

## MENSURAÇÃO DA PROTEÍNA C-REATIVA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Ehrlichia canis* (AMOSTRA JABOTICABAL) E APÓS O TRATAMENTO COM CLORIDRATO DE DOXICICLINA EM CÃES

Thiago Demarchi Munhoz<sup>1</sup>, Joice Lara Maia Faria<sup>1</sup>, Giovanny Vargas Hernandez<sup>1</sup>, Carolina Franchi João<sup>1</sup>, Wanderson Adriano Biscola Pereira<sup>2</sup>, Marcos Rogério André<sup>1</sup>, Rosângela Zacarias Machado<sup>3</sup>, Mirela Tinucci-Costa<sup>4</sup>

### RESUMO

A erliquiose canina é uma doença de alta incidência na região nordeste do Estado de São Paulo, sendo responsável pela morte de muitos cães. O diagnóstico precoce favorece a pronta instituição do tratamento e melhora o prognóstico do animal. Estudos têm apontado que a determinação da concentração de proteínas de fase aguda (PFA) pode contribuir para detecção precoce da doença e auxiliar na predição do prognóstico. O presente estudo objetivou avaliar a proteína C-reativa em cães experimentalmente infectados com *Ehrlichia canis*, amostra Jaboticabal, bem como a resposta ao tratamento com cloridrato de doxiciclina. Para tanto, foram utilizados 10 cães sem contato prévio com hemoparasitas. Destes, cinco eram infectados e cinco serviram de controle à infecção. Realizaram-se exames: físico, hemogramas, nested PCR, detecção de anticorpos anti-*E. canis* e mensuração da CRP em períodos pré-determinados. Os resultados mostraram que a proteína-C reativa, teve sua concentração aumentada antes do aparecimento dos sinais clínicos, os quais tornaram-se evidentes por volta

do 17º dia de infecção. Registrou-se trombocitopenia a partir do 3º dia de infecção. Mórulas intracitoplasmáticas foram detectadas a partir do 15º dia. Evidenciou-se títulos sorológicos anti-*E. canis*, variando de 1:2560 a 1:5120, e nPCR positiva no 18º dia. Após o tratamento os cães infectados estavam assintomáticos, com nPCR negativo e acentuada redução dos títulos de anticorpos específicos, com persistência da trombocitopenia. A CRP reduziu suas concentrações a títulos próximos aos iniciais. Conclui-se que o tratamento com doxiciclina é eficiente na erradicação da infecção pela amostra *E. canis* (Jaboticabal) e que a CRP contribui para o diagnóstico precoce da erliquiose experimental em sua fase aguda.

**Palavras-chave:** infecção experimental, cloridrato de doxiciclina, proteína C-reativa, nested PCR, *Ehrlichia canis*, cão.

### INTRODUÇÃO

A erliquiose canina é causada pela *Ehrlichia canis*, bactéria gram negativa,

<sup>1</sup> Médico Veterinário. Pós-Graduando. Faculdade de Ciências Agrárias Veterinárias-UNESP. Via Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, Km5 Jaboticabal-SP. 14884-900. jlmfaria@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Médico Veterinário. Doutor. Professor. Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba-UNIUBE. Uberaba-MG.

<sup>3</sup> Médica Veterinária. Doutora. Professora Titular. UNESP. Jaboticabal-SP.

<sup>4</sup> Médica Veterinária. Doutora. Professora. UNESP. Jaboticabal-SP.

intracelular obrigatória, transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, registrada com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais (NEER; HARRUS, 2006).

O período de incubação da erliquiose canina varia de 8 a 20 dias, seguindo a fase aguda, subclínica e crônica da doença (HARRUS et al., 1999). A fase aguda perdura por duas a quatro semanas e caracteriza-se por hipertermia, perda de peso, anorexia, depressão, linfadenomegalia, esplenomegalia, vasculite, sinais oculares e musculoesqueléticos (HARRUS et al., 1999; NEER; HARRUS 2006). A trombocitopenia é a anormalidade mais comum em cães natural ou experimentalmente infectados com *E. canis* durante a fase aguda da doença (WANER et al., 2000). A fase subclínica tem duração muito variável estendendo-se de meses a anos (NEER; HARRUS 2006) e o animal pode apresentar altos títulos de anticorpos anti-*E. canis*, trombocitopenia persistente e leucopenia, na ausência de outros sinais clínicos (WANER et al., 1997). Possivelmente estas alterações ocorrem pelo fato da bactéria permanecer alojada no baço do animal, durante a fase subclínica da doença (HARRUS et al., 1998a; HARRUS et al., 2004). Pancitopenia severa, diátese hemorrágica e debilidade orgânica caracterizam a fase crônica da doença (NEER; HARRUS 2006).

O diagnóstico pode ser feito pela identificação direta de corpúsculos de inclusão ou mórulas de *E. canis* em leucócitos e plaquetas (ELIAS, 1991), aspirados de linfonodos (MYLONAKIS et al., 2003) e em aspirados esplênicos (FARIA et al., 2010). Detecção de anticorpos específicos, por meio do "Dot-Elisa" (OLIVEIRA et al., 2000) e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (NAKAGHI et al., 2008), bem como técnicas moleculares, como a nPCR (NAKAGHI et al., 2008; FARIA et al., 2010), também são utilizados para o diagnóstico da erliquiose.

Além desses meios diagnósticos, pesquisadores têm avaliado formas de auxiliar na predição do prognóstico. Nesse contexto, estudos têm apontado que a determinação da resposta de fase aguda pode contribuir para a detecção precoce da doença em cães, ressaltando inclusive a importância da utilização deste método para processos inflamatórios, que não possam ser detectados pela contagem leucocitária (NAKAMURA et al., 2008). A resposta à fase aguda refere-se a uma reação complexa e inespecífica do organismo animal e se desenvolve rapidamente após qualquer injúria tecidual, podendo ser atribuída a causas infecciosas, imunológicas, neoplásicas, ou outras com o propósito de restaurar a homeostase, e remover a etiologia do desequilíbrio (CERÓN et al., 2005).

