

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

**EFICÁCIA DA DOXICICLINA E DA COMBINAÇÃO COM O  
DIPROPIONATO DE IMIDOCARB NO TRATAMENTO DE  
*Ehrlichia canis* EM CÃES**

**Efficacy of doxycycline and combination with imidocarb  
dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* in dogs**

**Thatianna Camillo Pedroso**

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL-BRASIL  
DEZEMBRO-2006

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

**EFICÁCIA DA DOXICICLINA E DA COMBINAÇÃO COM O  
DIPROPIONATO DE IMIDOCARB NO TRATAMENTO DE  
*Ehrlichia canis* EM CÃES**

**Efficacy of doxycycline and combination with imidocarb  
dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* in dogs**

**Thatianna Camillo Pedroso**

Profa. Dra. Veronica Jorge Babo-Terra  
Dr. Flávio Ribeiro De Araújo

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Mato Grosso  
do Sul, como requisito à obtenção do  
título de Mestre em Ciência Animal.  
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL-BRASIL  
DEZEMBRO-2006

THATIANNA CAMILLO PEDROSO

**“Eficácia da doxiciclina e da combinação com o dipropionato de imidocarb no tratamento de *Ehrlichia canis* em cães”.**

**Efficacy of doxycycline and combination with imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* in 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: 12/12/2006



Dra. Verônica Jorge Babo Terra  
Orientadora



Dr. Michael Robin Honer



Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório

Dedico este trabalho à minha família, por estar sempre presente nos grandes momentos de minha vida. E principalmente por estar presente nos demais momentos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos Henrique Rodrigues Pedroso e Berenice Camillo Pedroso, pelo amor, zelo e presença constantes.

Aos meus avós, Frederico Pedroso e Dirce Rodrigues Pedroso, pela paciência e incentivo.

Ao Alexandre Pereira, companheiro de muitas vidas, pelo apoio e compreensão.

À minha orientadora Profa. Dra. Veronica Jorge Babo-Terra, pelo apoio, confiança, disponibilidade e especialmente a amizade desenvolvida ao longo do curso.

Ao meu co-orientador Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, pela atenção, ensinamentos e abertura das portas da Embrapa Gado de Corte para pesquisas com *Ehrlichia canis*.

À Médica Veterinária Daniela Torres Cantadori, pelo apoio ao projeto e amizade.

À Médica Veterinária Michelle Carmo de Almeida, pela prestatividade e auxílio no desenvolvimento da técnica de PCR.

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

Aos funcionários Sandro Pinto de Araújo, Celso de Barros Calças, Sérgio Ferreira, Reginaldo Ferreira e Alfredo José de Sousa pelo auxílio técnico.

Aos acadêmicos de Medicina Veterinária Andréia Santana Silveira, Walderson Zuza Barbosa, Daniel da Costa Feliz, Lenice Mie Joboji e Marcus Vinicius Lima Furtado pela ajuda nas coletas, exames físicos e medicação dos animais.

À Marilete Otaño Peixoto Ferencz, pela simpatia e prontidão.

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

À CAPES, pela bolsa de Mestrado.

Ao Laboratório Ouro Fino, pelas medicações cedidas.

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

Aos animais Kika, Lili, Bóris, Nina, Duquesa, Dolly, Apolo, Pandora, Pity, Ploc, Sapeca, Princesa, Florzinha, Pelé e Poti, por se manterem carinhosos e amáveis mesmo quando seus corpos foram emprestados à ciência.

Sirvo-me dos animais para instruir os homens.  
(La Fontaine)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	12
1.2	PATOGÊNESE.....	13
1.3	ASPECTOS CLÍNICOS.....	15
1.4	ASPECTOS LABORATORIAIS.....	16
1.5	DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO.....	18
1.6	TERAPÊUTICA.....	20
1.7	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO.....	21
1.8	PROFILAXIA.....	23
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>29</b>
	Eficácia da doxiciclina e da combinação com o dipropionato de imidocarb no tratamento de <i>Ehrlichia canis</i> em cães.....	30
	RESUMO.....	30
	ABSTRACT.....	31
	INTRODUÇÃO.....	32
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
	RESULTADOS.....	36
	DISCUSSÃO.....	40
	CONCLUSÕES.....	46
	AGRADECIMENTOS.....	46
	REFERÊNCIAS.....	46

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mórula de *E. canis* em monócito apresentando vacuolizações citoplasmáticas (monócito ativado) e eritrofagocitose. Ao lado encontra-se um linfócito com citoplasma intensamente azulado (linfócito reacional).....51

FIGURA 2. Resultados da PCR do grupo D, da esquerda para a direita: marcador Kb plus, D-01A, D-01P, D-02A, D-02P, D-03A, D-03P, D-04A, D-04P, D-05A, D-05P. A = antes do tratamento; P = pós-tratamento.....51

FIGURA 3. Resultados da PCR do grupo I, da esquerda para a direita: marcador Kb plus, I-01A, I-01P, I-02A, I-02P, I-03A, I-03P, I-04A, I-04P, I-05A, I-05P. A = antes do tratamento; P = pós-tratamento.....51

FIGURA 4. Resultados da PCR do grupo C, da esquerda para a direita: marcador Kb plus, controle positivo, controle negativo, C-02A, C-02P, C-03A, C-03P, C-04A, C-04P, C-05A, C-05P. A = antes do tratamento; P = pós-tratamento.....51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Freqüência absoluta e relativa das principais manifestações clínicas observadas antes e depois de cada tratamento em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*.....50

TABELA 2. Freqüência absoluta e relativa das principais alterações hematológicas observadas antes e depois de cada tratamento em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*.....50

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAG – Alfa-1-ácido-glicoproteínas

ALT – Alanina aminotransferase

CCZ – Centro de Controle De Zoonoses

CRP – Proteínas C-reativas

DNA – Ácido desoxirribonucléico

*E. canis* – *Ehrlichia canis*

*E. chaffeensis* – *Ehrlichia chaffeensis*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Imunoensaio de ligação enzimática

FAMEZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FAS – Fosfatase alcalina

Grupo C – Grupo controle, sem tratamento

Grupo D – Grupo tratado apenas com doxiciclina

Grupo I – Grupo tratado com associação de doxiciclina e dipropionato de imidocarb

IFI – Imunofluorescência indireta

IM – Via intramuscular

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

*R. sanguineus* – *Rhipicephalus sanguineus*

RNA – Ácido ribonucléico

SC – Via subcutânea

UV – Ultravioleta

VO – Via oral

WI – Western Immunoblotting

## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram comparar a eficácia do tratamento isolado com doxiciclina e da combinação do dipropionato de imidocarb com doxiciclina em cães naturalmente infectados por *E. canis*, verificando se há vantagens ou não no tratamento combinado; certificar a necessidade de tratamento em cães assintomáticos e ainda acompanhar a evolução clínico-hematológica dos animais durante os tratamentos isolado e combinado. Quinze cães diagnosticados para *E. canis* por meio de observação de mórulas em células de esfregaço sanguíneo foram distribuídos em três grupos, sem tratamento (C), tratamento com doxiciclina 10 mg/kg via oral uma vez ao dia por 28 dias (D) e doxiciclina combinada ao dipropionato de imidocarb (I), em duas injeções de 5 mg/kg subcutânea com intervalo de 14 dias. Foram realizados exames físico e hematológico semanalmente. A *nested* PCR para *E. canis* foi realizada antes e após o tratamento. Verificou-se que os tratamentos foram eficientes, resolveram os sinais clínicos em poucos dias e promoveram a recuperação hematológica em cerca de 70% dos cães. No entanto, não foi observada diferença entre os tratamentos. A eliminação de *E. canis* foi observada por *nested* PCR de sangue total em 70% dos cães tratados.

Palavras-chave: Doxiciclina - Dipropionato de imidocarb - *Ehrlichia canis* - PCR - Cães.

## ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the efficacy of doxycycline alone and of the combination of imidocarb dipropionate with doxycycline in the treatment of dogs naturally infected with *E. canis*; to analyse if there are advantages in using the association of imidocarb dipropionate and doxycycline in the treatment of *E. canis* infection; to reassure the need of treatment in asymptomatic infected dogs and also to observe the clinical and hematological recovery of the animals during both treatment protocols. Fifteen dogs suspected of *E. canis* infection were diagnosed through direct visualization of morulae in blood smear cells. They were divided in three groups: (C) without treatment; (D) treated with doxycycline 10 mg/kg orally once a day for 28 days and (I), with doxycycline associated with imidocarb dipropionate, in two subcutaneously injections of 5 mg/kg 14 days apart. The animals were submitted to physical and hematologic exams weekly. Nested PCR to detect *E. canis* were performed before and after treatment. We could assume that both treatments were effective and lead to the resolution of clinical signs in a few days and also promoted the hematological recovery in 70% of the dogs. There were no differences between treatments. The elimination of *E. canis* could be suggested by whole blood nested PCR in 70% of the treated dogs.

Key-words: Doxycycline - Imidocarb Dipropionate - *Ehrlichia canis* - PCR -Dogs.

# 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). Ela foi primeiramente descrita na Argélia (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935), mas somente ganhou destaque durante a Guerra do Vietnã, quando produziu grandes perdas entre os cães militares (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 & HARVEY, 1990) e atualmente é denominada erlichiose monocítica canina (HARRUS et al., 1998a; HARRUS et al., 1998b).

