

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

*Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936)  
DIAGNÓSTICO, CULTIVO "in vitro" E ASPECTOS  
EPIDEMIOLÓGICOS EM BOVINOS NO BRASIL

**CLAUDETE DE ARAÚJO MASSARD**

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:

DR. CLÁUDIO DE MORAES ANDRADE

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, Medicina Veterinária, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Itaguaí, Rio de Janeiro

Dezembro, 1984

TÍTULO DA TESE


*Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936)  
DIAGNÓSTICO, CULTIVO "in vitro" E ASPECTOS  
EPIDEMIOLÓGICOS EM BOVINOS NO BRASIL

AUTOR

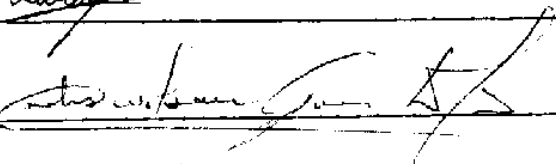
**CLAUDETE DE ARAÚJO MASSARD**

APROVADO EM: 7 de dezembro de 1984

Dr. Cláudio de M. Andrade



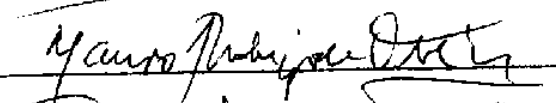
Dr. Carlos W. Gomes Lopes



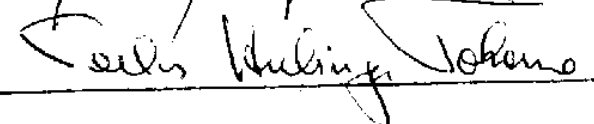
Dr. Nicolau M. Serra Freire



Dr. Mauro R. de Oliveira



Dr. Carlos M. H. Tokarnia



"Ao meu esposo CARLOS LUIZ pelo carinho e amizade e aos nossos filhos ANA PAULA, RODRIGO e BRUNO que na plenitude da infância demonstraram compreensão e amor na concretização deste ideal."

## **AGRADECIMENTOS**

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aos proprietários dos animais estudados e a todos que direta ou indiretamente proporcionaram condições necessárias à realização deste trabalho.

Aos animais que foram utilizados nos estudos experimentais, a nossa sincera gratidão.

## **BIOGRAFIA**

CLAUDETE DE ARAÚJO MASSARD, filha de Luiz Pessoa de Araújo e Iracema Cavalcanti de Araújo, nasceu a 31 de outubro de 1951 no Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1972, onde graduou-se em Medicina Veterinária em fevereiro de 1976.

Foi Monitora na Área de Parasitologia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em 1973.

A seguir, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), na categoria "Iniciação Científica" em 1974 e 1975; "Pesquisador Assistente B" em 1976; "Pós-Graduação - Mestrado" em 1977 e 1978, e "Pós-Graduação - Doutorado", 1979 e 1980.

Em junho de 1980 foi contratada para exercer o cargo de Pesquisador II-A na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, na representação da Diretoria Executiva do Rio de Janeiro - Unidade de Pesquisa em Patologia Animal, Km

47, Itaguaí - Rio de Janeiro.

Durante este período tem desenvolvido estudos em Parasitologia Veterinária, com 24 trabalhos publicados em revistas científicas, em congressos regionais e nacionais e uma tese de Mestrado, referente a hemoparasitos de *Canis familiaris*, envolvendo a descrição suscinta de *Hepatozoon canis* em condições brasileiras além de uma ampla revisão sobre a distribuição mundial dos parasitos do mesmo gênero em membros da ordem Carnívora.

Dentre as publicações científicas, destaca-se a participação ativa na descrição de um gênero novo e espécie nova de riquetsia, *Neitziella rezendei*, em membros das ordens Galliformes e Anseriformes, além da primeira caracterização sobre *Ehrlichia bovis* em bovinos no continente americano.

## ÍNDICE

	Pags.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Posição Taxonômica	5
2.2. Morfologia e Ciclo Biológico	7
2.3. Distribuição Geográfica	11
2.4. Animais Susceptíveis	12
2.5. Aspectos Clínicos e Patológicos	16
2.6. Diagnóstico e Diagnóstico Diferencial	22
2.7. Transmissão por carrapatos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Identificação Morfológica dos Hemoparasitos	28
3.2. Cultivo de <i>E. bovis</i> "in vitro"	29
3.3. Identificação de <i>E. bovis</i> por imunofluorescência direta (IFD)	32
3.4. Procedência, Manutenção e Finalidade dos Animais Utilizados	37
3.5. Infecções Experimentais com <i>E. bovis</i>	42

3.6. Coleta e Análise das Amostras de Sangue e Órgãos	49
3.7. Uso de Quimioterápicos	50
3.8. Soluções e Suspensões	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1. Identificação Morfológica de <i>E. bovis</i>	56
4.2. Cultivo de <i>E. bovis</i> "in vitro"	60
4.3. Identificação de <i>E. bovis</i> por Imunofluorescência	
Direta	62
4.4. Infecção Natural em Bovinos	69
4.5. Infecção Experimental com <i>E. bovis</i>	81
4.6. Alterações Hematológicas	97
5. CONCLUSÕES	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102



## ÍNDICE DE QUADROS

	Págs.
QUADRO 1. Espécies de Ehrlichieae comumente encontradas em mamíferos, transmissores, distribuição geográfica e tipo de célula parasitada. (Dados de vários autores)	8
QUADRO 2. Registros referentes a carrapatos ixodídeos envolvidos na transmissão de <i>E. bovis</i> a bovinos. (Dados de vários autores)	27
QUADRO 3. Esquema de obtenção de soro imune em coelhos Nova Zelândia	33
QUADRO 4. Resultados dos esfregaços sangüíneos de bovinos infectados experimentalmente com <i>E. bovis</i> e positivos nas provas de coloração de Giemsa e IFD, durante 8 semanas com 2 provas semanais	65
QUADRO 5. Resultados da pesquisa de anticorpos por IFD em soros conjugados com fluoresceína, produzidos em coelhos e bovino	66

QUADRO 6.	Prevalência dos hemoparasitos em bovinos examinados em condições naturais nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (Presente trabalho).	72
QUADRO 7.	Resultados das infecções por <i>E. bovis</i> com culturas de leucócitos bovinos e com sangue de bovinos	88
QUADRO 8.	Resultados da pesquisa de <i>E. bovis</i> em esfregaços sangüíneos de coelhos e caprinos inoculados experimentalmente com suspensão de cultivos celulares de <i>E. bovis</i>	90