Como consequência desse processo ocorrem variações nas concentrações de proteínas plasmáticas, conhecidas como proteínas de fase aguda (PFA) (ECKERSALL, 2000), as quais podem ser consideradas marcadores precoces de qualquer processo patológico, uma vez que, desenvolvem-se antes da resposta imune específica e, em muitos casos, no início dos sinais clínicos (CERÓN et al., 2005). Dependendo do estímulo, essas PFA podem diminuir ou aumentar suas concentrações (MURATA et al., 2003).

A proteína C-reativa (CRP) foi à primeira PFA a ser descrita. Em humanos, é um marcador sistêmico perfeitamente sensível à inflamação e ao dano tecidual. Sua concentração no plasma aumenta quando o dano tecidual é causado por infecção, inflamação, neoplasia ou trauma (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2003; MATIJATKO et al., 2007). Em cães experimentalmente infectados com *E. canis* os autores quantificaram a CRP e detectaram aumento gradativo entre os dias 4 e 6 pós-inoculação (RIKIHISA et al., 1994; SHIMADA et al., 2002) até atingirem o pico entre 15 e 42 dias após a infecção (SHIMADA et al., 2002). Com base nos resultados obtidos nesses estudos, os

autores propuseram que se pode suspeitar de infecção por *E. canis*, quando os níveis plasmáticos de CRP estiverem elevados (RIKIHISA et al., 1994), além de correlacionarem o aumento de CRP à multiplicação da bactéria no sangue do hospedeiro (SHIMADA et al., 2002).

Após a avaliação diagnóstica, é recomendado o tratamento, o qual é baseado no uso de antimicrobianos como o cloridrato de doxiciclina. Contudo, estudos demonstraram diferenças com relação ao protocolo utilizado e a resposta ao tratamento (IQBAL; RIKIHISA, 1994; HARRUS et al., 1998b; NEER; HARRUS 2006; EDDLESTONE et al., 2007), o que pode ser relacionado à diferença imunogênica entre as cepas de *E. canis* (ZHANG et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta ao tratamento com cloridrato de doxiciclina em cães durante 21 dias na infecção experimental pela *E. canis* amostra Jaboticabal, juntamente com a dosagem de CRP e os aspectos clínicos e diagnósticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal (protocolo 002460-08).

Foram empregados 10 cães sem raça definida (SRD), irmãos de mesma ninhada, sendo 5 machos e 5 fêmeas, com 2 anos de idade, nascidos e mantidos no canil experimental do Hospital Veterinário – UNESP/ Jaboticabal, sem contato com ectoparasitas e alimentados com ração comercial (Sabor e Vida<sup>®</sup> - Guabi) e água à vontade.

No período pré-experimental todos os animais foram imunizados contra doenças infecciosas (Fort Dodge<sup>®</sup>) e vermifugados conforme protocolo do HV –

UNESP / Jaboticabal, e, preventivamente tratados com ectoparasiticidas. Eram alimentados com ração comercial (Sabor e Vida<sup>®</sup> - Guabi) e água à vontade.

Imediatamente antes da infecção experimental foram coletados 10 mL de sangue, sendo uma alíquota conservada em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para realização de hemograma e nested PCR e a parte remanescente dessorada e empregada na pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* para confirmação da ausência de infecção. Realizou-se ainda a sorologia anti-*Babesia canis*, para confirmar a não infecção, bem como a pureza da amostra *E. canis* Jaboticabal.

Confirmada a ausência de infecção por estes hemoparasitas, os 10 cães foram separados, aleatoriamente, em dois grupos experimentais: grupo I (n=5) receberam o inóculo de *E. canis* (I1 a I5) e o grupo C (n=5), serviram como controle da infecção (C1 a C5). Inocularam-se os cães do grupo I, por via intravenosa, com alíquotas individuais de 3mL de sangue infectados com a amostra de *E. canis* Jaboticabal (*Gene Bank* nº DQ401044), criopreservada em nitrogênio líquido (CASTRO et. al., 2004). Após a inoculação, o aparecimento da parasitemia foi acompanhado por meio de pesquisa de mórulas em esfregaços sanguíneos de ponta de orelha (ELIAS, 1991), além do exame físico diário. No exame físico focou-se, principalmente, a temperatura corpórea, coloração das mucosas visíveis, ingestões hídrica e alimentar além do grau de hidratação, frequências cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, palpação de órgãos abdominais e linfonodos superficiais. Realizou-se exame físico dos animais diariamente até o término do período experimental.

Amostras de sangue foram coletadas em intervalos descritos no Quadro 1, e empregadas para a detecção do DNA da bactéria, mensurar a CRP, verificar as alterações hematológicas e avaliar a soroconversão provocadas pela infecção experimental.

Quadro 1. Protocolo experimental adotado para os cães controle e experimentalmente infectados com *E. canis*, amostra Jaboticabal, 2008.