## 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Atualmente, a enfermidade é descrita mundialmente, mas os casos concentram-se nas áreas tropicais e subtropicais devido à distribuição geográfica de seu vetor, *Rhipicephalus sanguineus*, chamado popularmente de carrapato vermelho ou carrapato marrom do cão (HARRUS et al., 1997; COHN, 2003).

No Brasil, a erlichiose monocítica canina foi diagnosticada pela primeira vez em 1973, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (COSTA et al., 1973), sendo este também o primeiro caso diagnosticado na América do Sul. 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).

Além de 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 & 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 transestadial, 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).

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 é geneticamente muito semelhante a *E. canis*, por isso apresenta 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 PATOGÊNESE**

Com infecções experimentais foi possível observar que o período de incubação da erlichiose varia de oito a vinte dias e podem ser distintas três fases da doença: aguda, subclínica e crônica (GREENE & HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997).

Durante a fase aguda, a bactéria invade as células mononucleares teciduais, multiplica-se e produz hiperplasia linforreticular no baço, fígado e linfonodos. As

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

Na fase subclínica, geralmente surge a hiperglobulinemia, nem sempre relacionada à eliminação de *E. canis* (GREENE & 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 intracelulares depende da resposta imune celular (NYNDO 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 & HARVEY, 1990). Alguns cães podem se manter infectados por longos períodos, inclusive por anos (HARRUS et al., 1998a).

A fase crônica é caracterizada pela pancitopenia decorrente do comprometimento da medula óssea, que pode ser causado por mecanismos imunomediados, infecção no interior da medula óssea ou exaustão devido à destruição contínua de plaquetas (GREENE & HARVEY, 1990).

A recente caracterização molecular de *E. canis* identificou uma deficiência de componentes estruturais, tais como peptidoglicanos e lipopolissacarídeos. A falta desses componentes resultou no desenvolvimento de uma complexa estrutura

de proteínas de membrana. Essas proteínas têm papel potencial nas estratégias adaptativas de evasão imune do microrganismo e nas interações 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, enquanto em *E. canis* são 25 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 ASPECTOS CLÍNICOS**

Diversos sinais clínicos são associados à erlichiose monocítica canina. Estes sinais são influenciados pela cepa infectante, imunidade individual, idade e raça do cão, re-exposição ao agente, presença de co-infecções e provavelmente também a fatores ainda desconhecidos (KUEHN & GAUNT, 1985; GREENE & HARVEY, 1990; BREITSCHWERDT et al., 1998a; 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. Os sinais clínicos desta fase incluem febre, depressão, anorexia, perda de peso, mucosas pálidas, secreção oculonasal, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (GREENE & 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 do agente, 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).

Os sinais clínicos na fase crônica podem estar ausentes ou ainda mais 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 (HARRUS et al., 1997). A exacerbação da resposta imune não-protetora pode levar à glomerulonefrite e à síndrome da hiperviscosidade. Além disso, pode haver infecções secundárias (COHN, 2003).

#### **1.4 ASPECTOS LABORATORIAIS**

Na fase aguda, as alterações laboratoriais mais observadas são trombocitopenia associada ao aumento do número de macroplaquetas (SMITH et al., 1975); anemia, regenerativa ou arregenerativa e contagens leucocitárias diversas. Leucocitose, monocitose e presença de mórulas são consideradas características desta fase (GREENE & HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997), apesar de a leucopenia também ser descrita (CASTRO et al., 2004). As mórulas são comumente observadas em monócitos e linfócitos (EWING, 1969; KUEHN & 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 & HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997). Hiperglobulinemia com gamopatia mono ou policlonal também são características desta fase (GREENE & 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 e aumento do consumo, 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 trombocitopenia, 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 das enzimas séricas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina sérica (FAS), proteínas C-reativas (CRP) e alfa-1-ácido-glicoproteínas (AAG); e aumento da bilirrubina total (GREENE & HARVEY, 1990; COHN, 2003).

## **1.5 DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO**

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 & KAMINJOLO, 2001). Nos esfregaços realizados a partir da ponta de orelha pode ser mais fácil visualizar a mórula do que no 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 está a Imunofluorescência Indireta (IFI), 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 a impossibilidade de identificação da fase da doença. Na verdade, a presença de títulos de anticorpos apenas significa contato prévio com o agente (IQBAL & 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).

O problema em comum dos testes sorológicos é que eles não possibilitam diferenciar a manutenção da resposta imune de uma re-exposição ao agente; além disso, são observadas reações cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* (BARTSCH & GREENE, 1996; WEN et al., 1997; MUTANI & KAMINJOLO, 2001).

Entre os métodos de diagnóstico direto, incluem-se a cultura celular *in vitro* e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Na cultura celular tradicional, os leucócitos do indivíduo são isolados e mantidos em meio próprio com linhagem

celular específica, onde *Ehrlichia* se prolifera (IQBAL & RIKIHISA, 1994a). Técnicas recentes de cultivo celular utilizam apenas soro estéril e dispensam as linhagens celulares específicas para o crescimento. Em ambas, é possível localizar as mórulas com maior facilidade, devido a sua maior quantidade, em comparação ao esfregaço sanguíneo convencional (MUTANI & KAMINJOLO, 2001).

A cultura celular *in vitro* é considerada 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 & KAMINJOLO, 2001). Contudo, ainda se trata de um método relativamente demorado, caro, exigente e que isolado não revela a espécie de *Ehrlichia* (WEN et al., 1997; MUTANI & KAMINJOLO, 2001).

Devido a essas desvantagens fez-se necessário buscar um método diagnóstico sensível, específico, menos complicado e que também detecte diretamente a bactéria. Dessa necessidade surgiram as primeiras PCR para detecção de *E. canis* (IQBAL et al., 1994; IQBAL & 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 seqüenciais 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 seqüência gênica do 16S RNA ribossomal e outro par diferencia a espécie, amplificando um segmento interno específico localizado dentro da primeira porção amplificada. Por isso, também é considerado um método muito sensível e específico (IQBAL & RIKIHISA, 1994a; WEN et al., 1997). A PCR pode ser aplicada tanto em amostras de sangue como de tecidos (IQBAL & RIKIHISA, 1994a; HARRUS et al., 1998a).

O prognóstico na fase aguda é geralmente favorável, pois com a antibioticoterapia ocorre melhora clínica em cerca de um a dois dias. Na fase subclínica, o prognóstico vai de favorável a reservado conforme a sintomatologia do animal e sua predisposição individual de entrar ou não na fase crônica. Nesta última, o prognóstico é desfavorável, principalmente quando se instalou hipoplasia arregenerativa na medula óssea (GREENE & HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997).

## **1.6 TERAPÊUTICA**

Os derivados da tetraciclina são considerados o tratamento de eleição para erlichiose há muitos anos (HUXSOLL et al., 1970). Atualmente, o consenso sugere o uso da doxiciclina na dosagem de 10 mg/kg VO uma vez ao dia durante 28 dias (NEER et al., 2002). A doxiciclina é uma tetraciclina lipossolúvel bastante eficiente, pois os animais geralmente apresentam melhora clínica dentro de três dias (SAINZ, 1996). Ela também é a droga de eleição no caso de filhotes ou animais com nefropatia (COHN, 2003).

O tratamento com dipropionato de imidocarb também se mostrou efetivo na eliminação de *E. canis* (PRICE & 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) ou utilizado isoladamente (SAINZ, 1996; EDDLESTONE et al., 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 enrofloxacina, cloranfenicol, penicilinas e sulfonamidas. Eles melhoraram o quadro clínico, mas não foram capazes de eliminar *Ehrlichia* (BREITSCHWERDT et al., 1998; COHN, 2003). Certas vezes, pode ser necessário instituir terapia de apoio com fluídos, transfusão sanguínea, vitaminas, corticóides ou esteróides anabólicos (COHN, 2003).

### **1.7 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO**

Devido à falta de imunidade protetora e latência de *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 & RIKIHISA, 1994b). Existem 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 & RIKIHISA, 1994b; BREITSCHWERDT, 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 & 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 ou 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 & 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 menor custo (IQBAL & 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 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 & RIKIHISA, 1994a).

## **1.8 PROFILAXIA**

A profilaxia deve ser focada no controle efetivo dos carrapatos. Quando animais de áreas endêmicas forem transportados para áreas livres, estes devem ser testados e se necessário tratados anteriormente (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 & HARVEY, 1990), ou ainda 100 mg de doxiciclina uma vez ao dia (DAVOUST et al., 2005).

Desde a sua identificação, há cerca de 70 anos, a erlichiose tornou-se uma das doenças infecciosas de importância mundial na clínica veterinária de pequenos animais devido a sua alta prevalência e morbidade. A utilização da doxiciclina no tratamento da erlichiose é consensual tanto entre pesquisadores quanto entre

práticos, e sua associação ao dipropionato de imidocarb tem sido amplamente empregada apesar dos resultados conflitantes encontrados na literatura. Este trabalho tem o intuito de verificar e esclarecer se há vantagens em associar o dipropionato de imidocarb à doxiciclina no tratamento de cães naturalmente infectados pela *E. canis* do ponto de vista clínico, hematológico e da eliminação terapêutica.

## REFERÊNCIAS

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. **J Vet Intern Med**, v.10, n.4, p.271-274, 1996.

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 Chemother**, 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. **Vet Res**, 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. **Vet Parasitol**, n.119, p.73-86, 2004.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Vet Clin Small Anim**, n.33, p.863-884, 2003.