## ÍNDICE DAS FIGURAS

	Págs.
FIGURA 1. Registros de <i>E. bovis</i> em infecções naturais de bovinos no continente africano, oriente médio e Sri Lanka (Dados de vários autores)	13
FIGURA 2. Registros de <i>E. bovis</i> em infecções naturais de bovinos no continente americano (Dados de FLOCH <i>et al.</i> , 1972 e MASSARD & MASSARD, 1982)	14
FIGURA 3. Mórula de <i>E. bovis</i> em linfócito; esfregaço de sangue periférico de bovino. Coloração de Giemsa (Oc. 10X, obj. 100X)	57
FIGURA 4. Mórula de <i>E. bovis</i> em leucócito mononuclear; esfregaço de sangue periférico de bovino. Coloração de Giemsa (Oc. 10X, obj. 100X)	58
FIGURA 5. Aparência de uma reação positiva observada por imunofluorescência direta de cultivo de leucócitos. As células infectadas com <i>E. bovis</i> estão fluorescentes (Oc. 10X, obj. 40X)	64

	Págs.
FIGURA 6. Registros de <i>E. bovis</i> em infecções naturais de bovinos nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (Presente trabalho)	70

## RESUMO

O agente etiológico da ehrlichiose bovina, *Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936), causador da doença também conhecida como "Nopi", "Nofel" ou Mal da orelha no continente africano, é assinalado pela primeira vez em bovinos do Brasil, nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. A riquetsia em questão foi diagnosticada em células mononucleares de esfregaços sanguíneos e impressões de órgãos de bovinos, determinando baixas parasitemias mesmo durante a fase febril da doença quando estudada experimentalmente.

O levantamento realizado para identificação dos hemoparasitos, em 296 bovinos com até 1 ano de idade, procedentes de 12 municípios, examinados através esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, determinou a prevalência de *E. bovis* em 9,8%; ocorrendo em infecções simples ou mistas com *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*.

A esplenectomia de bovinos exacerbou infecções inaparentes por *E. bovis*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale*, *Eperythrozoon wenyonii* e *Eperythrozoon tejanodes*.

Leucócitos obtidos a partir de sangue bovino desfibrinado, cultivados "in vitro" em tubos de Leighton com lâminulas, incubados à temperatura de 37°C, permitiram evidenciar a multiplicação de *E. bovis* no citoplasma de leucócitos.

A viabilidade infectiva dos microrganismos provenientes do cultivo "in vitro" foi comprovada pela infecção experimental em bovinos inoculados com estas amostras.

Os antígenos particulados de *E. bovis* obtidos a partir de cultivos celulares, e inoculados em coelho induziram a produção de soro imune específico, o qual após conjugação com isotiocianato de fluoresceína, permitiu sua utilização no diagnóstico da *E. bovis* pelo teste de imunofluorescência direta (IFD).

O teste de imunofluorescência direta demonstrou ser metodologicamente mais eficiente e de rápida execução, quando comparado com o método convencional de coloração pelo Giemsa.

Ovinos, cães, coelhos e caprinos foram refratários à infecção por *E. bovis*, quando inoculados experimentalmente com sangue ou suspensão de cultivos de leucócitos, contendo *E. bovis*.

Infestações experimentais de bovinos com *Amblyomma cajennense*, determinaram que ninfas desta espécie de carrapato, quando alimentadas no estágio larval, em bovinos portadores da infecção, são capazes de transmitir *E. bovis* a bovinos negativos à este agente etiológico. Impressões de ninfas de *A. cajennense* nestas condições, quando examinadas pe-

la imunofluorescência direta (IFD) resultaram positivas à *E. bovis*.

Os sinais clínicos observados em animais portadores de *E. bovis* foram febre, enfartamento de linfonodos periféricos, apatia, anorexia e emagrecimento. Nos estudos hematológicos foram constatados: leucocitose monocítica e linfocítica, eosinopenia, e grande quantidade de monócitos vacuolados. Estes achados permitem um diagnóstico presuntivo de ehrlichiose bovina. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado inicialmente em esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa e confirmado pelo método de imunofluorescência direta.

Em condições naturais *E. bovis* foi encontrada em bovinos nas épocas de maior intensidade populacional de carrapatos, bem como os sinais clínicos foram melhor observados em animais debilitados.

## SUMMARY

The aetiological agent of bovine ehrlichiosis, *Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936) known in Africa as "Nopi", "Nofel" or Ear Sickness is reported for the first time in Brazil, in the States of Rio de Janeiro and Minas Gerais. The diagnosis of the rickettsial disease was confirmed by finding the parasites in mononuclear cells on blood smears and visceral impressed slides from cattle. Low numbers of parasites were observed even during fever periods of the infection transmitted experimentally.

A survey based on blood smears from 296 calves of 12 regions of these two States were stained on Giemsa and a prevalence of 9,8% for *E. bovis* was found, including single or multiple infections with *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*.

Calves apparently negative when splenectomized became positive to *E. bovis*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale*, *Eperythrozoon wenyoni* and *Eperythrozoon tejanodes*.

Leukocytes cultures obtained from defibrinated



cattle blood performed in Leighton tubes, incubated at 37°C, allowed the demonstration of multiplication of *E. bovis* in cytoplasm of leukocytes. The viability of microorganisms from "in vitro" cultivation was established by reproducing the infection by experimental inoculation of cattle.

*E. bovis* particulate antigens obtained from cell cultures and inoculated into rabbits induced the production of sera immune specific responses. The conjugation of the sera immune specific with fluorescein isothiocyanate permitted their utilization for diagnosis of *E. bovis* by the direct immunofluorescence test.

This method was more efficient and faster than the conventional blood smears stained on Giemsa.

The inoculation of sheep, dog, rabbit and goat with blood and cell cultures did not establish the infection.

Nymphal stages of *Amblyomma cajennense*, fed during larval stage on infected cattle, transmitted the disease. Direct immunofluorescence tests performed with nymphal stages of *A. cajennense* were also positive.

Clinical signs in cattle infected with *E. bovis* were fever, enlargement of peripheral lymphonodes, apathy, loss of appetite and loss of weight. Hematological studies showed monocytic and lymphocytic leukocytosis, eosinopaenia and large number of vacuolated monocytes. These signs permit a presumptive diagnosis of *E. bovis*. Laboratory diagnosis, can be performed using blood smears stained on

Giemsa and confirmed by direct immunofluorescence test.

Under natural conditions *E. bovis* was found in cattle during the seasons when tick populations were high. Clinical signs were more evident in debilitated cattle.

## INTRODUÇÃO

Entre os hemoparasitos comumente encontrados no sangue de bovinos sul-americanos, transmitidos por carrapatos, tem sido relacionados protozoários do gênero *Babesia* Starckovici, 1893, representados por *Babesia bigemina* (Smith & Kilbourne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) (= *B. argentina*). Também duas espécies de *Trypanosoma* Gruby, 1893, representadas pelo *Trypanosoma vivax* Ziemann, 1905 e *Trypanosoma theileri* Laveran, 1905, que são transmitidos mecanicamente ou biologicamente por dípteros hematófagos.