TEMPO	AVALIAÇÕES DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
Dia pré-inoculação (D-1)	Hemograma Dosagem de CRP Sorologia <i>E.canis</i> e <i>B.canis</i> nPCR para <i>E.canis</i>
Inoculação (D0)	Inoculação da cepa <i>E.canis</i> Jaboticabal
3 dias pós-inoculação (D3)	Hemograma Dosagem de CRP
6 dias pós-inoculação (D6)	Hemograma Dosagem de CRP
12 dias pós-inoculação (12)	Hemograma Dosagem de CRP
18 dias pós-inoculação (D18)	Hemograma Dosagem de CRP nPCR para <i>E.canis</i> e sorologia anti- <i>E.canis</i>
30 dias pós-inoculação (D30)	Hemograma Dosagem de CRP Início do tratamento dos animais (21 dias de duração)
25 dias pós-tratamento (D76)	Hemograma Dosagem de CRP nPCR para <i>E.canis</i> e sorologia anti- <i>E.canis</i>

Após o término da fase aguda, 30 dias após a inoculação (D30), iniciou-se o tratamento dos animais infectados com cloridrato de doxiciclina na dosagem de 5mg/Kg a cada 12 horas durante 21 dias. Ao término do tratamento, no momento D76, realizaram-se novas coletas para avaliação da CRP e da eliminação da infecção.

Os hemogramas foram realizados no Laboratório Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto (Patologia Clínica) do Hospital Veterinário da FCAV-UNESP. Jaboticabal-SP.

A técnica da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* a RIFI foi realizada como descrito por Nakaghi et al.(2008), para o sistema *E. canis* e por

Furuta et al. (2009), para o sistema *B. canis*. Diluíram-se as amostras de soros a 1:20 e 1:40 em solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,2), e empregadas na detecção de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*, respectivamente. Depositaram-se 10 µL do soro diluído em áreas demarcadas das lâminas e então, incubadas em câmara úmida a 37°C. Posteriormente foram lavadas em PBS (pH 7,2), secas e, em cada área demarcada adicionado o conjugado anti-IgG de cão (cat. n° F7884 Sigma®), diluído conforme orientação do fabricante. Avaliaram-se as lâminas depois de secas e montadas em glicerina tamponada à microscopia com emissão de luz ultravioleta. Considerou-se positivos para *E. canis*, àqueles soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:20; a positividade da

reação, dada pela observação de fluorescência nas mórulas, comparativamente às amostras de soro controle positivo e negativo. Para *B. canis* foram consideradas positivas as reações em que toda a periferia do parasita apresentou fluorescência, na diluição de 1:40.

Realizou-se a extração de DNA do sangue por meio do QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (cat. n<sup>o</sup> 51104, Qiagen<sup>®</sup>), como preconizado pelo fabricante. A amplificação foi idealizada em duas etapas, em termociclador (MJ Research - PTC 200) como descrito por Nakaghi et al. (2008) e Faria et al. (2010). Utilizou-se na primeira amplificação 5,0µL do DNA da amostra em 5,0µL de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Invitrogen<sup>®</sup>), 2,5mM de Cloreto de Magnésio, 1pmol de cada primer ECC (5'- GAACGAACGCTGGCGGCAAGC -3') e ECB (5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA -3') (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,25U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen<sup>®</sup>) e água (Gibco<sup>®</sup>) q.s.p. 50µL. Realizou-se a nPCR utilizando as mesmas soluções, além de 1,0µL de amostra do DNA amplificado e os primers ECAN (5'- CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA -3') e HE3 (5'- TATAGGTACCGTCATTA TCTCCCTAT -3'). Os produtos amplificados foram visibilizados em gel de agarose (Invitrogen<sup>®</sup>) a 1,5% corado com brometo de etídio por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II - Stratagene<sup>®</sup>).

As técnicas sorológicas (RIFI) e moleculares (nPCR) foram realizadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP/Jaboticabal.

Para a dosagem das concentrações de proteína C-reativa, utilizou-se o kit comercial PCR-Ultra Sensível – método turbidimétrico (CAT BT 20.017.00, BioTécnica, Minas Gerais), cujo princípio

consiste de uma reação de aglutinação de partículas de látex recobertas com anticorpo anti-proteína C-reativa humana, quando misturadas com a proteína C-reativa presente na amostra de soro. A aglutinação causa uma mudança de absorbância proporcional à concentração de proteína C-reativa da amostra, que é quantificada pela comparação com um calibrador de concentração conhecida.

Para a análise estatística dos parâmetros hematológicos, realizou-se primeiramente uma análise de variância para medidas repetidas. Sempre que o resultado se mostrou significativo, utilizou-se o teste Dunnett com significância de 5%. Para a análise das variáveis independentes e da proteína C-reativa foi utilizado do teste “T de Student” também com significância de 5% (ZAR, 1999).

## RESULTADOS

Os animais do grupo controle não apresentaram alterações no exame físico durante todo o período experimental. Inversamente, todos os animais infectados tornaram-se inapetentes por volta do 17<sup>o</sup> dia pós-inoculação (PI), havendo a necessidade de apoio nutricional (introdução de ração úmida ou dieta caseira para estimulação do apetite). As mucosas oral e ocular, tornaram-se pálidas a partir do 22<sup>o</sup> dia PI, mantendo-se assim até o início do tratamento.

Quanto à temperatura retal (Figura 1), dois animais (I3 e I5) apresentaram temperaturas superiores a 39,4°C logo nos primeiros dias PI. Contudo, os picos de temperatura se concentraram entre os dias 12 e 20 PI. Após este período, houve altera-

ção individual da temperatura até o dia 28 PI. Somente o animal I5 manteve a temperatura acima de 39,4°C até os dois últimos dias, do que se considerou a fase

aguda da infecção experimental.