COSTA, J. O., SILVA, M., GUIMARÃES, M. P., BATISTA JUNIOR, J. A. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte-Brasil. **Arq Esc Vet**, 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. **Vet Microbiol**, 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. **J Clin Microbiol**, v.29, n.12, p.2741-2745, 1991.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. **Bull Soc Pathol Exot**, 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*. **Int J Syst Evol Microbiol**, n.51, p.2145-2165, 2001.

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

EWING, S. A. Canine ehrlichiosis. In: BRANDLY, C. A., CORNELIUS, C. E. **Adv Vet Sci Comp Med**. New York: Academic Press, 1969, v.13, p.331-353.

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

GROVES, M. G., DENNIS, G. L., AMYX, H. L., HUXSOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **Am J Vet Res**, 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*. **J Clin Microbiol**, 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. **J Clin Microbiol**, v.36, n.7, p.2140-2142, 1998b.

HUXSOLL, D. L., HILDEBRANDT, P. K., NIMS, R. M., WALJKER, J. S. Tropical canine pancytopenia. **J Am Vet Med Assoc**, v.157, n.11, p.1627-1632, 1970.

IQBAL, Z., CHAICHANASIRIWITHAYA, W., RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J Clin Microbiol**, 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. **Vet Microbiol**, 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. **J Clin Microbiol**, v.32, n.7, p.1644-1649, 1994b.

KUEHN, N. F., GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **J Am Vet Med Assoc**, 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. **Vet Ther**, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

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. **J S Afr Vet Assoc**, 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* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **J Bacteriol**, 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*. **Rev Soc Bras Med Trop**, 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. **J Vet Intern Med**, 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 shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **Am J Vet Res**, v.41, n.2, p.250-254, 1980.

PRICE, J. E., DOLAN, T. T. A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. **Vet Rec**, n.107, p.275-277, 1980.

REINE, N. J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clin Tech Small Anim Pract**, v.19, n.2, p.68-74, 2004.

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

RIKIHISA, Y. New taxonomy of the family *Anaplasmataceae* and phylogram of the family *Anaplasmataceae*. <http://riki-lb1.vet.ohio-state.edu/ehrlichia/background.php>. On-line, acesso em 07/09/2006.

SAINZ, A. Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb. Universidad Complutense de Madrid. **Tese de Doutorado**. 255p. Madrid, 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. **Infect Immun**, 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. **Rev Cienc Agroveter**, v.3, n.2, p.126-130, 2004.

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*. **Vet Immunol Immunopathol**, n.77, p.145-150, 2000.

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. **J Clin Microbiol**, v.35, n.7, p.1852-1855, 1997.

### **3 ARTIGO**

**Eficácia da doxiciclina e da combinação com o dipropionato de imidocarb no  
tratamento de *Ehrlichia canis* em cães**

Efficacy of doxycycline and combination with imidocarb dipropionate in the treatment  
of *Ehrlichia canis* in dogs

**Thatianna Camillo PEDROSO<sup>1</sup>, Flávio Ribeiro de ARAÚJO<sup>2</sup>, Veronica Jorge  
BABO-TERRA<sup>3</sup>**

**RESUMO**

Os objetivos deste trabalho foram comparar a eficácia do tratamento isolado com doxiciclina e da combinação do dipropionato de imidocarb com doxiciclina em cães naturalmente infectados por *E. canis*, verificando se há vantagens ou não no tratamento combinado; certificar a necessidade de tratamento em cães assintomáticos e ainda acompanhar a evolução clínico-hematológica dos animais durante os tratamentos isolado e combinado. Quinze cães diagnosticados para *E. canis* por meio de observação de mórulas em células de esfregaço sanguíneo foram distribuídos em três grupos, sem tratamento (C), tratamento com doxiciclina 10 mg/kg via oral uma vez ao dia por 28 dias (D) e doxiciclina combinada ao dipropionato de imidocarb (I), em duas injeções de 5 mg/kg subcutânea com intervalo de 14 dias. Foram realizados exames físico e hematológico semanalmente. A *nested* PCR para *E. canis* foi realizada antes e após o tratamento. Verificou-se que os tratamentos foram eficientes, resolveram os sinais clínicos em poucos dias e promoveram a recuperação hematológica em cerca de 70% dos cães. No entanto,

---

<sup>1</sup> Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Rua das Garças, n. 1666, apartamento 22, bloco B16, CEP 79020-180, Campo Grande, MS. E-mail: [thatyvet@yahoo.com.br](mailto:thatyvet@yahoo.com.br). Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Pesquisador Doutor, Embrapa Gado de Corte.

<sup>3</sup> Médica Veterinária, Professora Adjunto 1 Doutora, Departamento de Medicina Veterinária UFMS.

não foi observada diferença entre os tratamentos. A eliminação de *E. canis* foi observada por *nested* PCR de sangue total em 70% dos cães tratados.

Palavras-chave: Doxiciclina - Dipropionato de imidocarb - *Ehrlichia canis* - PCR -  
Cães.

### **ABSTRACT**

The aims of this study were to evaluate the efficacy of doxycycline alone and of the combination of imidocarb dipropionate with doxycycline in the treatment of dogs naturally infected with *E. canis*; to analyse if there are advantages in using the association of imidocarb dipropionate and doxycycline in the treatment of *E. canis* infection; to reassure the need of treatment in assymptomatic infected dogs and also to observe the clinical and hematological recovery of the animals during both treatment protocols. Fifteen dogs suspected of *E. canis* infection were diagnosed through direct visualization of morulae in blood smear cells. They were divided in three groups: (C) without treatment; (D) treated with doxycycline 10 mg/kg orally once a day for 28 days and (I), with doxycycline associated with imidocarb dipropionate, in two subcutaneously injections of 5 mg/kg 14 days apart. The animals were submitted to physical and hematologic exams weekly. Nested PCR to detect *E. canis* were performed before and after treatment. We could assume that both treatments were effective and lead to the resolution of clinical signs in a few days and also promoted the hematological recovery in 70% of the dogs. There were no differences between treatments. The elimination of *E. canis* could be suggested by whole blood nested PCR in 70% of the treated dogs.

Key-words: Doxycycline - Imidocarb Dipropionate - *Ehrlichia canis* - PCR - Dogs.

## INTRODUÇÃO

*Ehrlichia canis* é a bactéria responsável pela erlichiose monocítica canina. Descrita primeiramente na Algéria (Donatien & Lestoquard 1935), hoje se encontra mundialmente distribuída, com maior prevalência nas áreas tropicais e subtropicais devido à presença de seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Harrus et al. 1997a, Cohn 2003). No Brasil, encontram-se casos em todo território nacional (Labarthe et al. 2003).

O período de incubação varia de oito a vinte dias e podem ser distintas três fases da doença (Greene & Harvey 1990, Harrus et al. 1997a). Na fase aguda, os sinais clínicos incluem febre, depressão, anorexia, perda de peso, mucosas pálidas, corrimento oculonasal e linfadenopatia (Cohn 2003, Castro et al. 2004). Carrapatos são freqüentemente encontrados (Greene & Harvey 1990, Harrus et al. 1997a). As alterações laboratoriais desta fase englobam trombocitopenia associada ao aumento do número de macroplaquetas (Smith et al. 1975); anemia, regenerativa ou arregenerativa e contagens leucocitárias diversas. Leucocitose, monocitose e presença das mórulas são consideradas características (Greene & Harvey 1990, Harrus et al. 1997a). Na fase subclínica, muitos animais tornam-se assintomáticos, permanecendo, entretanto portadores (Huxsoll et al. 1970). Os achados laboratoriais incluem trombocitopenia, anemia, leucopenia variável, hiperglobulinemia progressiva e proteinúria (Harrus et al. 1998a). Na fase crônica, emagrecimento progressivo, depressão, mucosas pálidas, sensibilidade abdominal e tendência a hemorragias são as principais manifestações clínicas (Greene & Harvey 1990, Harrus et al.

1997a). Frequentemente são observadas co-infecções, especialmente com outros patógenos transmitidos por artrópodes, tais como *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys* e *Mycoplasma haemocanis* (Ewing 1969, Kuehn & Gaunt 1985, Moreira et al. 2003). A pancitopenia é o achado mais característico da fase crônica (Harrus et al. 1997a, Cohn 2003).

A observação das mórulas confirma a presença de *E. canis*, podendo ser vista em monócitos, linfócitos (Ewing 1969, Kuehn & Gaunt 1985, Elias 1991) e neutrófilos (Ewing 1969, Huxsoll et al. 1970). Além da observação da mórula em esfregaço sanguíneo é possível diagnosticar a erlichiose por métodos sorológicos, cultivo celular e pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). A PCR é um método muito sensível e específico, que pode ser aplicado em amostras de sangue e tecidos (Iqbal & Rikihisa 1994a, Wen et al. 1997, Harrus et al. 1998a, Harrus et al. 2004).

Para o tratamento, o consenso atual sugere o uso da doxiciclina na dosagem de 10 mg/kg via oral (VO) uma vez ao dia durante 28 dias (Sainz 1996, Neer et al. 2002). O tratamento com dipropionato de imidocarb ainda é controverso, sendo recomendado por alguns autores, em duas doses de 5 mg/kg por via intramuscular (IM) ou subcutânea (SC) com intervalo de 14 dias (Price & Dolan 1980, Matthewman et al. 1994, Sainz 1996) e não recomendado por outros (Sousa et al. 2004, Eddlestone et al. 2006).

