>0,05$ )

## DISCUSSÃO

Os sinais clínicos (Tabela 1) apresentados pelos cães dos dois grupos foram semelhantes aos descritos na literatura para erlichiose monocítica canina (KUEHN e GAUNT, 1985; HARRUS et al., 1997b; MOREIRA et al., 2003). A presença de carrapatos observada no dia 0 (critério de inclusão de todos os animais) (HARRUS et al., 1997a), a observação de mórulas (tabela 3) (ELIAS, 1991) e os sinais clínicos observados sugerem que os animais T1, T2, T3, T4, T5, C1, C4 e C5 estavam na fase aguda da erlichiose. Entretanto, os animais estudados não apresentavam histórico, por serem animais sem proprietários. Além disso, o

teste sorológico utilizado detecta apenas contato prévio com o agente etiológico, não sendo, deste forma, possível determinar em que fase da doença os animais se encontravam.

Considerando que esses animais encontravam-se na fase aguda, a resposta ao tratamento não ocorreu conforme esperado (BUHLES et al., 1974; GREENE e HARVEY, 1990), isto é, no período de dez dias, intervalo existente entre a primeira e segunda avaliação. O tempo de resposta clínica à terapia sofre interferência da fase da doença (BUHLES et al., 1974; HARRUS et al., 1998b), sendo mais rápido na fase aguda e mais demorado na fase crônica.

Na hematologia, a observação de anemia e trombocitopenia como ocorreu neste estudo são amplamente citadas na erlichiose (SMITH et al., 1975; KUEHN e GAUNT, 1985; HARRUS et al., 1997a; HARRUS et al., 1997b). Nos animais sem tratamento a progressão dessas alterações ocorreu conforme o citado (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997a), mas nos animais tratados não houve recuperação (SAINZ, 1996; NEER et al., 2002). Em estudos que utilizam cães em condições naturais de infecção, como este, torna-se difícil determinar em que fase da doença o animal se encontra (MOREIRA et al., 2003) e se ele está completamente livre de outras infecções.

A trombocitopenia demonstrada na primeira avaliação hematológica está de acordo com vários autores. Ela é a alteração hematológica mais consistente que ocorre na erlichiose monocítica canina (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997a), geralmente em estágios iniciais da doença (WANER et al., 2000) e pode ser usada como triagem (BULLA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2005).

Em nosso estudo, 02 animais do grupo de tratamento chegaram ao final do experimento sem normalizar a contagem de plaquetas. Esses resultados indicam falha no tratamento, pois conforme relatos de Harrus et al. (1998a) e Neer et al. (2002), a plaquetometria pode ser considerada um bom indicador da eficiência da terapia contra *E. canis*, uma vez que a normalização geralmente ocorre dentro de quatorze dias após o tratamento.

A leucocitose é considerada característica na fase aguda da erlichiose (GREENE e HARVEY, 1990). No entanto, ela foi observada em apenas um animal do grupo de tratamento (Tabela 2). A leucopenia geralmente está associada à fase crônica (GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997a), mas também já foi descrita na fase aguda (CASTRO et al. 2004) e foi observada em cinco animais, sendo dois do grupo tratado e três do grupo controle. Após o tratamento (grupo T), somente um animal terminou o experimento com contagem normal de leucócitos e todos os outros estavam com leucopenia, sendo que um animal

apresentava pancitopenia, que é uma alteração relatada na fase crônica por vários autores (KUEHN e GAUNT, 1985; GREENE e HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997a). Este animal apresentou mórula em esfregaços sanguíneos durante todo o experimento, sugerindo que se encontrava na fase aguda da doença (ELIAS, 1991), demonstrando que as alterações hematológicas não são capazes de determinar em que fase da doença os animais se encontram, em casos de infecção natural como os do presente estudo.

Entre os animais tratados somente um animal iniciou o experimento com monocitose, e dois terminaram o tratamento com monocitopenia. Nos animais sem tratamento, todos apresentaram valores normais na contagem de monócitos no final da avaliação. Monocitose é frequentemente descrita na erlichiose (KUEHN e GAUNT, 1985; HARRUS et al., 1997b), geralmente relacionada à fase aguda (GREENE e HARVEY, 1990). O tempo estimado para normalização dos valores de cada tipo de leucócito durante o tratamento não é abordado de forma específica na literatura, apenas cita-se que há uma melhora ao longo do tratamento (SAINZ, 1996; SOUSA et al., 2004).

De acordo com os resultados da PCR pré-tratamento (Tabela 3), um animal apresentou resultado negativo, embora com mórula em esfregaço sanguíneo. Este mesmo animal apresentou PCR de amostra de baço positiva nos dias 10 e 14. Isto sugere que a amostra de sangue total não é a melhor escolha para a pesquisa de *E. canis* por PCR, conforme relatos de Harrus et al. (2004), que sugerem que a melhor opção de amostra para PCR pós-tratamento, a fim de avaliar a eliminação da bactéria, seria do baço porque este órgão alberga *Ehrlichia* por mais tempo. Em nosso estudo, optamos por empregar a *nested* PCR em amostras de sangue obtidas antes do tratamento devido à aplicabilidade deste método de coleta e sua praticidade na rotina da clínica veterinária de pequenos animais. No pós-tratamento, optou-se pela punção de baço. Contudo, os próprios autores afirmam que a alta sensibilidade da PCR torna as duas formas de amostragem semelhantes (HARRUS et al., 2004).

O animal T2 apresentou resultado negativo na PCR de amostra de baço no dia 14. Este resultado pode ter ocorrido devido à eliminação da bactéria pelo tratamento ou por ser um animal imunocompetente, que eliminou o microorganismo sem interferência do tratamento (GREENE e HARVEY, 1990). Estudos revelaram que a PCR de punção de baço tornou-se negativa no décimo sexto dia após o início do tratamento com doxiciclina (HARRUS et al., 2004). O resultado negativo no dia 14, embora em apenas um animal, nos remete à possibilidade da eficácia do tratamento com azitromicina.