Entre as riquetsias, a espécie *Anaplasma marginale* Theiler, 1910, tem alta prevalência e ampla distribuição geográfica neste continente, sendo considerada de relevada importância em medicina veterinária, visto causar frequentemente nos animais infectados, severo quadro clínico representado por anemia, febre e icterícia, determinando alto índice de morbidade e mortalidade. Em muitas regiões, a infecção pode ser diagnosticada em 100% dos bovinos, principalmente quando avaliados sorologicamente.

No Brasil, além das espécies anteriormente citadas de *Babesia*, *Trypanosoma* e *Anaplasma* Theiler, 1910, tem-se conhecimento também de *Eperythrozoon wenyoni* Adler & Ellenbogen, 1934 e de *Eperythrozoon teganodes* Hoyte, 1962, em bovinos esplenectomizados, bem como, infecções por *Anaplasma centrale* Theiler, 1911 e por *Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936).

Considerando-se a importância dos hemoparasitos na epidemiologia das doenças que acometem os bovinos, programas de pesquisas tem sido desenvolvidos, com a finalidade de contribuir no controle destes patógenos, que representam certo entrave ao desenvolvimento da bovinocultura; sendo responsáveis por grandes perdas, principalmente entre os animais importados.

O presente trabalho teve como objetivo determinar, através de esfregaços sanguíneos, a prevalência e distribuição de *Ehrlichia bovis* em bovinos de diversas localidades do Estado do Rio de Janeiro, como também estudar as infecções mistas de *E. bovis* e outros hemoparasitos encontrados. Paralelamente foram desenvolvidos estudos experimentais sobre a infecção por *E. bovis* nas espécies de carrapatos, *Boophilus microplus* Canestrini, *Anocentor nitens* (Neumann) e *Amblyomma cajennense* (Fabricius), encontradas naturalmente em bovinos. Ênfase especial foi dada aos aspectos imunológicos em animais portadores e experimentalmente inoculados com *E. bovis*. A partir do cultivo "in vitro" desta riquetsia, o antígeno pu-

rificado de *E. bovis* obtido, foi utilizado no desenvolvimento do teste de imunofluorescência direta, com o intuito de diagnosticar animais portadores e acompanhar o desenvolvimento das infecções experimentais.

## REVISÃO DA LITERATURA

Entende-se como gênero *Ehrlichia* Moshkovski, 1945 os microrganismos riquetsiais, de aspecto semelhante, capazes de parasitar leucócitos circulantes de vários animais domésticos e silvestres.

Estas riquetsias foram observadas pela primeira vez, em células mononucleares, no sangue periférico de cães experimentalmente infestados, por carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) na Argélia (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935). A partir de então, vários autores assinalaram a ocorrência do gênero *Ehrlichia* em diversos animais, tais como: ovinos (LESTOQUARD & DONATIEN, 1936); bovinos (DONATIEN & LESTOQUARD, 1936a); cobaios (MOSHKOVSKI, 1937); pequenos roedores (TYZZER, 1938); caprinos e bisão (ENIGK, 1942); pom-bos (CANHAM, 1943); suínos (DONATIEN & GAYOT, 1943) e eqüinos (GRIBBLE, 1969).

Algumas espécies, como *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935), são específicas ao hospedeiro, determinando síndrome bem definida. Por outro lado, o agente da ehrlí-

chiose eqüina, *Ehrlichia equi* (Gribble, 1969), é capaz de determinar infecções inaparentes em ovinos, caprinos, muares, cães, gatos e primatas, embora afete severamente os eqüinos.

Os caracteres básicos atualmente utilizados na separação das espécies parasitas de ruminantes, são o tipo de célula parasitada (mononucleares ou polimorfonucleares), a distribuição geográfica e o prognóstico da doença.

#### 2.1. Posição Taxonômica:

Até o presente, não há nenhuma dúvida quanto à natureza riquetsial do gênero *Ehrlichia*. DONATIEN & LESTOQUARD (1937a, 1937b, 1938), telataram que as riquetsias parasitas de monócitos se diferenciavam de outras espécies do gênero *Rickettsia* da Rocha Lima, 1916, por particularidades relativas ao local de parasitismo, morfologia, número de parasitos e pelo prognóstico da doença. As outras riquetsias, até então conhecidas, tinham como local de parasitismo, as células epiteliais e endoteliais do homem e dos animais domésticos.

PHILIP (1953), revendo a nomenclatura taxonômica das riquetsias patogênicas para os vertebrados, caracterizou as diversas espécies até então conhecidas, agrupando-as nos gêneros *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Cowdria* Moshkovski, 1947 e *Coxiella* philip, 1948. Este mesmo autor considerou que os caracteres atribuídos às famílias propostas por MOSHKOVSKI (1945), não foram suficientes, admitindo que seria mais sa-

tisfatório considerá-las como tribu, sugerindo a seguinte classificação:

Ordem: Rickettsiales Gieszczkiewicz, 1939

Família: Rickettsiaceae Pinkerton, 1936

Gêneros: *Rickettsia* da Rocha Lima, 1916

*Ehrlichia* Moshkovski, 1945

*Cowdria* Moshkovski, 1947

*Coxiella* Philip, 1948

Assim sendo, o gênero *Rickettsia*, ficou constituído de sete espécies, o gênero *Ehrlichia* de três espécies e os gêneros *Cowdria* e *Coxiella* como monotípicos e segundo o autor, a associação com artrópodes deveria ser mais importante que a patogenicidade para os vertebrados, na composição taxonômica da família.

Numa nova tentativa, PHILIP (1957), classificou as riquetsias na ordem Rickettsiales, em quatro famílias: Rickettsiaceae; Chlamydiaceae; Bartonellaceae e Anaplasmatocae. A família Rickettsiaceae foi caracterizada por parasitos intracelulares ou intimamente associados com células teciduais diferentes de eritrócitos; transmitidos por artropodes e raramente de localização extracelular nestes hospedeiros. Esta família foi dividida em três tribus: Rickettsieae, adaptada à artropodes e hospedeiros vertebrados, incluindo o homem. A tribu Ehrlichieae com parasitos patogênicos para mamíferos, exceto para a espécie humana e a tribu Wolbachieae como simbioses em invertebrados.



A tribu Ehrlichieae formada por três gêneros: *Ehrlichia*, parasito transmitido por carrapatos transovarianamente e com localização em monócitos circulantes no hospedeiro vertebrado. *Cowdria*, como parasito não transmitido transovarianamente e de localização em células endoteliais do hospedeiro vertebrado. Finalmente *Neorickettsia* transmitido por um trematódeo, patogênico principalmente para canídeos. No gênero *Ehrlichia* foram consideradas três espécies *E. canis*, *E. bovis* e *Ehrlichia ovina* (Lestoquard & Donatien, 1936).