Os objetivos deste trabalho foram comparar a eficácia do tratamento isolado com doxiciclina e da combinação do dipropionato de imidocarb com doxiciclina em cães naturalmente infectados por *E. canis*; verificar se há vantagens ou não no tratamento combinado; certificar a necessidade de tratamento em cães assintomáticos e ainda acompanhar a evolução clínico-hematológica dos animais durante os tratamentos isolado e combinado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

No período de novembro de 2005 a junho de 2006, cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Campo Grande/MS, foram diagnosticados para erlichiose monocítica canina pela observação de mórulas em monócitos ou linfócitos de esfregaços sanguíneos. Foram realizados esfregaços pareados de ponta de orelha, sendo um corado pelo método de May-Grünwald-Giemsa e outro com Panótico. Em cada lâmina, examinou-se a extensão das duas margens do esfregaço bem como pelo menos dez campos na franja.

Não houve restrição quanto ao sexo, raça, idade ou peso do animal. Animais com infecção concomitante por outros hemoparasitos, como *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys* e *Leishmania* sp., foram excluídos. Quinze animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos: controle (C, n=5), tratamento com doxiciclina (D, n=5) e tratamento combinado de doxiciclina e dipropionato de imidocarb (I, n=5).

Todos os animais receberam água e ração comercial seca à vontade e foram submetidos a controle de ectoparasitos com Frontline® top spot (fipronil, Merial Saúde Animal) e endoparasitos com Endal Plus® (pamoato de pirantel, febantel e praziquantel, Schering-Plough Coopers). Os animais dos grupos de tratamento receberam Doxifin® comprimidos (doxiciclina, Ouro Fino), 10 mg/kg VO a cada 24 horas durante 28 dias e Imizol® (dipropionato de imidocarb, Schering-Plough Coopers), duas injeções de 5mg/kg SC com intervalo de 14 dias. Nenhum outro antibiótico ou tratamento de suporte foi administrado.

A respeito desses animais, foram registrados dados sobre identificação, informações epidemiológicas, manifestações clínicas e o quadro hematológico. Os animais foram reavaliados a cada sete dias após o início do tratamento, considerado dia zero. Nas reavaliações, realizou-se novo exame físico e uma amostra de sangue com EDTA foi coletada para realização de hemograma, num total de cinco coletas. Amostras de sangue foram obtidas para plaquetometria no dia 0, aos 14 dias e no último dia de tratamento, conforme o grupo.

Para a *nested* PCR, foram coletadas duas amostras de sangue com EDTA, uma antes do tratamento para confirmação da presença de *E. canis*, outra após o tratamento, a fim de demonstrar a eliminação terapêutica do microorganismo. No caso de tratamento somente com doxiciclina, a segunda amostra foi obtida dois dias após o término do tratamento e no caso de combinação com o dipropionato de imidocarb, esta foi obtida trinta dias após a última injeção. Estes intervalos foram determinados com o objetivo de diminuir a interferência do efeito residual de cada droga, aproximadamente 19,5 horas para doxiciclina (Iqbal & Rikihisa 1994b) e 30 dias para o dipropionato de imidocarb (Price & Dolan 1980).

Para extração do DNA foram utilizados 350 µl de sangue e o *kit Easy-DNA*<sup>TM</sup> (Invitrogen Corporation), 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 de agarose 0,8% com o marcador lâmbda (λ) 50 (Invitrogen Corporation). Para amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA de *E.canis* foi seguida a metodologia de Wen et al. (1997) com algumas alterações. 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 de 0,25 mM de trifosfato deoxinucleotídeos, 2,5 U de *Taq* polimerase, 100 ng do *primer* ECC (5'-

AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'), 100 ng do *primer* ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3') e 17,7 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura. A PCR foi realizada a 94°C por 5 minutos e então 40 ciclos de 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* HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') e 100 ng do *primer* ECAN-5 (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-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 de agarose 0,8%, após eletroforese. Os géis foram corados em brometo de etídeo e fotografados com iluminação UV em sistema Alpha Digidoch. Para verificar a existência de associação entre os tratamentos e os resultados observados na PCR pós-tratamento foi utilizado o teste Exato de Fisher, com nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## RESULTADOS

Os sinais clínicos observados inicialmente nos três grupos incluíram febre, perda de peso, mucosas pálidas, linfadenopatia, secreção ocular, tosse e outros (Tab. 1). No primeiro exame físico foram encontrados carrapatos em três animais pertencentes ao grupo D, em todos do grupo I e em três do grupo C; posteriormente não foram observados carrapatos devido ao controle de ectoparasitos.

Nos animais pertencentes aos grupos D e I, grande parte dos sinais clínicos se resolveu rapidamente, em questão de dias ou no máximo uma semana. No pós-tratamento, apenas o cão D-05 ainda apresentava mucosas hipocoradas; este

mesmo animal possuía alterações hematológicas e manifestava sinais clínicos compatíveis com cinomose. Indícios de cinomose também foram observados em um animal do grupo I (I-01) após o tratamento. Os animais pertencentes ao grupo C apresentaram agravamento do quadro clínico ao longo do período de observação (28 dias), com exceção do C-04 que se manteve assintomático e também não apresentou qualquer alteração hematológica.

As alterações hematológicas mais freqüentes nos três grupos foram anemia e trombocitopenia (Tab. 2). No grupo D, todos os cães apresentavam anemia no momento do diagnóstico; no final do período, três haviam se recuperado da anemia e um apresentava policromatofilia. O animal D-01 já se encontrava dentro dos valores de referência ( $5,5$  a  $8,5 \times 10^6$  hemácias / $\text{mm}^3$ ) no dia 7, enquanto os cães D-03 e D-04 tiveram os valores normalizados a partir do dia 21. No grupo I, apenas dois cães apresentavam anemia. Apenas o cão I-03 manteve-se anêmico até o final do tratamento, mas também apresentava policromatofilia e metarrubrócitos. No grupo C, as alterações se mantiveram ou se agravaram, com exceção do animal C-04 que se manteve estável e dentro da faixa de normalidade para a espécie canina durante todo o experimento. Neste grupo, foi observada policromatofilia em três animais e presença de metarrubrócitos em um cão ao final do período. A anemia normocítica normocrômica prevaleceu em todos os grupos, sendo que apenas o cão D-04 apresentou anemia hipocrômica em uma das avaliações intermediárias.

Em relação à trombocitopenia, dos quatro cães com trombocitopenia inicial no grupo D, dois se recuperaram, um a partir do dia 14 e outro apenas na última avaliação. Já no grupo I, três dos quatro cães com trombocitopenia se recuperaram, todos a partir do dia 14. Três animais (D-02, D-05 e I-03) chegaram ao final do tratamento sem normalizar a plaquetometria. No grupo C, dois animais

apresentavam trombocitopenia na primeira avaliação, mas no final do período, apenas o animal C-04 não se encontrava trombocitopênico. Nos quinze cães, foi freqüente a observação de macroplaquetas por todo o período de avaliação.

Dois animais do grupo D iniciaram o tratamento com leucopenia. Um normalizou a partir do dia 7 e outro somente no dia 30. Não foi observada leucocitose inicial em nenhum cão, porém os cães D-02 e D-04 apresentaram aumento da leucometria no decorrer do tratamento, regularizando os valores de leucócitos totais na última avaliação. No grupo I, a leucocitose não foi observada em nenhum momento. A leucopenia esteve presente em dois animais no dia 0 (I-03 e I-05), o cão I-05 apresentou valores normais a partir do dia 7, já o cão I-03 não se recuperou dentro do período de avaliação. No grupo C, apenas o cão C-02 apresentou leucocitose inicial, entrando na faixa de normalidade a partir do dia 14; o oposto aconteceu com o cão C-05. Nenhum animal deste grupo apresentou leucopenia.

Entre as alterações de contagem diferencial de leucócitos, monocitose e linfopenia foram as mais freqüentes (Tab. 2). Monocitose foi observada inicialmente em apenas um animal do grupo D (D-03), que apresentou valores normais a partir do dia 21. Os cães D-02 e D-05 apresentaram monocitose nas avaliações intermediárias, mas chegaram ao final do tratamento exibindo valores normais. No grupo I, também se observou monocitose inicial em apenas um cão (I-01), que normalizou a partir do dia 14. No grupo C, quatro cães apresentaram monocitose inicial. No final do período, dois cães mantiveram a monocitose, dois apresentaram valores normais (150 -1.350 monócitos), mas próximos do limite superior, e aquele que não tinha monocitose inicial, finalmente apresentou aumento do número de monócitos.

Foi observada linfopenia inicial em três animais do grupo D. Todos se recuperaram, mas o tempo variou individualmente, sendo o cão D-01 no dia 7, D-04 no dia 30 e D-05 no dia 14. No grupo I, apenas o cão I-05 apresentava linfopenia inicial e não se recuperou dentro do período de avaliação. O animal I-03, o mesmo que não se recuperou da leucopenia, começou a apresentar linfopenia a partir do dia 14 e a manteve até a última observação. Todos os cães do grupo C apresentaram contagem normal de linfócitos (1.000 a 4.800 linfócitos) inicialmente, mas ao final do tratamento, os cães C-02 e C-05 apresentavam linfopenia.

A presença de monócitos ativados e linfócitos reacionais foi freqüente nos três grupos (Fig. 1). Essas alterações persistiram nos animais do grupo C e se resolveram nos animais tratados, com exceção do animal D-05 que chegou ao final do tratamento apresentando inclusive mórulas de *E. canis*.

Todos os animais apresentavam mórula no início do período. Em catorze animais, a mórula foi observada em monócitos e apenas um em linfócitos; não foram observadas mórulas em outros leucócitos ou em plaquetas. Ao final do período, apenas os cães D-05, C-02 e C-03 ainda apresentavam mórulas.