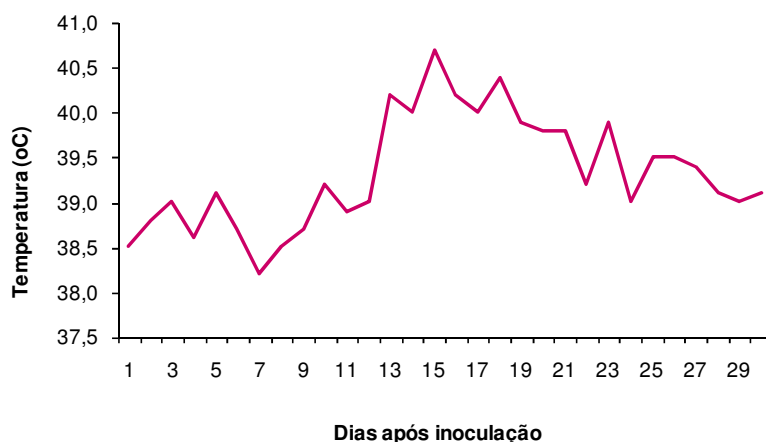


Figura 1. Gráfico representativo da média da variação diária de temperatura dos cães infectados com *E. canis*, amostra Jaboticabal, desde o dia -1 até o dia 30 pós inoculação. A variação fisiológica de temperatura para a espécie canina é de 37,5° a 39,4°C (FEITOSA, 2004).

Todos os animais infectados apresentaram linfadenomegalia dos linfonodos mandibulares, pré-escapulares e poplíteos, coincidente com o início do quadro febril.

Quanto à palpação abdominal, dois animais (I1 e I4) mostraram destacada esplenomegalia a partir do 14º dia PI, persistindo até o início do tratamento e, gradativamente, reduzindo ao longo do mesmo.

Nos animais de ambos os grupos não foram observadas alterações quanto ao grau de hidratação, frequências cardíaca e respiratória e tempo de preenchimento capilar.

Não se evidenciaram diferenças significativas nos valores médios dos parâmetros de hemácias, hematócrito, hemoglobina e plaquetas durante todo o experimento no grupo controle. Em contrapartida, no grupo infectado, a partir do

D3 foi possível observar trombocitopenia persistente até o término do período experimental. Redução significativa no número total de hemácias, hemoglobina e hematócrito, caracterizando anemia, foram registradas nos momentos D18 e D30. Os valores observados para esses parâmetros eram significativamente menores ( $P < 0,05$ ), quando comparados aos do grupo controle e aos momentos anteriores ao D18 para o grupo infectado (Tabela 1).

No leucograma o grupo infectado (Tabela 1) apresentou leucopenia a partir do D6 que perdurou até o final das avaliações. A contagem diferencial de leucócitos revelou eosinopenia nos momentos D18 e D30 e diminuição de neutrófilos segmentados também no momento D18. A contagem de basófilos e neutrófilos bastonetes permaneceu dentro dos valores de normalidade para os dois grupos experimentais.

Tabela 1. Valores médios do hemograma dos cães controles (C) e infectados (I) experimentalmente com *E. canis*, amostra Jaboticabal. Jaboticabal-SP, 2008.

	Momentos experimentais						
	D-1	D3	D6	D12	D18	D30	D76
<b>Hemácias/μL</b>							
C	7.000.000 <sup>Aa</sup>	6.890.000 <sup>Aa</sup>	6.680.000 <sup>Aa</sup>	6.090.000 <sup>Aa</sup>	6.020.000 <sup>Aa</sup>	7.530.000 <sup>Aa</sup>	6.450.000 <sup>Aa</sup>
I	7.220.000 <sup>Aa</sup>	6.940.000	6.970.000 <sup>Aa</sup>	5.980.000 <sup>Ba</sup>	4.510.000 <sup>Bb</sup>	4.220.000 <sup>Bb</sup>	6.560.000 <sup>Aa</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>							
C	17,44 <sup>Aa</sup>	16,42 <sup>Aa</sup>	16,18 <sup>Aa</sup>	15,68 <sup>Aa</sup>	15,08 <sup>Aa</sup>	19,58 <sup>Aa</sup>	15,86 <sup>Aa</sup>
I	17,92 <sup>Aa</sup>	16,72 <sup>Aa</sup>	17,10 <sup>Aa</sup>	15,62 <sup>Ba</sup>	11,88 <sup>Bb</sup>	10,94 <sup>Bb</sup>	15,82 <sup>Aa</sup>
<b>Hematócrito (%)</b>							
C	48,98 <sup>Aa</sup>	48,88 <sup>Aa</sup>	47,02 <sup>Aa</sup>	42,66 <sup>Aa</sup>	42,42 <sup>Aa</sup>	53,26 <sup>Aa</sup>	46,22 <sup>Aa</sup>
I	50,50 <sup>Aa</sup>	49,14 <sup>Aa</sup>	48,64 <sup>Aa</sup>	42,36 <sup>Ba</sup>	30,78 <sup>Bb</sup>	29,30 <sup>Bb</sup>	45,28 <sup>Aa</sup>
<b>Plaquetas/μL</b>							
C	247.600 <sup>Aa</sup>	241.800 <sup>Aa</sup>	249.600 <sup>Aa</sup>	233.200 <sup>Aa</sup>	226.200	225.400 <sup>Aa</sup>	203.400 <sup>Aa</sup>
I	222.400 <sup>Aa</sup>	181.000 <sup>Ab</sup>	140.200 <sup>Bb</sup>	187.200 <sup>Aa</sup>	56.400 <sup>Bb</sup>	166.200 <sup>Aa</sup>	181.400 <sup>Aa</sup>
<b>Leucócitos/μL</b>							
C	8.180 <sup>Aa</sup>	8.240 <sup>Aa</sup>	8.900 <sup>Aa</sup>	8.620 <sup>Aa</sup>	8.160 <sup>Aa</sup>	7.820 <sup>Aa</sup>	6.560 <sup>Aa</sup>
I	7.380 <sup>Aa</sup>	7.240 <sup>Aa</sup>	5.180 <sup>Bb</sup>	5.540 <sup>Ab</sup>	3.520 <sup>Bb</sup>	5.100 <sup>Bb</sup>	5.180
<b>Eosinófilos/μL</b>							
C	890 <sup>Aa</sup>	990 <sup>Aa</sup>	440 <sup>Aa</sup>	770 <sup>Aa</sup>	500 <sup>Aa</sup>	940 <sup>Aa</sup>	850 <sup>Aa</sup>
I	520 <sup>Aa</sup>	430 <sup>Aa</sup>	310 <sup>Aa</sup>	220 <sup>Aa</sup>	40 <sup>Ba</sup>	50 <sup>Ba</sup>	260 <sup>Aa</sup>
<b>Segmentados/μL</b>							
C	4.260 <sup>Aa</sup>	4.780 <sup>Aa</sup>	5.970 <sup>Aa</sup>	5.440 <sup>Aa</sup>	5.460 <sup>Aa</sup>	4.390 <sup>Aa</sup>	3.540 <sup>Aa</sup>
I	3.980 <sup>Aa</sup>	4.130 <sup>Aa</sup>	3.110 <sup>Ab</sup>	3.990 <sup>Aa</sup>	2.390 <sup>Ab</sup>	3.520 <sup>Aa</sup>	3.370 <sup>Aa</sup>
<b>Linfócitos/μL</b>							
C	2.870 <sup>Aa</sup>	2.300 <sup>Aa</sup>	1.790 <sup>Aa</sup>	2.070 <sup>Aa</sup>	1.640 <sup>Aa</sup>	2.270 <sup>Aa</sup>	2.040 <sup>Aa</sup>
I	2.660	2.390 <sup>Aa</sup>	1.500 <sup>Aa</sup>	1.050 <sup>Ba</sup>	840 <sup>Bb</sup>	1.270 <sup>Ba</sup>	1.240 <sup>Ba</sup>
<b>Monócitos/μL</b>							
C	160 <sup>Aa</sup>	170 <sup>Aa</sup>	530 <sup>Ba</sup>	170 <sup>Aa</sup>	400 <sup>Aa</sup>	150 <sup>Aa</sup>	130 <sup>Aa</sup>
I	220 <sup>Aa</sup>	290 <sup>Aa</sup>	260 <sup>Aa</sup>	170 <sup>Aa</sup>	180 <sup>Aa</sup>	210 <sup>Aa</sup>	210 <sup>Aa</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos. (P < 0,05) Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos infectado (I) e controle (C).

