

## AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE REAÇÃO CRUZADA EM CÃES PCR-POSITIVOS PARA *Anaplasma platys* TESTADOS EM ELISA COMERCIAL PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE *Anaplasma phagocytophilum*

RENATA F. FERREIRA<sup>1</sup>; ALOYSIO DE M. F. CERQUEIRA<sup>2</sup>; ANANDA M. PEREIRA<sup>1</sup>; PEDRO B. VELHO<sup>1</sup>; RAPHAEL R. M. AZEVEDO<sup>1</sup>; INGRID L.F. RODRIGUES<sup>3</sup>; NÁDIA R. P. ALMOSNY<sup>4</sup>

**ABSTRACT:**- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A. DE M.F.; PEREIRA, A.M.; VELHO, P.B.; AZEVEDO, R.R.M.; RODRIGUES, I.L.F.; ALMOSNY, N.R.P. [Cross-reaction evaluation of PCR-*Anaplasma platys* positive dogs tested to *Anaplasma phagocytophilum* antibodies by commercial ELISA]. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 5-8, 2008. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, CEP 24.230-340, Niterói, RJ. Brasil. E-mail: referreirauff@yahoo.com.br

*Anaplasma platys*, agent of canine cyclic thrombocytopenia parasites exclusively dogs platelets. Its probable vector is the tick *Rhipicephalus sanguineus*. Among the existent diagnostic methods, the most used include: morulae identification in blood smears; antibody detection by indirect immunofluorescence; or DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). Recently a new commercial ELISA (IDEXX®), capable of detecting *A. phagocytophilum* antibodies, has been developed. According to the manufacturer it appears to have a serological cross reaction with *A. platys* which may be used to help in the diagnosis of this agent. The aim of this study was to test serum samples from 16 PCR-positive dogs to *A. platys* with an ELISA that detects antibodies to *A. phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia canis*, and antigens of *Dirofilaria immitis* in order to verify the occurrence of cross reaction between *A. platys* and *A. phagocytophilum*. All animals tested negative for *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, and *D. immitis*. One animal tested positive for *E. canis*. Although it's known that *A. phagocytophilum* presents serological cross reaction with *A. platys*, the tested animals were negative, once antibodies against *A. platys* were not detected probably because of the acute phase of the disease.

**KEY WORDS:** *Anaplasma platys*, sorology, cross-reaction, dogs.

### RESUMO

*Anaplasma platys*, agente da trombocitopenia cíclica canina, parasita unicamente plaquetas de cães. Seu provável vetor é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Os métodos de diagnóstico mais utilizados são: pesquisa de mórulas em esfregaço sanguíneo, detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta, ou amplificação de DNA através da Reação em Ca-

deia da Polimerase (PCR). Recentemente, foi desenvolvido um ELISA (IDEXX®) capaz de detectar, dentre outros, anticorpos para *A. phagocytophilum*. O fabricante relata que testes iniciais apontam para a existência de reação cruzada com *A. platys*, fato este que pode permitir o uso do mesmo no diagnóstico deste agente. O objetivo deste trabalho foi testar amostras de soro de 16 cães PCR-positivos para *A. platys*, apresentando inclusões em plaquetas, a partir do ELISA para detecção de anticorpos de *A. phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, e *E. canis*; e antígenos de *Dirofilaria immitis* para verificar a possibilidade de reação cruzada de *A. platys* com *A. phagocytophilum*. Todos os animais obtiveram resultados negativos para *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, e *D. immitis*. Um dos animais foi também positivo para *E. canis*. Sabe-se que *A. phagocytophilum* apresenta reação cruzada com *A. platys*, mas, devido ao provável caráter agudo da

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. Bolsista CAPES. E-mail: referreirauff@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, UFF, Rua Professor Ernani Melo 101, Centro, Niterói, RJ 24210-130.

<sup>3</sup> Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Agrossocioambiental Sustentável. FV, UFF, Niterói, RJ.

<sup>4</sup> Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, FV, UFF, Niterói, RJ.

infecção nos animais testados, não foram detectados anticorpos anti- *A. platys*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Anaplasma platys*, sorologia, reação cruzada, cães.