Mais tarde, a classificação da tribu Ehrlichieae foi novamente modificada por PHILIP (1974), onde considerou apenas as espécies *E. canis* e *Ehrlichia phagocytophila* (Foggie, 1951). Apesar de considerar as espécies *E. bovis* e *E. ovina* como "incerta sedis", incluiu-as na mesma tribu, embora para os parasitos morfológicamente semelhantes a *Ehrlichia* que parasitam granulócitos, tivesse sido proposto por DAVIES, ODEGAARD & COOPER (1972) e KRAUSS, DAVIES, ODEGAARD & COOPER (1972), serem incluídos no gênero *Cytoecetes* Tyzzer, 1938, opinião esta aceita por diversos pesquisadores atualmente.

As diferentes espécies de parasitos da tribu Ehrlichieae foram reunidas no Quadro 1, bem como os dados relativos aos hospedeiros, transmissores, distribuição geográfica e o tipo de célula parasitada.

## 2.2. Morfologia e Ciclo Biológico:

A técnica de coloração utilizada para microscopia

QUADRO 1. Espécies de Ehrlichieae comumente encontradas em mamíferos, transmissores, distribuição geográfica e tipo de célula parasitada. (Dados de vários autores).

ESPÉCIE	HOSPEDEIROS	TRANSMISSORES	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	CÉLULA PARASITADA
<i>E. bovis</i>	bovinos, ovinos <sup>1</sup> macacos <sup>1</sup>	<i>Hyalomma</i> sp. <i>A. variegatum</i> <i>A. cajennense</i> <sup>2</sup>	África, Sri Lanka, Guadalupe, Brasil	mononucleares
<i>E. ovina</i>	ovinos	<i>R. bursa</i> <sup>3</sup> <i>R. evertsi</i>	África Ásia (Turquia)	mononucleares
<i>E. canis</i>	canídeos	<i>R. sanguineus</i>	Cosmopolita	mononucleares e polimorfonucleares
<i>E. equi</i>	cavalos, muares, ovinos <sup>1</sup> , caprinos <sup>1</sup> , cães <sup>1</sup> , macacos <sup>1</sup> e gatos <sup>1</sup>	não determinado	Estados Unidos da América (Califór- nia)	neutrófilos e eo- sinófilos princi- palmente.
<i>C. phagocytophila</i>	ovinos, bovinos bisão, caprinos <sup>1</sup> , cobaios <sup>1</sup> , camundon- gos <sup>1</sup>	<i>I. ricinus</i>	Europa	neutrófilos e eosinófilos
<i>C. ondiri</i>	bovinos e ovinos	não determinado	África (Quênia)	neutrófilos e eosinófilos

1 - transmissão experimental com sangue

2 - transmissão experimental por exposição dos carrapatos (presente trabalho)

3 - transmissão experimental com inoculação de macerado dos carrapatos

ótica destas riquetsias, tem sido desde 1935, o Giemsa ou May-Grünwald-Giemsa. De acordo com o estágio de desenvolvimento do parasito, as formas intracitoplasmáticas coram-se em vermelho, lilás ou azul púrpura. DONATIEN & LESTOQUARD (1936a), caracterizaram *E. bovis* como agrupamentos de microrganismos em colônias circulares, elípticas ou poligonais, com bordos arredondados, porém de dimensões variadas. As colônias maiores mediram 11  $\mu\text{m}$  e as menores 1 - 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sendo constituídas de pequenas formações, com diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , incontáveis à microscopia ótica, formando uma massa de aspecto granuloso. Ainda, estes autores (1938, 1940b), ao compararem morfológicamente *Colelesiota conjunctivae* (Coles, 1931); *E. canis*; *E. bovis*; *E. ovina*; *Cowdria ruminantium* (Cowdry, 1925) e *Rickettsia conorii* Brumpt, 1932, concluíram que estas riquetsias são semelhantes morfológicamente, apresentando três estágios de desenvolvimento. Comparando estes parasitos aos agentes do grupo linfo-granuloma-psitacose, os estágios foram denominados: corpos iniciais, para as grandes massas homogêneas, as constituídas de pequenos agrupamentos de microrganismos foram nomeadas corpos elementares; as formações maiores que os corpos iniciais, foram designadas mórulas, sendo provavelmente resultantes da separação de uma grande inclusão, e consideradas como formas transitórias. Ainda, os mesmos autores relataram que as mórulas foram encontradas frequentemente nas infecções

por *E. bovis*, *E. canis* e *E. ovina* e raras em *C. ruminantium* e *R. conorii*.

NYINDO, RISTIC, HUXSOLL & SMITH (1971), tiveram sucesso ao cultivar "in vitro" *E. canis*, em culturas primárias de monócitos de cão. As culturas deste microrganismo foram infectivas quando inoculadas em cães susceptíveis, constituindo um mecanismo de propagação deste parasito. Durante este período, ao observar as fases do ciclo evolutivo de *E. canis* nas culturas de monócitos, notaram que a infecção se inicia pelos pequenos corpos elementares, que começam a desenvolver, formando os corpos iniciais e eventualmente dando origem à mórula. Este desenvolvimento apoiou-se nas observações de monócitos infectados das culturas, quando identificado pelo Giemsa e por imunofluorescência direta.

Recentemente, WOLDEHIWET & SCOTT (1982) cultivaram *Cytoecetes phagocytophila* (Foggie, 1951) em culturas de sangue total heparinizado de ovinos, complementados com Meio 199 contendo tampão HEPES, 10% de soro fetal bovino e penicilina. Observaram, que após 4 horas de incubação a 37°C, o número de células infectadas aumentou, bem como o número de parasitos por célula. A inoculação destas culturas de *C. phagocytophila* em ovinos determinou a doença nos animais.

Estudos ultraestruturais em microscópio eletrônico foram realizados notadamente para *E. canis* por SIMPSON (1972); HILDEBRANDT, CONROY, Mc KEE, NYINDO & HUXSOLL (1973); e para *C. phagocytophila* (= *E. phagocytophila*) por TUOMI & VON

BONSDORFF (1966). Ao identificar o agente causal da Febre pe-  
tequial bovina, *Cytoecetes ondiri* Krauss, Davies, Odegaard &  
Cooper, 1972, observaram que o corpo inicial aparentemente ho-  
mogêneo à microscopia ótica, é composto de pequeníssimas par-  
tículas agrupadas, quando observados com auxílio da microsco-  
pia eletrônica.