Na *nested* PCR pré-tratamento, os quinze cães foram positivos (Fig. 2, 3 e 4). No pós-tratamento, dois cães do grupo D (D-04 e D-05) foram positivos (Fig. 2), ou seja, 60% dos cães tornaram-se negativos na *nested* PCR após o tratamento. No grupo I, apenas o cão I-01 apresentou resultado positivo na amostra de sangue pós-tratamento (Fig. 3), isto é, 80% tornaram-se negativos. No grupo C, os cinco cães mantiveram as reações positivas (Fig. 4).

A eliminação terapêutica foi considerada eficaz quando o cão apresentou resultado negativo na *nested* PCR de sangue pós-tratamento. Houve associação estatística entre as freqüências de eliminação terapêutica nos grupos de tratamento

quando comparadas ao grupo C ( $P=0,018$ ). Entre os grupos de tratamento, D e I, não foi encontrada diferença estatística ( $P=0,41$ ).

## **DISCUSSÃO**

Os sinais clínicos observados nos cães dos três grupos foram semelhantes aos descritos na literatura para erlichiose monocítica canina (Kuehn & Gaunt 1985, Harrus et al. 1997b, Moreira et al. 2003). A presença de carrapatos observada no dia 0 (Harrus et al. 1997a), o diagnóstico realizado pela observação de mórulas (Elias 1991) e os sinais clínicos observados (Greene & Harvey 1990, Harrus et al. 1997a) sugerem que os animais estavam na fase aguda da erlichiose.

O tempo de resposta clínica à terapia sofre interferência da fase da doença (Buhles et al. 1974, Harrus et al. 1998b), sendo mais rápida na fase aguda e mais demorada na fase crônica. Supondo que os animais estudados encontravam-se na fase aguda, a resposta ao tratamento ocorreu conforme esperado (Buhles et al. 1974, Greene & Harvey 1990), dentro de sete dias, intervalo existente entre a primeira e segunda avaliação.

Animais sem tratamento geralmente passam pela fase aguda e adentram a fase subclínica como clinicamente saudáveis (Greene & Harvey 1990, Harrus et al. 1997a), podendo se manter assim por longos períodos (Harrus et al. 1998a). Esse poderia ser o caso do animal C-04. Cães clinicamente sadios que permanecem infectados podem servir de hospedeiros, ser inadvertidamente utilizados como doadores de sangue ou mesmo vir a manifestar sintomas apenas na fase crônica, quando o tratamento é geralmente mais complicado e o prognóstico desfavorável (Harrus et al. 1998a).

Os animais D-05 e I-01 chegaram ao final do período de observação manifestando sinais clínicos compatíveis com cinomose. Devido à sua procedência, isto é, CCZ, possivelmente estes animais já estivessem infectados pelo vírus e isso pode ter interferido nos resultados observados nestes cães, pois ambos foram positivos na *nested* PCR pós-tratamento.

A observação de anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia acompanhada do aumento do número de macroplaquetas, como aconteceu neste estudo, são amplamente citadas na erlichiose (Smith et al. 1975, Kuehn & Gaunt 1985, Harrus et al. 1997a, Harrus et al. 1997b). A progressão dessas alterações em animais sem tratamento ocorreu conforme citado (Greene & Harvey 1990, Harrus et al. 1997a), assim como a recuperação hematológica dos animais tratados (Sainz 1996, Neer et al. 2002).

A plaquetometria é considerada um bom indicador da eficiência da terapia contra *E. canis*, de modo que a normalização geralmente ocorre dentro de quatorze dias (Harrus et al. 1998a, Neer et al. 2002). No entanto, os resultados dos animais avaliados nos grupos de tratamento não permitem corroborar completamente tal afirmação, pois três animais (D-02, D-05 e I-03) chegaram ao final do tratamento sem normalizar a contagem de plaquetas. O cão I-03 também chegou ao final do período apresentando linfopenia. Apesar das contagens celulares diminuídas, este cão apresentava-se clinicamente sadio ao final do período e seu resultado na *nested* PCR pós-tratamento foi negativo. Segundo Greene & Harvey (1990), a regeneração da medula óssea pode demorar até 120 dias após o tratamento a despeito da melhora clínica e do *clearence* da infecção.

A leucocitose é considerada característica na fase aguda da erlichiose (Greene & Harvey 1990), no entanto, ela foi observada em apenas dois animais do

grupo C. A leucopenia, geralmente associada à fase crônica (Greene & Harvey 1990, Harrus et al. 1997a), mas já descrita na fase aguda (Castro et al. 2004) foi observada em dois cães do grupo D e dois do grupo I. Em estudos que utilizam cães em condições naturais de infecção, assim 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, como aconteceu com os cães que também desenvolveram sinais compatíveis com cinomose.

Monocitose é freqüentemente descrita na erlichiose (Kuehn & Gaunt 1985, Harrus et al. 1997b), geralmente relacionada à fase aguda (Greene & 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). Entre os animais tratados que iniciaram o experimento com monocitose, um apresentou valores normais a partir do dia 14 e outro a partir do dia 21. Em animais sem tratamento, observou-se que estes também apresentaram valores normais na contagem de monócitos após algumas semanas, mas parecia haver uma tendência a se manterem próximos do limite superior.

As alterações morfológicas observadas, linfócitos reacionais e monócitos ativados, não são diretamente citadas na literatura, mas possivelmente estejam relacionadas à patogênese de *E. canis* que se multiplica no sistema monocítico fagocitário e induz ampla produção de anticorpos, levando à vacuolização dos monócitos e reatividade dos linfócitos, respectivamente.

A observação das mórulas principalmente em monócitos e apenas em linfócitos de um animal está de acordo com vários autores (Ewing 1969, Greene &

Harvey 1990, Moreira et al. 2003) e em desacordo com Elias (1991), que cita os linfócitos como as células mais infectadas.

O animal D-05 ainda apresentava mórulas na última avaliação, por isso era esperado que tivesse um resultado positivo na *nested* PCR pós-tratamento. Devido ao controle de ectoparasitos, foi descartada a hipótese deste cão ter sido re-infectado durante o período de avaliação. É possível que este cão não estivesse na fase aguda como inicialmente supôs-se e sua resposta ao tratamento fosse mais demorada, pois animais na fase aguda geralmente se recuperam mais rapidamente que aqueles na fase crônica (Cohn 2003).

Neste estudo, empregou-se a *nested* PCR em amostras de sangue obtidas antes e após o tratamento devido à aplicabilidade deste método de coleta e sua praticidade na rotina da clínica veterinária de pequenos animais em relação à coleta de amostras do baço. Alguns autores 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. Contudo, os próprios autores afirmam que a alta sensibilidade da PCR torna as duas formas de amostragem semelhantes (Harrus et al. 2004).

Neste trabalho, o tratamento isolado com doxiciclina, administrada na dosagem do consenso atual de 10 mg/kg VO uma vez ao dia durante 28 dias (Neer et al. 2002), tornou 3 dos 5 cães do grupo D negativos na *nested* PCR pós-tratamento. Estudos prévios contradizem-se quanto à capacidade da doxiciclina em eliminar *E. canis*. Utilizando esta mesma dosagem por 7 dias apenas, a doxiciclina foi considerada ineficiente (Iqbal & Rikihisa 1994b). No entanto, quando o período de tratamento foi dobrado, a droga mostrou-se eficiente (Breitschwerdt et al. 1998). Pesquisas posteriores apontaram que o tratamento na fase aguda poderia ser

reduzido para 16 dias (Harrus et al. 2004). Contudo, dificilmente identifica-se em que fase um cão naturalmente infectado se encontra (Moreira et al. 2003).

No grupo I, que recebeu doxiciclina e dipropionato de imidocarb, em duas injeções de 5 mg/kg SC com intervalo de 14 dias, 4 dos 5 cães tornaram-se negativos na *nested* PCR. Estudos prévios com o dipropionato de imidocarb julgaram-no eficiente no tratamento da erlichiose (Price & Dolan 1980, Matthewman et al. 1994). Posteriormente, verificou-se que não havia diferenças entre o tratamento isolado com doxiciclina ou associado ao dipropionato de imidocarb (Sainz 1996, Sousa et al. 2004). Todavia, esses estudos não utilizaram métodos moleculares para avaliação da eliminação terapêutica. Em uma pesquisa recente, utilizando a PCR, constatou-se que o dipropionato de imidocarb não é capaz de eliminar *E. canis* (Eddlestone et al. 2006). Isso permite sugerir que os cães do presente estudo que receberam tratamento combinado de doxiciclina e imidocarb, provavelmente eliminaram a infecção devido à ação da doxiciclina apenas.

Ao se comparar os resultados da *nested* PCR pós-tratamento obtidos nos grupos D e I não foi encontrada diferença significativa, assim como aconteceu quando se compararam parâmetros clínicos e hematológicos em outros trabalhos (Sainz 1996, Sousa et al. 2004). Assim, a combinação da doxiciclina ao dipropionato de imidocarb não demonstrou vantagens no tratamento da erlichiose nos cães deste estudo. Sugere-se que sua utilização seja restrita aos casos de infecção concomitante por *Babesia canis* devido à sua toxicidade e a freqüência com que são observadas reações adversas, como dor ou edema local, claudicação, salivação profusa, descarga ocular serosa, diarreia e depressão (Price & Dolan 1980).