No leucograma o grupo infectado (Tabela 1) apresentou leucopenia a partir do D6 que perdurou até o final das avaliações. A contagem diferencial de leucócitos revelou eosinopenia nos momentos D18 e D30 e diminuição de neutrófilos segmentados também no momento D18. A contagem de basófilos e neutrófilos bastonetes permaneceu dentro dos valores de normalidade para os dois grupos experimentais.

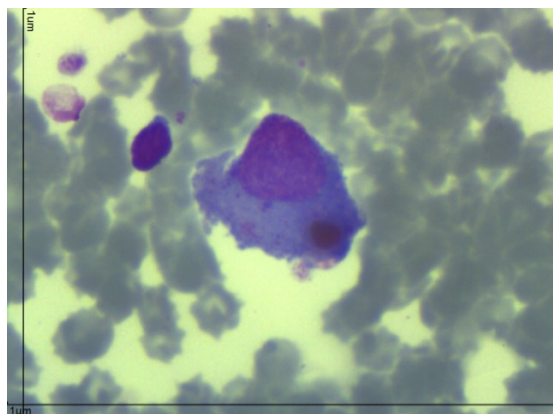


Figura 2. Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo do pavilhão auricular de cão infectado com *E. canis*, amostra Jaboticabal no D15 PI, com visualização de mórula. Aumento de 100X Rosenfeld modificado.

Mórulas intracitoplasmáticas foram encontradas em esfregaços sanguíneos na extremidade do pavilhão auricular em três (I2, I4 e I5) dos cinco animais do grupo infectado a partir do D15 pós-inoculação, confirmando a parasitemia e a infecção por *E. canis*, (Figura 2).

Os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*, por meio da RIFI, foram negativos para todos os animais deste experimento no dia -1, demonstrando que se tratavam de cães não expostos aos hemoparasitas. Nas avaliações subsequentes (D18 e D76), os animais do grupo controle permaneceram negativos aos anticorpos anti-*E. canis*, sendo o inverso visto nos animais infectados, em ambos os tempos experimentais. Os títulos variaram de 1:2.560 a 1:5.120 no D18 a 1:320 a 1:2.560 no D76, como pode ser visto na tabela 3. Os cães permaneceram negativos às pesquisas sorológica e molecular (dado não mostrado) de *B. canis* durante todo o período experimental demonstrando a pureza da *E. canis* amostra Jaboticabal.

Tabela 3. Resultados da sorologia anti-*E. canis* e anti-*B. canis* obtidos por meio da RIFI, nos cães dos grupos controle (C) e infectado (I), nos períodos pré-determinados, Jaboticabal-SP, 2008.

Controle	<i>E. canis</i> (D-1)	<i>B. canis</i> (D-1)	<i>E. canis</i> (D18)	<i>E. canis</i> (D76)
C1	-	-	-	-
C2	-	-	-	-
C4	-	-	-	-
C5	-	-	-	-
I1	-	-	1:2.560	1:320
I2	-	-	1:2.560	1:2.560
I3	-	-	1:2.560	1:1.280
I4	-	-	1:5.120	1:640
I5	-	-	1:2.560	1:1.280



O DNA de *E. canis* foi detectado nos cães infectados no 18º dia PI, tornando-se negativos após o tratamento (D76). Os produtos amplificados,

fragmentos de 398 pares de base de *E. canis* dos cães do grupo infectado, no momento 18, podem ser vistos na figura 3.