### 2.3. Distribuição Geográfica:

*E. bovis* foi descrita por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a) na Argélia, em bovinos infestados experimentalmente com carrapatos adultos do gênero *Hyalomma* Koch procedentes do Irã. Em seguida, DE KOCK, VAN HEERDEN, DU TOIT & NEITZ (1937) e DELPY (1937, assinalaram esta riquetsiose em infecções naturais e experimentais na África do Sul e Irã respectivamente. No Congo e Chade (antiga África Equatorial Francesa), a ocorrência de *E. bovis*, foi referida por MALBRANT, BYRON & RAPIN (1939). Ainda DONATIEN & LESTOQUARD (1940a), observaram *E. bovis* em infecções naturais associada a *Theileria* Betencourt, França & Borges, 1907, em bovinos na Argélia. ROUSSELOT (1943), observou em condições experimentais em bovinos taurinos e zebuinos esplenectomizados, procedentes de Bamaco (Mali), a infecção por *E. bovis*, onde estava associada a *A. marginale* e *B. bigemina*. GIRARD & ROUSSELOT (1945) no Mali, relacionaram *E. bovis* como responsável por uma doença conhecida vulgarmente pelos pastores sudaneses como "Nofel". Da

mesma forma, FINELLE (1958), relacionou a ehrlichiose bovina aos surtos de uma doença denominada "Nopi" em Oubanghi-Chari (Republica Centro Africana), acometendo principalmente animais debilitados. No Sri Lanka, SENEVIRATNA & DHANAPALA (1963), observaram também o parasitismo em 3 bovinos. No Senegal, *E. bovis* foi assinalada por RIOCHE (1966), na região do Cabo Verde, observando a ocorrência da doença de forma bem definida. FLOCH, CAPPONI & GIROUD (1972) suspeitaram da presença desta riquetsia em bovinos da Ilha de Guadalupe (região das Pequenas Antilhas), e MASSARD & MASSARD (1982), assinalaram a presença de *E. bovis* em bovinos no Brasil, em associação também, com *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. Na região do Palé na Costa do Marfim, PIERRE (1983) referiu-se à ehrlichiose bovina, acometendo rebanhos zebus, ocorrendo a infecção por *E. bovis* em associação também com *B. bigemina* e *A. marginale*. Os dados referentes à distribuição geográfica de *E. bovis* foram reunidos e podem ser observados nas Figs. 1 e 2.

#### 2.4. Animais Susceptíveis:

Durante os estudos experimentais, DONATIEN & LESTOQUARD (1936a), estabeleceram a infecção por *E. bovis* à bovinos e ovinos através de inoculações de sangue infectado. Os mesmos autores (1940a), trabalhando com cepas argelinas de *E. bovis*, observaram que os bovinos inoculados com sangue in-



Fig. 1. Registros de *E. bovis* em infecções naturais de bovinos no continente africano, oriente médio e Sri Lanka (Dados de vários autores).

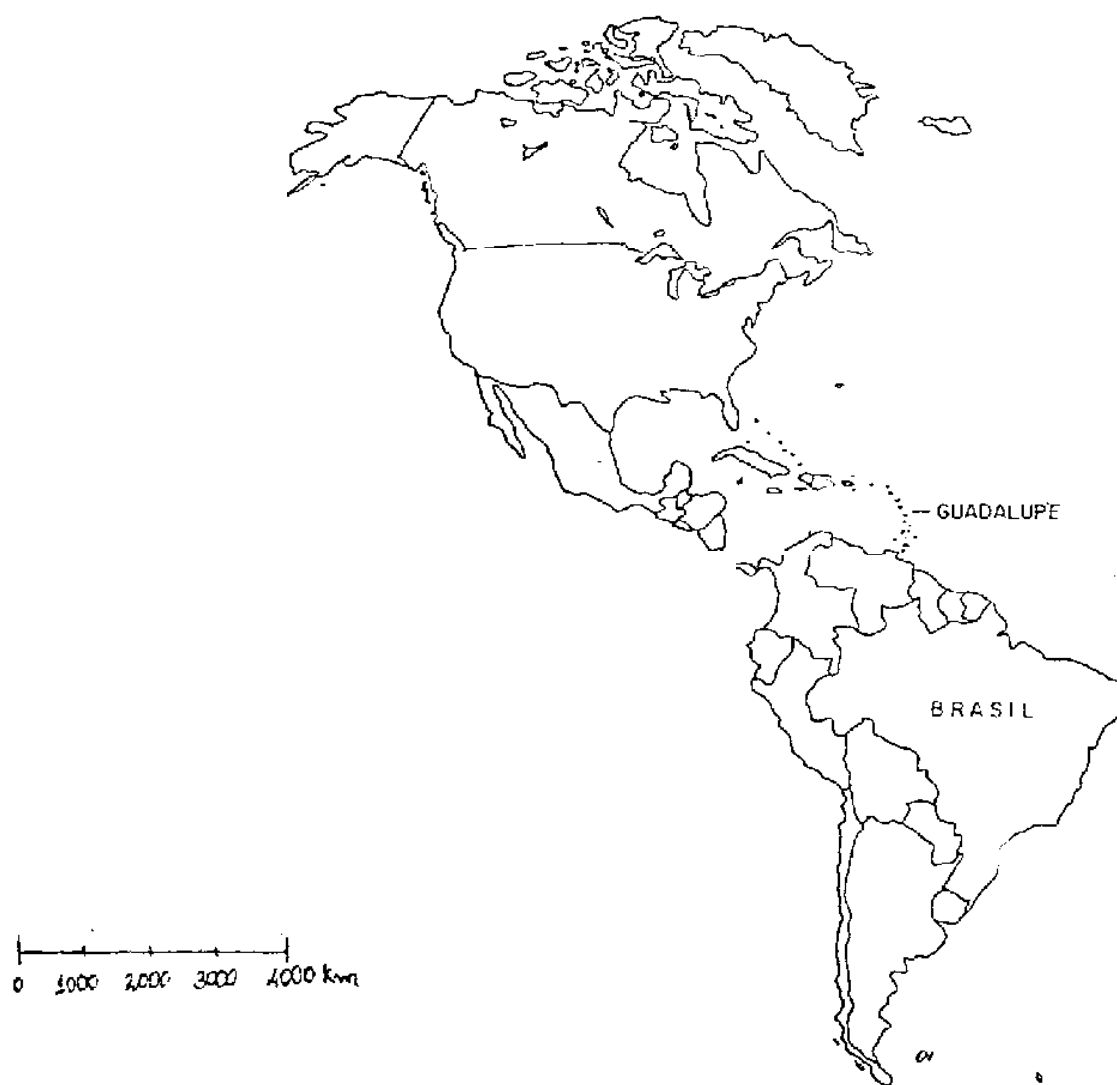


Fig. 2. Registro de *E. bovis* em infecções naturais de bovinos no continente americano (Dados de FLOCH et al., 1972 e MASSARD & MASSARD, 1982).



fectado, não tiveram em todas as passagens, a presença desta riquetsia. Nos ovinos infectados, o parasito foi pouco patogênico, e somente foi diagnosticado após esplenectomia dos animais. Ao mesmo tempo observaram que este parasito achava-se em associação com *Anaplasma ovis* Lestoquard, 1924 e *Babesia ovis* (Babés, 1892).