A dor no local de administração do dipropionato de imidocarb foi freqüente entre os cães do grupo I, porém raros efeitos colaterais foram observados. Apenas o

animal I-05 apresentou salivacão excessiva após as injeções. Além da dor local, os efeitos colinérgicos, tais como salivacão excessiva, secreção ocular, diarreia e depressão são comuns após a utilização desta droga (Price & Dolan 1980), por isso recomenda-se que o animal seja observado por cerca de dez a quinze minutos após a injeção ou que se controle tais sinais com a administração prévia de sulfato de atropina na dose de 0,04 mg/kg (Matthewman et al. 1994, Neer et al. 2002).

Apesar de não terem sido apontadas diferenças entre os tratamentos dos grupos D e I, as diferenças entre tratar e não tratar foram notáveis, pois todos os cães sem tratamento permaneceram positivos, inclusive o cão C-04, que se manteve aparentemente sadio e sem alterações hematológicas. Sempre que diagnosticados para *E. canis*, os cães devem ser tratados, pois se evita agravamentos, o estado de portador crônico (Iqbal & Rikihisa 1994b, Harrus et al. 1998a) e que sejam utilizados inadvertidamente como doadores de sangue (Reine 2004).

Os resultados indicam que as drogas provavelmente foram eficientes na eliminação de *E. canis* do sangue de 70% dos cães. Contudo, os cães com resultados positivos pós-tratamento poderiam ainda apresentar o DNA da bactéria no sangue, porém esta se encontrar morta, já que é questionável a capacidade da PCR em diferenciar organismos vivos de mortos (Cohn 2003). Por outro lado, foi sugerido que pode haver parasitemia cíclica durante o período de recuperação do animal, o que exigiria avaliações repetidas com a PCR para garantir que se alcançou a eliminação terapêutica (Harrus et al. 1998b).

## CONCLUSÕES

Os dois tratamentos foram eficientes na eliminação de *E. canis* do sangue, pois 60% dos animais do grupo D e 80% dos cães do grupo I tornaram-se negativos na *nested* PCR após o período de tratamento. Estatisticamente, verificou-se que o dipropionato de imidocarb é dispensável no tratamento da erlichiose monocítica canina. A partir dos resultados, reafirmou-se a necessidade de tratamento a fim de eliminar cães portadores, pois os animais não tratados mantiveram-se positivos. A recuperação clínico-hematológica dos cães ocorreu independentemente da doxiciclina ter sido administrada isoladamente ou combinada ao dipropionato de imidocarb.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa de Mestrado. Ao Laboratório Ouro Fino, pelas medicações concedidas. Ao CCZ, pela cedência dos animais.

## REFERÊNCIAS

- Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI 1998. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Antimicrobial Agents Chemother* 42: 362-368.
- Buhles WC, Huxsoll DL, Ristic M 1974. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. *J Infect Dis* 130: 357-367.

- Castro MB, Machado RZ, Aquino LPCT, Alessi AC, Costa MT 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunological findings. *Vet Parasitol* 119: 73-86.
- Cohn LA 2003. Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin Small Anim* 33: 863-884.
- Donatien A, Lestoquard F 1935. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. *Bull Soc Pathol Exot* 28: 418-419.
- Eddlestone SM, Neer TM, Gaunt SD, Corstvet R, Gill A, Hosgood G, Hegarty B, Breitschwerdt EB 2006. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J Vet Intern Med* 4: 840-844.
- Elias E 1991. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *J Small Anim Pract* 33: 540-543.
- Ewing SA 1969. Canine ehrlichiosis. In CA Brandly, CE Cornelius, *Adv Vet Sci Comp Med*, Academic Press, New York, p. 331-353.
- Greene CE, Harvey JW 1990. Canine ehrlichiosis. In: CE Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, WB Saunders, Philadelphia, p. 545-561.
- Harrus S, Bark H, Waner T 1997a. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. *The Compendium* 19: 431-444.
- Harrus S, Kass PH, Klement E, Waner T 1997b. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet Rec* 141: 360-363.
- Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H 1998a. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 36: 73-76.

- Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Bark H 1998b. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *J Clin Microbiol* 36: 2140-2142.
- Harrus S, Kenny M, Miara L, Aizenberg I, Waner T, Shaw S 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrobial Agents Chemother* 48: 4488-4490.
- Huxsoll DL, Hildebrandt PK, Nims RM, Walker JS 1970. Tropical canine pancytopenia. *J Am Vet Med Assoc* 157: 1627-1632.
- Iqbal Z, Rikihiza Y 1994a. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. *Vet Microbiol* 42: 281-287.
- Iqbal Z, Rikihiza, Y 1994b. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *J Clin Microbiol* 32: 1644-1649.
- Kuehn NF, Gaunt SD 1985. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc* 186: 355-358.
- Labarthe N, de Campos Pereira M, Barbarini O, McKee W, Coimbra CA, Hoskins J 2003. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Vet Ther* 4: 67-75.
- Matthewman LA, Kelly PJ, Brouqui P, Raoult D 1994. Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. *J S Afr Vet Assoc* 65: 104-107.
- Moreira SM, Bastos CV, Araújo RB, Santos M, Passos LMF. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 55: 141-147.

- Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR 2002. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *J Vet Intern Med* 16: 309-315.
- Price JE, Dolan TT 1980. A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. *Vet Rec* 107: 275-277.
- Reine NJ 2004. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. *Clin Tech Small Anim Pract* 19: 68-74.
- Sainz A 1996. Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb. Universidad Complutense de Madrid. *Tese de Doutorado*. Madrid, 255p.
- Smith RD, Ristic M, Huxsoll DL, Baylor RA 1975. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. *Infect Immun* 11: 1216-1221.
- Sousa MG, Higa AC, Gerardi DG, Tinucci-Costa M, Machado R 2004. Tratamento da erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. *Rev Cienc Agrovet* 3: 126-130.
- Wen B, Rikihiza Y, Mott JM, Greene R, Kim HY, Zhi N, Couto GC, Unver A, Bartsch R 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol* 35: 1852-1855.

## TABELAS

TABELA 3. Frequência absoluta e relativa das principais manifestações clínicas observadas antes e depois de cada tratamento em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*.

Sinal clínico	Grupo D (n=5)		Grupo I (n=5)		Grupo C (n=5)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Febre ( $T^{\circ} > 39,5$ )	03 (60%)	00	02 (40%)	00	01 (20%)	01 (20%)
Emagrecimento	04 (80%)	01 (20%)	01 (20%)	01 (20%)	02 (40%)	04 (80%)
Anorexia	02 (40%)	01 (20%)	01 (20%)	01 (20%)	00	02 (40%)
Apatia	03 (60%)	01 (20%)	01 (20%)	01 (20%)	00	00
Mucosas hipocoradas	02 (40%)	01 (20%)	04 (80%)	00	02 (40%)	04 (80%)
Linfadenopatia	03 (60%)	01 (20%)	05 (100%)	01 (20%)	02 (40%)	03 (60%)
Secreção ocular	02 (40%)	01 (20%)	02 (40%)	01 (20%)	01 (20%)	04 (80%)
Tosse	01 (20%)	00	00	00	00	03 (60%)
Outros sinais *	02 (40%)	02 (40%)	02 (40%)	01 (20%)	01(20%)	02 (40%)

Grupo D= doxiciclina; I= doxiciclina e dipropionato de imidocarb; C= controle.

\* Ataxia; descarga nasal; diarreia; epistaxe; fadiga pós-exercício; pústulas abdominais; respiração ruidosa.

TABELA 4. Frequência absoluta e relativa das principais alterações hematológicas observadas antes e depois de cada tratamento em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*.

Alteração hematológica	Grupo D (n=5)		Grupo I (n=5)		Grupo C (n=5)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Anemia ( $< 5,5 \times 10^6 /\text{mm}^3$ )	05 (100%)	02 (40%)	02 (40%)	01 (20%)	03 (60%)	04 (80%)
Trombocitopenia ( $< 2 \times 10^4 /\text{mm}^3$ )	04 (80%)	02 (40%)	04 (80%)	01 (20%)	02 (40%)	04 (80%)
Leucocitose ( $> 17 \times 10^3 /\text{mm}^3$ )	00	00	00	00	01 (20%)	01 (20%)
Leucopenia ( $< 6 \times 10^3 /\text{mm}^3$ )	02 (40%)	00	02 (40%)	01 (20%)	00	00
Neutrofilia ( $> 11.500$ )	00	00	00	00	01 (20%)	01 (20%)
Monocitose ( $> 1.350$ )	01 (20%)	00	01 (20%)	00	04 (80%)	03 (60%)
Linfopenia ( $< 1.000$ )	03 (60%)	00	01 (20%)	02 (40%)	00	02 (40%)
Presença de mórula	05 (100%)	01 (20%)	05 (100%)	00	05 (100%)	02 (40%)
Outras alterações *	05 (100%)	03 (60%)	05 (100%)	02 (40%)	05 (100%)	05 (100%)

Grupo D= doxiciclina; I= doxiciclina e dipropionato de imidocarb; C= controle.

\* Aglomerados leucocitários; anisocitose; basofilia citoplasmática; corpúsculos de Howell-Jolly; crenação; eritrofagocitose; granulação tóxica; linfócitos reacionais; macroplaquetas; metarrubrócitos; monócitos ativados; poiquilocitose; policromatofilia; rouleaux; vacuolização tóxica.