O fato do animal C3 ter sido negativo na PCR no dia 10, embora tenha sido positivo na pesquisa de mórula neste mesmo dia (Tabela 3), pode ser devido à presença de coágulo na amostra, pois a rede de fibrina seqüestra leucócitos, podendo levar a um resultado falso negativo.

### CONCLUSÃO

- A eliminação da *E. canis* em cães naturalmente infectados pelo tratamento com azitromicina não foi alcançada, com o protocolo utilizado;
- A terapia com azitromicina não levou à recuperação clínica e hematológica dos animais infectados.

## REFERÊNCIAS

- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, n.19, p.31-38, 1999.
- BREITSCHWERDT, E. B. As riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: moléstias do cão e do gato**. 4ª ED. São Paulo: Manole, v. 1, cap. 67. p.543-553, 1997.
- BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.2, p.362-368, 1998.
- BUHLES, W. C.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 130, p.357-367, 1974.
- 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. **Veterinary Research**, n. 35, p.141-146, 2004.
- CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunological findings. **Veterinary Parasitology**, n.119, p.73-86, 2004.
- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **Journal of Small Animal Practice**, v.33, n.11, p.540-543, 1991.
- GIRARD, A. E.; GIRARD, D.; ENGLISH, A. R.; GOOTZ, T. D.; CIMOCHOWSKI, C. R.; FAIELLA, J. A.; HASKELL, S. L.; RETSEMA, J. A. Pharmacokinetics and in vivo studies with azithromycin (CP-62.993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 31, p.1948-1954, 1987.
- GLAUDUE, R. P.; BRIGHT, G. M.; ISAACSON, R. E.; NEWBORG, M. F. *In vitro* and *in vivo* uptake of azithromycin (CP-62.993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 33, p.277-282, 1989.
- GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, p.545-561, 1990.
- HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **The Compendium**, v.19, n.4, p.431-444, 1997a.



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

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; 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, 1998a.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; BARK, H. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.7, p.2140-2142, 1998b.

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 48, p. 4488-4490, 2004.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALJKER, J. S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.157, n.11, p.1627-1632, 1970.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>a</sup> ED. San Diego, Academic Press, p. 932, 1997.

KROLEWIECKI, A.; LEON S.; SCOTT, P.; ABRAHAM, D. Activity of azithromycin against *Leishmania major* *in vitro* and *in vivo*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n.3, p. 273-277, 2002.

KUEHN, N. F.; GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, n.4, p.355-358, 1985

LABARTHE, N.; de 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. **Veterinary Therapeutics**, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

LAU, C. Y.; QURESHI, A. K. Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Sexually Transmitted Diseases**, Sep, v. 29, n. 9, p. 497-502, 2002.

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. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 44-48, 2005.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, p. 141-147, 2003.

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

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 ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.309-315, 2002.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, C.A.; STEPHENSON, E. H. Cell-mediated and humoral immune responses of german sheperd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, n.2, p.250-254, 1980.

PHIMDA, K.; HOONTRAKUL, S.; SUTTINONT, C.; CHAREONWAT, S.; LOSUWANALUK, K.; CHUEASUWANCHAI, S.; CHIERAKUL, W.; SUWANCHAROEN, D.; SILPASAKORN, S.; SAISONGKORH, W.; PEACOCK, S. J.; DAY, N. P. J.; SUPUTTAMONGKOL, Y. Doxycycline versus Azithromycin for treatment of Leptospirosis and Scrub Typhus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, sept, p. 3259-3263, 2007.

RUSTOMJEE, R.; KHARSANY, A. B. M.; CONNOLLY, C. A.; ABDOOL KARIM, S. S. A randomized controlled trial of azithromycin versus doxycycline/ciprofloxacin for the syndromic management of sexually transmitted infections in a resource-poor setting. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 875-878, 2002.

SAINZ, A. Aspectos clinicos y epizootiologicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapeutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb. Universidad Complutense de Madrid. **Tese de Doutorado**. 255p.1996.

SCHWAB J. C.; MANDELL G. L., The importance of penetration of antimicrobial agents into cells. **Infectious Disease Clinics of North America**, n.3, p461-467, 1989.

SMITH, R. D.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; BAYLOR, R. A. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infection and Immunity**, v.11, n.6, p.1216-1221, 1975.

SOUSA, M. G.; HIGA, A. C.; GERARDI, D. G.; TINUCCI-COSTA, M.; MACHADO, R. Tratamento da erlichiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.3, p. 126-130, 2004.

TEIXEIRA, A. C.; PAES, M. G.; GUERRA, J. O.; PRATA, A.; SILVA-VERGARA, M. L. Low efficacy of azithromycin to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n.4, 2006.

WANER, T.; LEYKIN, I.; SHINITSKY, M.; SHARABANI, E.; BUCH, H.; KEYSARY, A.; BARK, H.; HARRUS, S. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, n.77, p.145-150, 2000.

WATT, G.; KANTIPONG, P.; JONGSAKUL, K.; WATCHARAPICHAT, P.; PHULSUKSOMBATI, D. Azithromycin Activities against *Orientia tsutsugamushi* Strains Isolated in Cases of Scrub Typhus in Northern Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, nov, p. 2817-2818, 1999.

WILDFEWER, A.; LAUFEN G.; MULLER-WENING, D.; HAFERKAMP, O. Interaction of azithromycin and human phagocytic cells. Uptake of the antibiotic and the effect on the survival of ingested bacteria. **Arzneimittel-Forschung** ,v.39, p. 755-758,1989.