GIRARD & ROUSSELOT (1945), observaram que inoculações em bovinos jovens, de sangue de animais doentes portadores de *E. bovis*, não reproduziram os sintomas da infecção natural por eles anteriormente observados. Porém, os animais inoculados tiveram infecção por *E. bovis*, acompanhada apenas por hipertrofia dos linfonodos periféricos e hipertermia.

Quando sangue infectado com *E. bovis*, foi inoculado por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a), em macacos da espécie *Macaca sylvana* (= *Macacos innus*), determinou o aparecimento de febre, anorexia e depressão por 11 dias. A parasitemia foi acompanhada em esfregaços sangüíneos, e persistiu por 17 dias, seguindo-se um período de convalescência.

ENIGK (1942), observou que após inocular sangue de um bisão procedente do Canadá em um bovino esplenectomizado, ocorreu o aparecimento de parasitos no sangue periférico, por ele identificado como *E. bovis*, concluindo que a infecção possa ter tido origem do bisão, embora este animal estivesse na Alemanha há três anos.

As inoculações de sangue positivo para *E. bovis*, realizadas por RIOCHE (1966), em caprinos, por via endovenosa,

sa, em camundongos, por via intraperitoneal, e por via intraperitoneal e intracardiaca em cobaios, resultaram negativas.

## 2.5. Aspectos Clínicos e Patológicos:

O agente etiológico da ehrlichiose bovina, *E. bovis* foi inicialmente observado em condições experimentais por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a) quando comparavam a biologia das cepas argelinas e iranianas de *Theileria*. Estes autores observaram hipertermia irregular, ultrapassando algumas vezes 40°C, acompanhada de apatia e emagrecimento em bovinos previamente debilitados, não sendo registrados casos de morte entre os animais estudados. Em um dos animais, sacrificado durante a fase febril, foi constatado esplenomegalia e hipertrofia dos linfonodos, pequeno aumento da serosidade pleural e peritoneal e apreciável aumento da serosidade pericárdia. Os microrganismos foram encontrados em grande número de células mononucleares nos pulmões, bem como, rins, fígado, baço, sangue periférico, linfonodos, adrenais, miocárdio e em capilares da pele e meninges. Em condições experimentais, o período de incubação variou de 14 a 15 dias e o período febril foi aproximadamente de uma semana.

Os mesmos autores (1940a), diagnosticaram em bovinos argelinos, em condições naturais, a ocorrência de *E. bovis*, em esfregaços sangüíneos, muitas vezes associada à infecções por protozoários do gênero *Theileria*. As inocula-

ções de sangue infectado em bovinos, não determinaram em todas as passagens, a presença de *E. bovis* em esfregaços de sangue e de parenquima hepático. Em algumas destas situações *E. bovis* apareceu isoladamente, determinando períodos térmicos prolongados, sem sinais clínicos da doença.

Em bovinos taurinos e zebuínos esplenectomizados procedentes de Bamaco (Mali), ROUSSELOT (1943), observou a presença de *E. bovis*. Os sintomas foram caracterizados por hipertermia em platô, hipertrofia dos linfonodos periféricos e alterações de equilíbrio. Quando a morte ocorreu, foi precedida de queda brusca da temperatura corporal dos animais. À necrópsia, ROUSSELOT (1943), constatou acentuada emaciação. Os animais em estudo tiveram infecção intercorrente com *A. marginale* e *B. bigemina*, não sendo possível incriminar *E. bovis* como o único agente etiológico responsável pela morte destes bovinos.

Em Baguineda, Mali, *E. bovis* foi relacionada por GIRARD & ROUSSELOT (1945), como o agente etiológico de uma doença de caráter grave capaz de afetar bovinos e ovinos, sendo conhecida pelos pastores daquela região, como "Nofel". Os animais doentes na fase aguda, tiveram hipertermia e hipertrofia dos linfonodos periféricos associadas a manifestações nervosas; muitas vezes os animais andavam em círculo. Nos casos mais graves, a morte sobrevinha em 12 a 36 horas, após o início dos sintomas e raramente ocorreu a cura dos animais. O primeiro sinal clínico observado e também o mais

característico da doença, foi o chamado "sinal da orelha". A orelha direita ou esquerda, raramente as duas, declinava-se ao longo da região preparotídea, acompanhada de torcicolo. Da mesma maneira, a cabeça pendia para o lado mais atingido, com frequentes movimentos de agitação. Uma forma superaguda também foi observada, sobretudo nos animais jovens, ocorrendo morte súbita, precedida de agitação do animal, sialorréia e do sinal da orelha. O animal afetado andava em círculo, caindo abruptamente, sobrevivendo a morte em poucas horas. Na forma subaguda, chamou a atenção o sinal da orelha e a posição do pescoço. Os sinais clínicos podiam desaparecer em 24 a 48 horas, ocorrendo a recuperação clínica dos animais. A forma crônica foi caracterizada por hipertermia, acompanhada de parasitemia, sem sinais clínicos. Às vezes, os linfonodos superficiais, sobretudo os preparotídeos, apresentavam-se hipertrofiados, sendo o diagnóstico confirmado pelo encontro dos parasitos nos esfregaços de sangue periférico.

As lesões observadas por GIRARD & ROUSSELOT (1945), caracterizavam-se por hipertrofia e edema acentuado dos linfonodos preparotídeos. Excepcionalmente observaram hidropicárdio, ocorrendo entretanto, um acentuado aumento de volume do líquido cefaloraquidiano, comprimindo a medula espinhal. Ao nível das orelhas, nenhuma lesão aparente pode ser constatada, sugerindo os autores, que o sinal da orelha constitui um ato reflexo do animal na tentativa de diminuir

a tensão na área preparotídea, uma vez que, a região torna-se dolorida ao toque, no animal ainda vivo. Os demais órgãos não tiveram alterações macroscópicas relevantes. Os índices de morbidade variaram de 20 a 40% e o de mortalidade atingiu a 21% dos animais, principalmente nas épocas chuvosas.

De uma forma semelhante, FINELLE (1958), diagnosticou *E. bovis*, relacionando-a aos sintomas de uma doença de bovinos, que ocorria especialmente na época das chuvas e era conhecida como "Nopi" na região de Oubanghi-Chari (República Centro Africana). Assim como, GIRARD & ROUSSELOT (1945), o autor observou na forma aguda da doença, o sinal da orelha acompanhado de intenso prurido auricular, hipertermia e congestão das mucosas nasal e oculares. A forma subaguda foi relacionada com emaciação mais ou menos acentuada dos animais, anorexia e hipertrofia dos linfonodos periféricos. Na forma crônica a enfermidade foi diagnosticada em animais debilitados e infestados por carrapatos. Ainda referiu-se ao fato de que, *E. bovis* tem sido considerado um parasito pouco patogênico, mas que, em condições desfavoráveis ou em associação com doenças intercorrentes, pode provocar uma doença grave e mesmo a morte dos animais infectados.