## FIGURAS

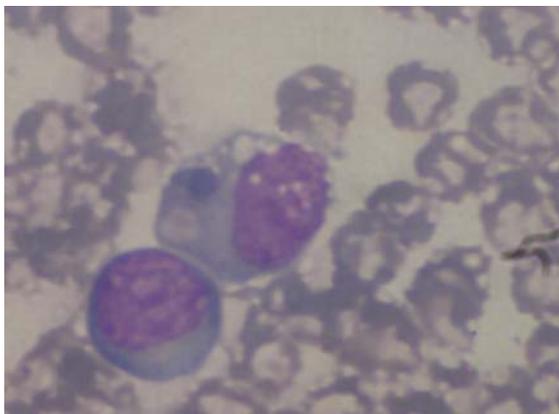


FIGURA 1. Mórula de *E. canis* em monócito apresentando vacuolizações citoplasmáticas (monócito ativado) e eritrofagocitose. Ao lado encontra-se um linfócito com citoplasma intensamente azulado (linfócito reacional).

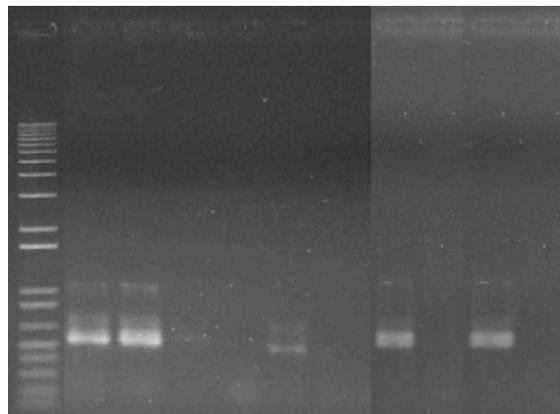


FIGURA 3. Resultados da PCR do grupo I, da esquerda para a direita: marcador Kb plus, I-01A, I-01P, I-02A, I-02P, I-03A, I-03P, I-04A, I-04P, I-05A, I-05P. A = antes do tratamento; P = pós=tratamento.

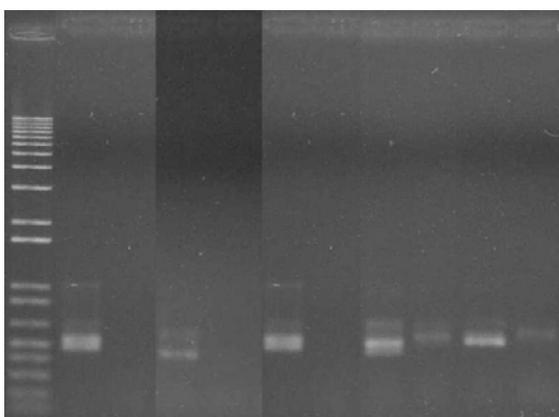


FIGURA 2. Resultados da PCR do grupo D, da esquerda para a direita: marcador Kb plus, D-01A, D-01P, D-02A, D-02P, D-03A, D-03P, D-04A, D-04P, D-05A, D-05P. A = antes do tratamento; P = pós=tratamento.

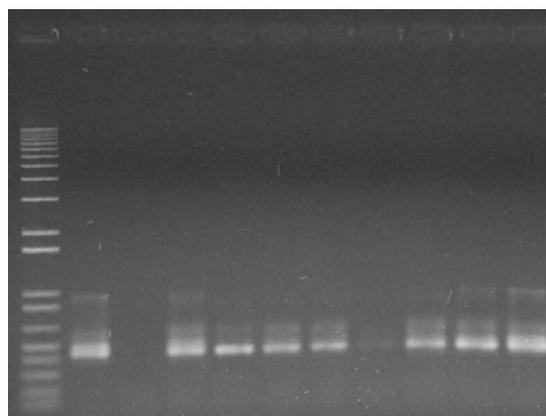


FIGURA 4. Resultados da PCR do grupo C, da esquerda para a direita: marcador Kb plus, controle positivo, controle negativo, C-02A, C-02P, C-03A, C-03P, C-04A, C-04P, C-05A, C-05P. A = antes do tratamento; P = pós=tratamento.

## APÊNDICE

TABELA 5. Valores individuais de temperatura retal em graus Celsius dos animais pertencentes aos três grupos de tratamento.

<b>CONTROLE</b>					
<b>Animal</b>	<b>C-01</b>	<b>C-02</b>	<b>C-03</b>	<b>C-04</b>	<b>C-05</b>
Dia 0	38,6	38,5	39,4	38,7	39,7
Dia 7	38,7	38,5	39,6	38,5	38,5
Dia 14	38,7	39,8	38,9	39,2	39,0
Dia 21	38,8	40,1	39,5	38,8	38,6
Dia 28	38,9	40,1	39,0	38,6	38,7
<b>DOXICICLINA</b>					
<b>Animal</b>	<b>D-01</b>	<b>D-02</b>	<b>D-03</b>	<b>D-04</b>	<b>D-05</b>
Dia 0	40,5	40,0	39,0	40,1	39,2
Dia 7	39,0	38,4	38,8	40,5	39,1
Dia 14	39,0	40,1	38,5	39,9	40,7
Dia 21	38,7	39,5	38,6	40,4	40,4
Dia 30	38,7	39,4	38,8	39,2	36,5
<b>DOXICICLINA e DIPROPIONATO DE IMIDOCARB</b>					
<b>Animal</b>	<b>I-01</b>	<b>I-02</b>	<b>I-03</b>	<b>I-04</b>	<b>I-05</b>
Dia 0	39,4	39,3	39,4	39,6	39,9
Dia 7	40,3	38,9	40,1	40,0	39,0
Dia 14	40,0	38,9	38,5	39,2	38,8
Dia 21	39,8	39,5	39,5	39,5	39,5
Dia 44	39,3	39,0	38,3	39,3	38,5

TABELA 6. Valores individuais de hemácias x 10<sup>6</sup> em milímetros cúbicos dos animais pertencentes aos três grupos de tratamento.

CONTROLE					
Animal	C-01	C-02	C-03	C-04	C-05
Dia 0	5.900.000	4.200.000	2.600.000	6.800.000	4.000.000
Dia 7	5.500.000	4.200.000	3.600.000	6.600.000	4.500.000
Dia 14	4.900.000	4.300.000	4.300.000	6.600.000	4.700.000
Dia 21	4.900.000	4.200.000	4.400.000	6.400.000	4.500.000
Dia 28	5.000.000	4.200.000	4.300.000	6.400.000	4.200.000
DOXICICLINA					
Animal	D-01	D-02	D-03	D-04	D-05
Dia 0	4.300.000	3.700.000	4.300.000	2.700.000	4.000.000
Dia 7	6.100.000	3.900.000	3.700.000	1.900.000	3.200.000
Dia 14	6.400.000	4.200.000	5.100.000	2.100.000	3.900.000
Dia 21	6.200.000	4.700.000	5.800.000	4.900.000	3.700.000
Dia 30	6.900.000	4.000.000	5.800.000	5.500.000	2.800.000
DOXICICLINA e DIDPROPIONATO DE IMIDOCARB					
Animal	I-01	I-02	I-03	I-04	I-05
Dia 0	5.500.000	5.500.000	5.300.000	7.900.000	4.400.000
Dia 7	5.000.000	5.100.000	4.800.000	5.800.000	6.300.000
Dia 14	5.600.000	6.300.000	4.000.000	5.500.000	4.300.000
Dia 21	6.000.000	5.000.000	3.600.000	5.000.000	4.000.000
Dia 44	6.200.000	5.500.000	4.100.000	5.600.000	5.700.000

Valores de referência: 5,5 a 8,5 x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>.

TABELA 7. Valores individuais de hematócrito em porcentagem dos animais pertencentes aos três grupos de tratamento.

CONTROLE					
Animal	C-01	C-02	C-03	C-04	C-05
Dia 0	42	32	18	47	29
Dia 7	38	32	27	47	33
Dia 14	34	30	31	47	35
Dia 21	32	30	29	45	32
Dia 28	36	30	32	45	32
DOXICICLINA					
Animal	D-01	D-02	D-03	D-04	D-05
Dia 0	32	26	32	20	29
Dia 7	44	27	27	14	21
Dia 14	47	30	36	16	27
Dia 21	45	32	40	37	26
Dia 30	50	28	42	44	21
DOXICICLINA e DIDPROPIONATO DE IMIDOCARB					
Animal	I-01	I-02	I-03	I-04	I-05
Dia 0	38	38	35	52	31
Dia 7	34	35	34	40	42
Dia 14	39	45	28	39	30
Dia 21	42	34	26	34	30
Dia 44	43	37	27	38	40

Valores de referência: 37 a 55%.

TABELA 8. Valores individuais de plaquetas em número por milímetro cúbico dos animais pertencentes aos três grupos de tratamento.

CONTROLE					
Animal	C-01	C-02	C-03	C-04	C-05
Dia 0	248.000	141.000	164.000	211.000	215.000
Dia 14	170.000	176.000	157.000	215.000	101.000
Dia 28	84.000	145.000	193.000	223.000	120.000
DOXICICLINA					
Animal	D-01	D-02	D-03	D-04	D-05
Dia 0	220.000	121.000	193.000	45.000	104.000
Dia 14	292.000	165.000	366.000	63.000	124.000
Dia 30	266.000	184.000	357.000	200.000	160.000
DOXICICLINA e DIDPROPIONATO DE IMIDOCARB					
Animal	I-01	I-02	I-03	I-04	I-05
Dia 0	197.000	180.000	97.000	200.000	175.000
Dia 14	210.000	221.000	113.000	287.000	204.000
Dia 44	250.000	270.000	154.000	277.000	209.000

Valores de referência: 2 a 5 x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>.