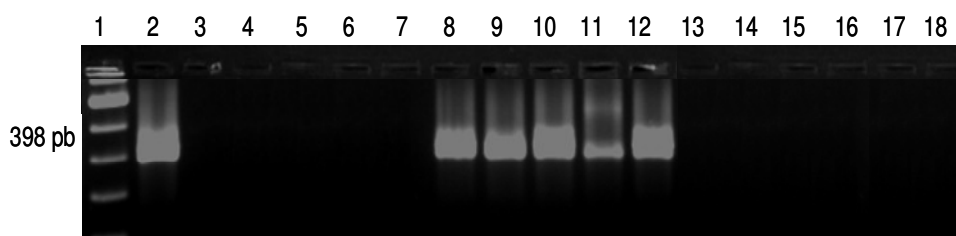


Figura 3. Visibilização do DNA de *E. canis* obtido pela nPCR de amostras de sangue de cães do grupo infectado com *E. canis*, amostra Jaboticabal, nos momentos D-1, D18 e D76. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (100 pb); canaleta 2: controle positivo; canaletas 3 a 7: animais do grupo I em D-1; canatelas 8 a 12: animais do grupo I em D18; canatelas 13-17 animais do grupo infectado em D76, canaleta 18 controle negativo (água); pb (pares de base).

A proteína C-reativa, no grupo infectado, mostrou aumento crescente nas suas concentrações séricas a partir do D3, persistindo até D18 e D30, onde notou-se sua concentração máxima. A partir de

então, houve redução dos níveis desta proteína para valores próximos aos do D-1 (Figura 4), sendo significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste T, a diferença quando se compararam as curvas entre os grupos.

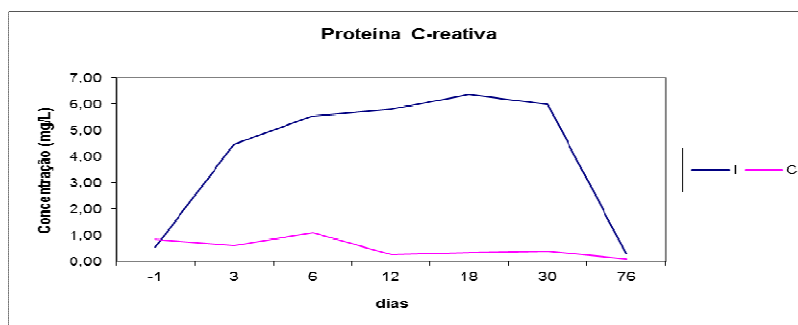


Figura 4. Representação gráfica das concentrações de proteína C-reativa nos cães controles (C) e infectados com *E. canis*, amostra Jaboticabal (I).

## DISCUSSÃO

A erliquiose canina é uma doença de alta incidência na clínica de pequenos animais e muitos cães acabam vindos a óbito por complicações decorrentes desta enfermidade. Embora os meios de diagnóstico e tratamento da erliquiose canina estejam consolidados, o uso de ferramentas preditivas nas rotinas clínica e hospitalar não ocorre com frequência.

A amostra *E. canis* Jaboticabal tem se mostrado eficiente em reproduzir a infecção experimental em cães, com resultados semelhantes aos descritos em outros experimentos (CASTRO et al., 2004), como também com a infecção de ocorrência natural (HARRUS et al., 1999; NEER; HARRUS, 2006; NAKAGHI et al., 2008; FARIA et al., 2010).

No que se refere à utilização da CPR como marcador de início de processo patológico, o presente estudo

corroborar com Nakamura et al. (2008) e Cerón et al. (2005), uma vez que, o aumento na concentração dessa proteína ocorreu antes mesmo do início da manifestação clínica.

Apesar de se observar o aumento da CRP antes da manifestação clínica, o pico ocorreu quando os sinais clínicos estavam instalados. Resultados semelhantes aos observados neste estudo, também foram detectados por Rikiyama et al. (1994) e Shimada et al. (2002) em cães experimentalmente infectados com *E. canis* amostra Oklahoma, que mostraram aumento sérico de CRP a partir de 2 e 4 dias após a inoculação atingindo maiores concentrações entre 6 e 15 dias pós-inoculação quando os animais estavam mais doentes. Essa informação demonstra que a CRP pode ser usada não somente como fator preditivo, mas também informa a gravidade do processo patológico, concordando com os achados de Martínez-Subiela et al. (2003) e Matijatko et al. (2007) que afirmaram que, quanto mais grave o dano tecidual, maior é a resposta das proteínas da fase aguda.

Outro dado interessante que reforça essa conjectura é a presença de trombocitopenia três dias após a inoculação. Os mecanismos que estão envolvidos na patogênese da trombocitopenia na erliquiose aguda incluem aumento de consumo de plaquetas devido às alterações inflamatórias do endotélio vascular, aumento do sequestro de plaquetas pelo baço e destruição imunológica que resulta em diminuição significativa no tempo de vida das plaquetas (HARRUS et al., 1999). Através desses estudos podemos sugerir que as alterações que ocorrem na formação da trombocitopenia poderiam ter influenciado a síntese de CRP, tão precocemente. Ademais, a persistência da trombocitopenia após o tratamento

poderia ser atribuída a mecanismos imunomediados como assinalado por Waner et al. (2000), que a justificam pela formação de anticorpos anti-plaquetários.

Esses achados são discordantes do proposto por Neer et al. (2002) que afirmam que a trombocitopenia pode ser utilizada para monitorar a resposta à terapia com doxiciclina.