No Sri Lanka, SENEVIRATNA & DHANAPALA (1963), diagnosticaram *E. bovis* em dois bovinos com infecção intercorrente com parasitos do gênero *Babesia*. Em um terceiro animal, o diagnóstico foi feito em exame laboratorial de roti-

na, não sendo evidenciada nenhuma alteração clínica do animal.

RIOCHE (1966, 1967) assinalou um surto de *E. bovis* em 10 de 12 bovinos importados da Tunísia para o Senegal. A doença foi observada na forma superaguda em 2 animais sobrevivendo a morte em 12 horas. Nos animais foram observadas fases de excitação, sonolência, crises tetaniformes com a queda dos animais, que apresentaram olhos revirados, salivação e movimento de pedalagem. Na forma aguda os sintomas mais frequentes foram dificuldades de locomoção, paralisia aparente e opistótono permanente. Estes sintomas foram também acompanhados do sinal da orelha e de hipertermia, ocorrendo a morte dos animais após o 4º dia. Os achados à necropsia, se caracterizaram por congestão intensa dos órgãos, podendo se estender por todas as serosas, observando-se também hidropericárdio e derrame citrinoso nas cavidades pleural e peritoneal. Ainda foram observadas lesões hemorrágicas em diferentes órgãos e hipertrofia dos linfonodos. As lesões histopatológicas encontradas foram caracterizadas por congestão e hemorragia no cérebro, cerebelo, medula espinhal, pulmões e fígado. Nos rins, além de congestão e hemorragias de caráter difuso, observou ainda, necrose dos túbulos uriníferos, considerando-as como de valor no diagnóstico pós-morte da ehrlichiose bovina. Ainda RIOCHE (1966, 1967) relatou que as alterações hematológicas, foram caracterizadas por monocitose intensa e eosinopenia entre outras, constituindo um

quadro patognomônico para a ehrlichiose bovina.

O diagnóstico presuntivo de *E. bovis* associado a infecção por *Theileria* foi feito por FLOCH *et al.* (1972), em bovinos na Ilha de Guadalupe. Os sinais clínicos observados nos animais, caracterizaram-se por febre, acentuada anemia, meningo-encefalite, acessos tetaniformes, movimentos de pedalagem e fadiga, porém não foram observados casos de aborto nem adenopatias nos animais doentes. Em vacas recém-paridas, a doença foi caracterizada por uma síndrome hemorrágica, acompanhada por disfunção hepática e acentuada anemia.

MASSARD & MASSARD (1982), observaram em bovinos com sinais de debilidade orgânica e anemia, bem como em animais em condições aparentemente normais, a presença de *E. bovis* em leucócitos mononucleares. A infecção foi observada em 28,2% de 39 bovinos examinados através de esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa. A associação de *E. bovis* com *B. bigemina*, *B. bovis* e/ou *A. marginale*, ocorreu em 15,3% dos animais estudados.

Também conhecido como Mal da orelha ou Nofel pelos criadores Peul, foi descrito por PIERRE (1983) a infecção por *E. bovis* na Costa do Marfim. A doença caracterizou-se por ptose do pavilhão auricular, piorréia e epífora. Foi observado ainda adenite parotidiana acompanhada de uma forma de paralisia aguda e mortal. Os animais zebus foram os mais afetados, embora o parasito tenha sido observado também em bo-

vinos taurinos assintomáticos. A doença foi considerada de implantação recente principalmente após a introdução de bovinos zebus da região do Mali e Alto Volta. A afecção em 1978 atingiu grandes proporções, acometendo 10 a 50% e às vezes 100% dos rebanhos zebus. A mortalidade variou de 5 a 25% entre os animais doentes e o parasitismo por *E. bovis* foi observado em 10% dentre 200 esfregaços sanguíneos examinados.

#### 2.6. Diagnóstico e Diagnóstico Diferencial:

O diagnóstico de ehrlichiose bovina tem sido baseado no encontro das formas do parasito, em esfregaços de sangue periférico e de órgãos dos animais, corados pelo método de Giemsa ou May-Grünwald-Giemsa e pelos sinais clínicos apresentados.

Na fase crônica da doença, ou mesmo em condições experimentais seja por inoculações de sangue ou de macerado de carrapatos, o diagnóstico tem sido feito com auxílio de esfregaços sanguíneos, dado ao fato de não serem observados sinais clínicos, porém em alguns casos os únicos sinais observados foram hipertrofia dos linfonodos, acompanhada ou não de hipertermia (DONATIEN & LESTOQUARD, 1936a, 1940a; DELPY, 1937; DE KOCK *et al.*, 1937; GIRARD & ROUSSELOT, 1945; FINELLE, 1958; SENEVIRATNA & DHANAPALA, 1963; RIOCHE, 1966 e MASSARD & MASSARD, 1982).

Em algumas regiões do Mali e Senegal, sinais de



febre, ptose da orelha e enfartamento de linfonodos periféricos, tem sido atribuídos à ehrlichiose bovina (GIRARD & ROUSSELOT, 1945; FINELLE, 1958 e RIOCHE, 1966). Ainda, RIOCHE (1966) referiu que as alterações hematológicas por ele encontradas em animais infectados por *E. bovis*, tais como: leucocitose, onde a maioria dos monócitos tinham o citoplasma vacuolado, numerosos linfoblastos, monoblastos, leucócitos em mitose e eosinopenia, constituem um quadro que pode ser considerado quase patognomônico para o diagnóstico da infecção por *E. bovis*.

Com referência ao diagnóstico diferencial da ehrlichiose bovina com outras doenças que afetam os bovinos, DONATIEN & LESTOQUARD (1936a, 1940a), compararam a evolução e a patogenia determinada por *E. bovis* e *C. ruminantium*. Concluíram que *E. bovis* causou nos bovinos uma doença de evolução mais lenta que a determinada por *C. ruminantium*, conferindo nos animais afetados, um estado de premunição. O desenvolvimento da infecção estudada em ovinos, determinou a morte por *C. ruminantium*, enquanto *E. bovis* causou uma infecção inaparente nestes animais.

GIRARD & ROUSSELOT (1945), ao estudarem a "Nofel" no Mali, exploraram exaustivamente o diagnóstico diferencial de *E. bovis* com outras hemoparasitoses, principalmente com a coudriose, theilerioses e mesmo com a "Tieoudé" (uma doença determinante de um quadro de encefalite, mas de caráter não transmissível por inoculações sanguíneas e de etiologia

não determinada).