## INTRODUÇÃO

*Anaplasma platys*, agente da trombocitopenia cíclica canina, é um microrganismo intracelular obrigatório, parasitando unicamente plaquetas de cães (WOODY; HOSKINS, 1991; HOSKINS, 1991a; ALMOSNY; MASSARD, 2002). Foi inicialmente descrito por HARVEY et al. (1978) na Florida, sendo denominado inicialmente como *Ehrlichia platys*. Em 2001, esse organismo foi reclassificado como pertencendo à família Anaplasmataceae e ao gênero *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). Estudos epidemiológicos em relação ao parasito são ainda escassos, mas presume-se que sua distribuição geográfica seja semelhante a outras espécies de Rickettsias (BRADFIELD et al., 1996), foi descrito nos EUA, na Grécia, França, Itália, Israel, China, Japão, Tailândia e Venezuela. (BROWN et al., 2001). *Anaplasma platys* também causa trombocitopenia em cães nas várias regiões do Brasil (MACHADO, 2004), não sendo rara a coinfeção com *E. canis* e *Babesia canis*, podendo o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* ser o mesmo vetor dessas três espécies (KORDICK et al., 1999; HUA et al., 2000; SUKSAWAT et al., 2001a).

Quando se suspeita de uma infecção por *A. platys*, o entendimento correto das manifestações clínicas, bem como dos exames laboratoriais e escolha do método diagnóstico, torna-se de extrema importância para uma conduta clínica ideal (MACIEIRA, 2003). Dentre os métodos de diagnóstico, os mais utilizados são a pesquisa de mórulas em esfregaço sanguíneo, detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta, ou amplificação de DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BREITSCHWERDT, 2000).

Devido à característica cíclica da doença, observar o microrganismo dentro das plaquetas quando o animal está infectado não é uma tarefa simples (FRENCH; HARVEY, 1983), sendo quase um achado acidental (BREITSCHWERDT, 1995). Isso acontece porque durante a infecção há uma diminuição na plaquetometria, dificultando a visualização dos microrganismos. Essa baixa frequência de parasitos nos esfregaços sanguíneos torna esse método de diagnóstico falho, principalmente nas fases de trombocitopenia (HARVEY et al., 1978; FRENCH; HARVEY, 1983; HIBLER et al., 1986; SWANGO et al., 1989). Em infecções por *E. canis*, também podem ser encontradas inclusões em plaquetas (ALMOSNY, 1998; MYLONAKIS et al., 2003), e a ocorrência de granulações por ativação plaquetária não pode ser descartada. A trombocitopenia é um achado comum em infecções por *A. platys*, entretanto esse achado não é patognomônico desta Rickettsiose ou de outra doença (COCKBURN; TROY, 1986).

Os testes sorológicos, em geral, são limitados pela deficiência na detecção de infecções agudas, na dificuldade de di-

ferenciar infecção por exposição primária e pela possibilidade de ocorrer reação cruzada entre as espécies (IQBAL et al., 1994; SHAW et al., 2001). Um teste isolado, portanto, pode não indicar infecção e sim exposição ao agente e este fato aumenta a importância do suporte clínico ao interpretar (RIKIHISA, 1991).

A PCR tem sido utilizada como auxílio no diagnóstico, devido a sua grande sensibilidade, especificidade e velocidade nos resultados (MYLONAKIS et al., 2003), fornecendo subsídios para tratar dessa doença infecciosa com sucesso.

Embora a imunofluorescência indireta seja altamente específica, não há reação cruzada com *E. canis* (FRENCH; HARVEY, 1983; WANER et al., 2001), mas sim apresenta reação cruzada com *A. phagocytophilum* (INOKUMA, 2002) e não pode ser descartada a possibilidade de uma coinfeção. Deve-se, ainda, levar em consideração que a presença de anticorpos contra *A. platys* não significa infecção clínica e sim exposição ao agente (RIKIHISA, 1991; WOODY; HOSKINS, 1991; WANER et al., 2001). A imunofluorescência indireta é muito utilizada quando a parasitemia está ausente ou muito baixa (FRENCH; HARVEY, 1983; ARRAGA-ALVARADO, 2003) ou na avaliação pós-tratamento (WEN et al., 1997).