Além disso, especificamente no caso da erliquiose, a mensuração de CRP pode também ser usada para demonstrar o pico de parasitemia, como referenciado por Shimada et al. (2002). Nossos resultados vão de encontro ao destes autores, uma vez que, a detecção de mórulas no sangue periférico ocorreu quando a concentração da CRP estava atingindo seus valores mais altos. Vale ressaltar que Castro et al. (2004) e Silva (2001) também observaram mórulas intracitoplasmáticas nos animais do grupo infectado, condizente com o observado no presente estudo. Contudo, nossos resultados discordam dos de Harrus et al. (1998a e 1998b) e Harrus et al. (2004) pois os mesmos não observaram mórulas nas amostras dos cães experimentalmente infectados.

Após a realização do tratamento, observou-se uma redução significativa na concentração de CRP. Contudo, não se pode afirmar que essa diminuição deve-se ao uso do antimicrobiano, pois outros estudos evidenciaram resultados semelhantes, sem a instituição de tratamento (RIKIYAMA et al., 1994; SHIMADA et al., 2002). Nos estudos destes autores os animais já não estavam na fase aguda da doença e, portanto, não apresentavam mais a sintomatologia clínica, podendo-se inferir que estavam na fase subclínica. A redução da CRP na fase subclínica, poderia ser esperada, pois as PFA aumentam tão logo o organismo entra em contato com o agente agressor. Portanto, as mensurações durante a fase aguda poderiam realmente ser úteis para auxiliar no diagnóstico precoce e na evolução da erliquiose em cães.

As alterações observadas no hemograma dos animais analisados neste estudo corroboram com os resultados obtidos por Castro et al. (2004), porém a maioria destas alterações ocorreram a partir de D3, enquanto que Castro et al. (2004) as observaram no hemograma a partir da primeira semana PI, embora nos dois estudos os cães tenham sido inoculados com a amostra Jaboticabal de *E. canis*.

A exata explicação para estas sutis diferenças não foi bem definida. Uma possibilidade levantada seria a virulência do inóculo, uma vez que Castro et al. (2004) utilizaram uma amostra original que estava criopreservada, ao passo que a empregada neste estudo sofreu uma passagem em cultivo celular em linhagem de monócitos caninos (DH82-ATCC, CRL-10389, USA), o que poderia aumentar a virulência da amostra, como descrito para outros agentes infectantes (WELLMAN et al., 1988).

Outra possibilidade seria os cães receptores do inóculo. Castro et al. (2004) inocularam *E. canis*, amostra Jaboticabal, em filhotes da raça Pastor alemão de 4 meses de idade, que sabidamente desenvolvem um quadro clínico severo da doença (NEER; HARRUS, 2006; SHIMADA et al., 2002). Neste estudo, foram empregados cães sem definição racial e com dois anos de idade. Desta forma, o esperado seria um quadro clínico mais brando o que, de fato, não ocorreu. Estas variações demonstram que a patogenia da erliquiose canina experimental, necessita de estudos adicionais, pois sugerem que outros fatores, que não a raça e idade possam estar envolvidas, além de apontarem para variações na virulência da amostra.

A presença dos anticorpos específicos da classe IgG aos 18 dias após a inoculação demonstra a resposta imune humoral frente ao parasita, corroborando com outros estudos que observaram títulos de anticorpos da classe IgG em torno de 7 a 21 dias após a inoculação (WANER et al., 1995 e 2000; BANETH et al., 2009). Segundo Waner et

al. (2001), a detecção inicial de IgG parece ser dependente da quantidade de organismos erliquiais aos quais o animal foi exposto, bem como a discrepância

entre resultados ocorrer pela diversidade antigênica entre as amostras de *E. canis* de diferentes regiões do mundo, duração do processo infeccioso e diferenças entre as raças de cães. Posteriormente observou-se marcada redução dos títulos de anticorpos anti-*E. canis* após o tratamento (D76), corroborando com Eddlestone et al. (2007) que também mostraram diminuição da titularidade anti-*E. canis* após o tratamento de cães experimentalmente infectados. Contudo, outros estudos afirmam que os cães podem permanecer com altos títulos de IgG por um longo período, mesmo após a eliminação do parasita (IQBAL; RIKIHISA, 1994; HARRUS et al., 1998a; HARRUS et al., 1998b; HARRUS et al., 2004).

Entre os métodos de diagnóstico da erliquiose canina, a detecção do DNA específico pela nPCR é considerada uma técnica de excelência para o diagnóstico da doença (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998a; 2004; NAKAGHI et al., 2008; FARIA et al., 2010). O presente estudo concorda com esses autores, uma vez que todos os animais inoculados tornaram-se positivos à nPCR. Além disso, a nPCR pode ser utilizada como uma forma de se avaliar a resposta a terapia empregada (HARRUS et al., 2004; EDDLESTONE et al., 2007). Corroborando com esta informação, todos os animais infectados deste experimento tornaram-se negativos após o tratamento com cloridrato de doxiciclina.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir com este estudo que as mensurações de CRP podem contribuir para a suspeição clínica e para o diagnóstico precoce da erliquiose em cães, bem como o tratamento com doxiciclina na dosagem e tempo empregados neste estudo foi eficiente, pois além da negatificação molecular, houve

redução significativa dos títulos de anticorpos associada a completa recuperação clínica da doença. Contudo, é importante ressaltar que a contagem de plaquetas deve ser usada com cautela na avaliação da resposta à terapia. Vale salientar, que a persistência de títulos de anticorpos, mesmo que baixa, e a redução na contagem de plaquetas observadas nos animais, após o tratamento, foram atribuídas às reações imunopatológicas que a bactéria causa no hospedeiro, não significando necessariamente a persistência da infecção.