TABELA 9. Valores individuais de leucócitos totais em número por milímetro cúbico dos animais pertencentes aos três grupos de tratamento.

CONTROLE					
Animal	C-01	C-02	C-03	C-04	C-05
Dia 0	11.800	22.000	6.200	10.700	15.000
Dia 7	13.100	22.000	14.500	6.700	13.900
Dia 14	9.500	8.400	13.100	9.100	17.400
Dia 21	9.500	13.600	13.400	9.700	20.600
Dia 28	9.400	13.600	16.000	13.100	20.600
DOXICICLINA					
Animal	D-01	D-02	D-03	D-04	D-05
Dia 0	2.300	6.400	16.000	2.900	8.000
Dia 7	8.700	13.200	9.800	1.100	6.000
Dia 14	6.000	16.300	9.900	2.600	10.000
Dia 21	6.800	24.300	8.700	19.700	15.600
Dia 30	7.500	13.300	9.300	11.900	10.100
DOXICICLINA e DIDPROPIONATO DE IMIDOCARB					
Animal	I-01	I-02	I-03	I-04	I-05
Dia 0	15.800	8.700	5.400	8.200	3.900
Dia 7	5.100	7.900	6.200	6.300	6.200
Dia 14	5.700	8.300	1.900	6.500	9.400
Dia 21	5.900	10.100	4.500	7.800	6.700
Dia 44	6.400	9.600	5.200	12.000	7.700

Valores de referência: 6 a 17 x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>.

TABELA 10. Valores individuais de monócitos em número absoluto dos animais pertencentes aos três grupos de tratamento.

CONTROLE					
<b>Animal</b>	<b>C-01</b>	<b>C-02</b>	<b>C-03</b>	<b>C-04</b>	<b>C-05</b>
Dia 0	1.416	2.640	620	1.605	3.150
Dia 7	1.310	2.640	1.595	1.407	2.919
Dia 14	855	504	2.358	2.002	3.480
Dia 21	1.045	2.992	3.752	1.455	3.914
Dia 28	1.128	2.992	3.680	1.310	3.090
DOXICICLINA					
<b>Animal</b>	<b>D-01</b>	<b>D-02</b>	<b>D-03</b>	<b>D-04</b>	<b>D-05</b>
Dia 0	92	576	3.680	957	1.200
Dia 7	696	1.848	2.058	341	420
Dia 14	240	2.119	891	780	1.700
Dia 21	340	1.701	783	985	1.404
Dia 30	300	798	279	357	202
DOXICICLINA e DIDPROPIONATO DE IMIDOCARB					
<b>Animal</b>	<b>I-01</b>	<b>I-02</b>	<b>I-03</b>	<b>I-04</b>	<b>I-05</b>
Dia 0	1.580	1.131	540	1.148	624
Dia 7	918	553	806	315	496
Dia 14	342	474	38	390	282
Dia 21	649	606	135	234	469
Dia 44	704	576	156	360	539

Valores de referência: 150 a 1350.

TABELA 11. Valores individuais de linfócitos em número absoluto dos animais pertencentes aos três grupos de tratamento.

<b>CONTROLE</b>					
<b>Animal</b>	<b>C-01</b>	<b>C-02</b>	<b>C-03</b>	<b>C-04</b>	<b>C-05</b>
Dia 0	3.658	1.540	1.860	2.782	2.850
Dia 7	3.799	1.540	435	2.278	2.641
Dia 14	3.610	168	2.096	1.729	1.914
Dia 21	3.230	136	2.814	3.104	206
Dia 28	4.136	136	2.240	4.192	824
<b>DOXICICLINA</b>					
<b>Animal</b>	<b>D-01</b>	<b>D-02</b>	<b>D-03</b>	<b>D-04</b>	<b>D-05</b>
Dia 0	92	1.600	2.240	667	160
Dia 7	2.088	2.376	3.332	154	360
Dia 14	1.560	4.401	2.673	312	1.600
Dia 21	1.904	1.458	1.566	985	1.248
Dia 30	1.125	1.463	1.395	2.142	1.313
<b>DOXICICLINA e DIDPROPIONATO DE IMIDOCARB</b>					
<b>Animal</b>	<b>I-01</b>	<b>I-02</b>	<b>I-03</b>	<b>I-04</b>	<b>I-05</b>
Dia 0	3.318	2.088	2.430	3.854	819
Dia 7	1.377	2.054	2.728	1.512	1.488
Dia 14	513	4.316	266	1.560	376
Dia 21	1.180	3.232	540	1.170	134
Dia 44	1.280	2.976	728	2.520	308

Valores de referência: 1000 a 4800.

TABELA 12. Valores individuais de proteína plasmática total em gramas por decilitro dos animais pertencentes aos três grupos de tratamento.

CONTROLE					
Animal	C-01	C-02	C-03	C-04	C-05
Dia 0	9,8	7,0	5,6	8,6	5,4
Dia 7	8,8	7,0	5,4	8,4	5,0
Dia 14	9,4	7,4	4,8	8,2	3,2
Dia 21	9,6	6,8	5,0	7,6	3,2
Dia 28	10,2	6,8	5,6	7,8	4,0
DOXICICLINA					
Animal	D-01	D-02	D-03	D-04	D-05
Dia 0	6,4	5,2	5,6	5,8	6,0
Dia 7	7,6	5,3	6,0	5,8	5,5
Dia 14	8,4	5,2	5,4	6,2	5,6
Dia 21	7,6	5,6	6,4	10,8	6,4
Dia 30	8,0	5,6	6,4	7,4	4,9
DOXICICLINA e DIDPROPIONATO DE IMIDOCARB					
Animal	I-01	I-02	I-03	I-04	I-05
Dia 0	6,2	6,8	10,4	5,6	6,4
Dia 7	6,8	6,4	9,0	5,6	5,8
Dia 14	6,6	6,8	7,0	5,2	6,2
Dia 21	6,6	6,0	5,8	5,8	7,2
Dia 44	6,4	6,4	6,0	7,0	7,2

Valores de referência: 6,0 a 8,0 g/dl.

TABELA 13. Resultados da PCR pré e pós-tratamento nos três grupos de animais avaliados.

CONTROLE					
<b>Animal</b>	<b>C-01</b>	<b>C-02</b>	<b>C-03</b>	<b>C-04</b>	<b>C-05</b>
Pré-tratamento	+	+	+	+	+
Pós-tratamento	+	+	+	+	+
DOXICICLINA					
<b>Animal</b>	<b>D-01</b>	<b>D-02</b>	<b>D-03</b>	<b>D-04</b>	<b>D-05</b>
Pré-tratamento	+	+	+	+	+
Pós-tratamento	-	-	-	+	+
DOXICICLINA e DIPROPIONATO DE IMIDOCARB					
<b>Animal</b>	<b>I-01</b>	<b>I-02</b>	<b>I-03</b>	<b>I-04</b>	<b>I-05</b>
Pré-tratamento	+	+	+	+	+
Pós-tratamento	+	-	-	-	-

QUADRO 1. Primeira página das fichas individuais de identificação e acompanhamento do tratamento.

<b>Projeto de Pesquisa: Avaliação da eficiência da doxiciclina e do dipropionato de imidocarb no tratamento da <i>E. canis</i> em cães</b>		
<b>PARA USO EXCLUSIVO DO PESQUISADOR</b>		
Animal Nº:	Grupo:	Data:
<b>DADOS DA CLÍNICA</b>		<b>DADOS DO PROPRIETÁRIO</b>
Clínico:	Nome:	
Endereço:	Endereço:	
Telefone:	Telefone:	
<b>DADOS DO ANIMAL</b>		
Nome:	Idade:	Sexo (M) (F)
Raça:	Pelagem:	Peso:
Qual a queixa? Desde quando?		
Tem histórico de outra doenças? Quais?		
Já foi tratado para Erlichiose? SIM NÃO Com qual droga? Há quanto tempo?		
Outros:		

QUADRO 2. Páginas seguintes das fichas individuais de identificação e acompanhamento de tratamento.

<b>ACOMPANHAMENTO DE COLETAS</b>		
(    ) <b>COLETA 1</b> (dia 0) – hemograma / plaquetometria / PCR		
(    ) <b>COLETA 2</b> (dia 7) – hemograma		
(    ) <b>COLETA 3</b> (dia 14) – hemograma / plaquetometria		
(    ) <b>COLETA 4</b> (dia 21) – hemograma		
(    ) <b>COLETA 5</b> (dia*) – hemograma / plaquetometria / PCR		
* Controle: 28 dias; Doxíciclina: 30 dias; Doxíciclina+ Dipropionato de imidocarb: 44 dias.		
Data:		
<b>EXAME FÍSICO</b>		
T°:	FC:	FR:
Estado nutricional:		
Atitude:		
Comportamento:		
Pele: dermatite / úlceras / petéquias / alopecia / Outros:		
Ectoparasitos: carrapatos / pulgas / Outros:		
Mucosas:		
Linfonodos e baço:		
Olhos: secreção / hemorragia conjuntival / uveíte / hifema / Outros:		
Ouvido:		
Digestivo: vômito / diarréia / melena / Outros:		
Respiratório: descarga nasal / epistaxe / tosse / fadiga / Outros:		
Circulatório: pulso / auscultação / Outros:		
Gênito-urinário: edema escrotal / aborto / poliúria / polidipsia / Outros:		
Locomotor: claudicação / artrite / atrofia muscular / Outros:		
Sistema nervoso: convulsões / ataxia / Outros:		
Outros:		