Recentemente, foi lançado no mercado o ELISA 4DX (IDEX<sup>®</sup> LABORATORIES) que usa um peptídeo sintético baseado na proteína imunodominante p44 como antígeno e é capaz de detectar, dentre outros, anticorpos para *A. phagocytophilum* (ALLERMAN; WAMSLEY, 2008). Cães experimentalmente inoculados com *A. phagocytophilum* tiveram resultados positivos no teste a partir de oito dias pós-inoculação (ALLERMAN; WAMSLEY, 2008). Esses animais estiveram persistentemente infectados por um ano e permaneceram soropositivos, embora clinicamente saudáveis e sem microrganismos em neutrófilos circulantes pela avaliação da microscopia óptica convencional. O fabricante do kit 4DX (IDEX<sup>®</sup> LABORATORIES) relata que testes iniciais apontam para a existência de reação cruzada com *A. platys*, portanto, vários animais positivos para *A. platys* podem apresentar resultados positivos para *A. phagocytophilum* (ALLERMAN; WAMSLEY, 2008), pois os organismos são intimamente relacionados e evidentemente dividem epítopes que são detectadas no 4DX, fato esse que pode permitir o uso do mesmo no diagnóstico de *A. platys*.

O objetivo deste trabalho foi testar amostras de soro de 16 cães PCR-positivos para *A. platys*, apresentando inclusões em plaquetas, a partir de um teste comercial de ELISA (IDEX<sup>®</sup>) para detecção de anticorpos de *A. phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, e *E. canis*; e antígenos de *Dirofilaria immitis* para verificar a possibilidade de reação cruzada de *A. platys* com *A. phagocytophilum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 16 alíquotas de soro de cães previamente positivos na PCR para *A. platys* (FERREIRA et al., 2007), congeladas a -19°C, no Laboratório de Bactérias Enteropatógenicas e Microbiologia de Alimentos do Instituto

Biomédico da Universidade Federal Fluminense. As amostras foram descongeladas e processadas de acordo com as instruções do fabricante (IDEXX®) e testadas, utilizando-se ELISA comercial Canine SNAP 4Dx-IDEXX® para detecção de anticorpos de *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, e *E. canis* e antígenos de *D. immitis*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais PCR-positivos para *A. platys* obtiveram resultados negativos para *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, e *D. immitis*. Um dos 16 cães positivos para *A. platys* foi também positivo para *E. canis*. Com esses dados, não foi possível afirmar que nesse cão positivo havia coinfeção por *E. canis* e *A. platys*, e sim que houve exposição recente por *A. platys*, pois o DNA do parasito foi detectado na PCR (FERREIRA et al., 2007) e tiveram exposição prévia por *E. canis*, uma vez que o pico de produção de anticorpos é alcançado 90 dias após a infecção (ABBAS et al., 2000). Por outro lado, como não foram realizados estudos moleculares para a detecção de *E. canis*, as mórulas em plaquetas nos animais avaliados podem ser de *A. platys* e *E. canis*, que também faz o ciclo em plaquetas (ALMOSNY, 1998) sugerindo, então, coinfeção. A coinfeção por membros da família Anaplasmataceae não é incomum, uma vez que compartilham o mesmo carrapato vetor (EWING; BUCKNER, 1965; HUA et al., 2000; SUKSAWAT et al., 2001a; INOKUMA et al., 2003).

Os resultados do ELISA indicam que 15 animais, dos 16 testados, positivos para *A. platys*, mas negativos, no teste, não tiveram contato com antígenos de *D. immitis* e não produziram anticorpos contra quaisquer destes microrganismos como *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, ou *E. canis*, o que não descarta a possibilidade de infecções recentes onde ainda não tenha ocorrido soroconversão (MYLONAKIS, 2003). Ao contrário do esperado, não foi observada reação cruzada em nenhum dos animais testados. Isso se deve ao provável caráter agudo da infecção por *A. platys* nesses animais, todos apresentando inclusões em plaquetas. O teste negativo não significa ausência do microrganismo, pois o animal pode ainda não ter produzido anticorpos do tipo IgG ou pode não ser imunocompetente, isto é, não conseguir produzir quantidade suficiente de anticorpos detectáveis (SUKSAWAT et al., 2001b). Geralmente, a soroconversão (títulos acima de 100) ocorre em cães experimentalmente infectados no pico da primeira parasitemia, entre o décimo terceiro e o décimo nono dia pós-inoculação. Os títulos persistem durante quatro meses (FRENCH; HARVEY, 1983).