**Measurement of c-reactive protein in experimental infection by *Ehrlichia canis* (Jaboticabal sample) and after treatment with doxycycline hydrochloride in dogs**

**ABSTRACT**

Canine ehrlichiosis is an endemic disease, with high incidence in the Northwest area of Sao Paulo State – Brazil and it is responsible for the death of numerous dogs. The rapid and accurate diagnosis helps the prompt establishment of treatment and improves the prognosis of the animal. Evidence has shown that the measurement of acute phase proteins (APP) can contribute for the early detection of the disease and help to predict its prognosis. This study evaluated the C-reactive protein in dogs experimentally infected with *Ehrlichia canis*, Jaboticabal – SP – Brazil sample, and the response to therapy with doxycycline. Ten dogs, with no previous hemoparasitosis, were randomly assigned in either the infected group (5 animals), which received the bacteria, or the control group (5 animals). In pre-determined intervals physical examination, their blood was collected and hemogram, nested PCR, anti-*E. canis* antibodies detection and titration of C-reactive protein were

performed. We showed that, in infected dogs, the concentration of C-reactive protein were increased previous to the clinical signs forthcoming. The clinical signs were evident around the 17th day of infection. Thrombocytopenia was found on the 3th day of infection. Intra-cytosolic morules were detected on the 15th day of infection. Sorologic titration of anti-*E. canis*, ranging from 1:2560 to 1:5120, and positive nPCR were found on the 18th day of infection. After the treatment (D76), the animals were clinically healthy, with negative nPCR and decreased titration of specific antibodies, although the thrombocytopenia had persisted. The CRP analyzed were similar to basal levels. This study showed that the doxycycline treatment was clearance of experimentally induced *E. canis* strain from Jaboticabal infection in dogs and the measurement of CRP can, indeed, contribute for the early diagnosis of the experimental acute phase of canine ehrlichiosis.

**Keywords:** experimental infection, doxycycline hydrochloride, C-reactive protein, nested PCR, *Ehrlichia canis*, dog.

**REFERÊNCIAS**

- BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparasion to natural infection. **Vet. Mic.**, 2009, doi:10.1016/j.vetmic.2008, 11.22
- CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.C.T.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet. Parast.**, v.119, n.1, p.73-86, 2004.
- CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Vet.Clin.Pathol.**, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

- ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. **Irish Vet.J.**, v.53, p.307-311, 2000.
- EDDLESTONE, S.M.; DINIZ, P.P.V.P.; NEER, T.M.; GAUNT, S.D.; CORSTVET, R.; CHO, D.; HOSGOOD, G.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E.B. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J.Vet.Intern.Med.**, v.21, p.1237-1242, 2007.
- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **J.Small Anim.Pract.**, v.33, n.11, p.540-543, 1991.
- FARIA, J.L.M.; DAGNONE, A.S.; MUNHOZ, T.D.; JOÃO, C.F.; PEREIRA, W.A.B.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, v.19, n.2, p.98-102, 2010.
- FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária - a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. v.1. 807p.
- FURUTA, P.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; TEIXEIRA, M.C.A.; ROCHA, A.G.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Rev.Bras.Parasitol.Vet.**, v.18, n.3, p.41-45, 2009.
- 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, H.; 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.2140-2412, 1998b.
- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **J.Clin.Microbiol.**, v.37, n.9, p.2745-2749, 1999.
- 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. **Antimicrob.Agents Chemother.**, v.48, n.11, p.4488-4490, 2004.
- 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, 1994.
- MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; BERNAL, L.J.; CERÓN, J.J. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis during short-term treatment. **Am.J.Vet.Res.**, v.64, n.8, p.1021-1026, 2003.
- MATIJATKO, V.; MRLJAK, V.; KIS, I.; KUCER, N.; FORSEK, J.; ZIVICNJAK, T.; ROMIC, Z.; SIMEC, Z.; CERON, J.J. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. **Vet. Parasitol.**, v.144, n.3-4, p.242-250, 2007.
- MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPODOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.**, v.91, n.2-3, p.197-204, 2003.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; UOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Vet.J.**, v.168, p.28-40, p.28-40, 2003.

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

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K.; KOSHINO, A.; NAKASHIMA, K.; SETOGUCHI, A.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **J.Vet. Med. Sci.**, v.70, n.2, p.127-131, 2008.

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.

NEER, M.T.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis and Wolbachia infection. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Elsevier, 2006, 203-216p.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C.T.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO, M.B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by "Dot-ELISA" in naturally infected dogs. **Rev.Bras.Parasitol.Vet.**, v.9, n.1, p.1-5, 2000.

RIKIHISA, Y.; YAMAMOTO, S.; KWAK, I.; IQBAL, Z.; KOCIBA, G.; MOTT, J.; CHICHANASIRIWITHAYA, W. C-reactive protein and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.4, p.912-917, 1994.

SHIMADA, T.; ISHIDA, Y.; SHIMIZU, M.; NOMURA, M.; KAWATO, K.; IGUCHI, K.; JINBO, T. Monitoring c-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. **Vet. Res. Commun.**, v.26, n.3, p.171-177, 2002.

SILVA, V.L.D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos**

**citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental**. 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D.J.; BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopatol.**, v.48, p.177-182, 1995.

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

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. Immunopatol.**, v. 77, p. 145-150, 2000.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, v. 95, p. 1-5, 2001.

WELLMAN, M.L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R.M.; KOCIBA, G.J.A. macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 24, p. 223-29, 1988.

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.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Praticce Hall, 1999. 560 p.

ZHANG, X.; LUO, T.; KEYSARY, A.; BANETH, G.; MIYASHIRO, S.; STRENGER, C.; WANER, T.; MCBRIDE, J.W. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* satrains. **Clin.Vaccine Immunol.**, v.15, n.7, p.1080-1088, 2008.