## CONCLUSÃO

A reação cruzada entre *A. phagocytophilum* e *A. platys*, relatada pelo fabricante do kit ELISA, não foi confirmada, no presente trabalho, uma vez que animais positivos para *A. platys* não apresentaram, na fase aguda, níveis de anticorpos detectáveis pelo kit. São necessários estudos mais detalhados para determinar se esse kit pode ou não ser eficaz no diagnós-

tico sorológico de *A. platys*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Cellular and molecular immunology*. W. B. Saunders, 2000. 553p.
- ALLEMAN, A.R.; WAMSLEY, H.L. An update on anaplasmosis in dogs. *Veterinary Medicine*, v.103, n.4, p.212-214, 216, 220. 2008.
- ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): *Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados*. Seropédica, 1998. 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.
- ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e com zoonoses*. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda. 2002. 135p.
- ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: An ultrastructural study of experimental and natural infections. *Veterinary Pathology*, v. 40, n. 2, p.149-156. 2003.
- BRADFIELD, J.F.; VORE, S.J.; PRYOR JR, W.H. *Ehrlichia platys* infection in dogs. *Laboratory Animal Sciences*. v. 46, n. 5, p. 565-567, 1996.
- BREITSCHWERDT, E.B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (Ed.): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. v.1, cap. 86, p. 400-407.
- BREITSCHWERDT, E.B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (Ed.): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995. v.1, cap. 86, p.376-383.
- BROWN G.K.; MARTIN A.R.; ROBERTS, T.K.; AITKEN, R.J. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 79, n. 8, p.554-558, 2001.
- COCKBURN, C.; TROY, G.C. A retrospective study of sixty-two cases of thrombocytopenia in the dog. *Southwestern Veterinarian*, v. 37, n.2, 133-141. 1986.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.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 subject synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.
- EWING, S.A.; BUCKNER, R.G. Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infections in dog. *American Journal of Veterinary Research*, v. 26, n. 113, p.815-828, 1965.



- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; GUIMARÃES, C.M.; SÁ, A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N.R.P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 5, n. 3, p.113-119, 2007.
- FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, n. 12, p. 2407-2411, 1983.
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. *Journal of Infectious Diseases*, v. 137, n. 2, p.101-103, 1978.
- HIBLER, S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.8, n. 2, p.106-114, 1986.
- HOSKINS, J.D. Tick-borne zoonoses: Lyme disease, Ehrlichiosis, and Rock Mountain Spotted Fever. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, v. 6, n.3, p.236-243, 1991b.
- HUA, P.; YUHAI, M.; SHIDE, T.; YANG, S.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Canine Ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. *Microbiology and Immunology*, v. 44, n. 9, p.737-739, 2000.
- INOKUMA, H.; BEPPU, T.; OKUDA, M.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. *Veterinary Parasitology*, v. 115, n. 4, p. 343-348, 2003.
- INOKUMA, H.; FUGII, K.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M.; ONISHI, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions on peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Veterinary Parasitology*, v. 110, n.1-2, p.145-152, 2002.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine Ehrlichiosis. *Journal of clinical Microbiology*, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.
- KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGERTY, B.C.; SOUTHWICK, K.L.; COLITZ, C.M.; HANCOCK, S.I.; BRADLEY, J.M.; RUMBOUGH, R.; McPHERSON, J.E.; McCORMACK, J.N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n.8 p.2631-2638, 1999.
- MACHADO, R.Z. Erliquiose canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, supl. 1, p.53-57. 2004.
- MACIEIRA, D.B. Avaliação da ocorrência de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) com trombocitopenia na região metropolitana do Rio de Janeiro. Niterói, 2003. 92f. Tese. (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2003.
- MILONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.F.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, v. 91, n. 2-3, p.197-204. 2003.
- RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and Ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v.4, n.3, p.286-380, 1991.
- SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSCHWERDT, E.D. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, v. 17, n. 2, p.74-80, 2001.
- SUKSAWAT, J.; XUEJIE, Y.; HANCOCK, S.I.; HEGARTY, B.C.; NILKUMHAMG, P.; BREITSCHWERDT, E.B. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 15, n. 5, p. 453-462. 2001a.
- SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S Ribosomal DNA secondary Structure. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n.1, p. 90-93, 2001b.
- SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infections. In: ETTINGER, S.J. (Ed.): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 3ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1989. v.1, cap. 46, p.277-281.
- WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for Ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* – Review. *Veterinary Parasitology*, v. 95, n. 1, p.1-15. 2001.
- WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H.Y.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 7, p.1852-1855, 1997.
- WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice*, v. 21, n.1, p.75-98, 1991a.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.