As lesões observadas por RIOCHE (1967) foram comparadas e diferenciadas daqueles determinadas por *C. ruminantium*, bem como em relação as lesões observadas anteriormente por PELLISSIER, TROQUEREAU & TRINQUIER (1950), causadas por uma riquetsiose considerada diferente de *E. bovis* e observada em bovinos do Congo (Brazzaville), onde foram encontradas lesões hepáticas e miocardite intersticial.

PIERRE (1983) referiu-se ao diagnóstico diferencial de *E. bovis* em relação a theileriose, tripanosomose e cowdriose, considerando que os sintomas exibidos pelos animais exigem um exame laboratorial para evidenciação precisa do agente etiológico.

## 2.7. Transmissão por carrapatos:

Os carrapatos ixodídeos tem sido incriminados como vetores de muitas riquetsias parasitas do homem e dos animais domésticos. Com relação à *E. bovis*, os estudos realizados por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a), infestando experimentalmente bovinos com carrapatos adultos, do gênero *Hyalomma*, alimentados nos estádios de larva e ninfa em bovinos iranianos, levaram estes autores a considerarem estes ixodídeos, como os transmissores de *E. bovis*. Da mesma forma, NEITZ & JANSEN (1952), na Africa do Sul, transmitiram *E. bovis* junto com protozoários *Theileria annulata* (Dschunkowsky & Luhs,

1904), utilizando carrapatos adultos da espécie *Hyalomma excavatum* Koch, provenientes do Irã.

OS bovinos afetados pela enzootia de *E. bovis* em Baguineda, Mali, estavam parasitados por carrapatos das espécies *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Rhipicephalus evertsi* Neumann e principalmente *Hyalomma savignyi* Gervais, porém GIRARD & ROUSSELOT (1945) não obtiveram sucesso nas tentativas de transmissão com estas espécies de carrapatos.

FINELLE (1958), ao associar o surto de uma doença por ele estudada, à *E. bovis*, observou que os animais estavam infestados principalmente por *A. variegatum* e *Boophilus decoloritus* Koch. O mesmo autor verificou que após a eliminação dos carrapatos, não mais foram observados novos casos da doença.

Ao estudar a ehrlichiose bovina no Senegal, RIOCHE (1966) coletou em bovinos portadores de *E. bovis* carrapatos *A. variegatum*, macerou-os em solução salina balanceada de "Hank" e inoculou a suspensão em bovinos por via subcutânea. Após 16 a 29 dias, os animais inoculados estavam positivos para *E. bovis* quando esfregaços sangüíneos foram examinados. Desta maneira, o autor sugeriu que estes ixodídeos possam estar relacionados com a transmissão desta riquetsia naquela região.

O exame realizado por FLOCH et al. (1922) nos bovinos da Ilha de Guadalupe, permitiu identificar que os animais dos rebanhos por eles estudados, eram portadores de *Boo-*

*philus microplus* Canestrini e *A. variegatum*. Ao usar tetraciclina, banhos carrapaticidas sistemáticos nos animais e o emprego da vacina Richov, observaram um aumento da resistência dos animais da região à provável riquetsiose.

PIERRE (1983) observou que os animais zebus acometido por *E. bovis* na Costa do Marfim estavam infestados por carrapatos, sendo 90% do gênero *Amblyomma* e 10% *Hyalomma*.

Os registros da literatura referentes aos carrapatos estudados como prováveis transmissores de *E. bovis* a bovinos, podem ser observados no Quadro 2.

QUADRO 2. Registros referentes a carrapatos ixodídeos envolvidos na transmissão de *E. bovis* a bovinos (Dados de vários autores).

AUTOR (ES)	TRANSMISSOR	TRANSMISSÃO	ESTÁDIO EVOLUTIVO	LOCAL
DONATIEN & LESTOQUARD (1936a)	<i>Hyalomma</i>	(+) <sup>1</sup>	adultos	Argélia
GIRARD & ROUSSELOT (1945)	<i>A. variegatum</i>	(-) <sup>2</sup>	?	Mali
	<i>R. evertsi</i>	(-) <sup>2</sup>	?	
	<i>H. savignyi</i>	(-) <sup>2</sup>	?	
NEITZ & JANSEN (1952)	<i>H. excavatum</i>	(+) <sup>1</sup>	adultos	África do Sul
FINELLE (1958)	<i>A. variegatum</i>		?	Mali
	<i>B. decoloratus</i>			
RIOCHE (1966)	<i>A. variegatum</i>	(?) <sup>3</sup>	?	Senegal
FLOCH <i>et al.</i> (1972)	<i>B. microplus</i>	(?) <sup>3</sup>	?	Guadalupe
	<i>A. variegatum</i>	(?) <sup>3</sup>	?	
PIERRE (1983)	<i>A. variegatum</i>	(?) <sup>3</sup>	?	Costa do Marfim
	<i>Hyalomma</i>	(?) <sup>3</sup>	?	
MASSARD (pre-sente trabalho)	<i>B. microplus</i>	(-) <sup>1</sup>	larva a adultos	Brasil
	<i>A. nitens</i>	(-) <sup>1</sup>	larva a adultos	
	<i>A. cajennense</i>	(-) <sup>1</sup>	larva	
		(+) <sup>1</sup>	ninfa	
		(-) <sup>1</sup>	adultos	

1 - infestação experimental

2 - inoculação de macerado de carrapatos

3 - encontrado sobre os animais

? - não determinado

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios da Área de Parasitologia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e nos laboratórios de ARBOVIRUS II, Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Para o diagnóstico das hemoparasitoses, foram examinados 296 bovinos de 1 a 12 meses de idade, de ambos os sexos, criados em sítios ou fazendas, em geral em regime extensivo e/ou semi extensivo. A maioria dos animais eram mestiços principalmente com holandês utilizados em exploração leiteira e procedentes do Estado do Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG). Estes estudos se estenderam pelo período de Agosto de 1980 à Abril de 1984.

### 3.1. Identificação Morfológica dos Hemoparasitos:

A identificação dos protozoários e riquetsias foi ba-

seada nos trabalhos de WENYON (1926); PHILIP (1974); LEVINE (1973); KREIER (1977) e em trabalhos originais das descrições das espécies. Também foram utilizados como referências os trabalhos de NEITZ (1956, 1957, 1967, 1968 a,b,c); LOPES (1976) e MASSARD & MASSARD (1982).

### 3.2. Cultivo de *E. bovis* "in vitro":

O cultivo e isolamento de *E. bovis* foi realizado através de linhagens primárias de leucócitos bovinos.

A metodologia para cultura de leucócitos bovinos foi realizada através da adaptação da Técnica de Cultivo de leucócitos de suínos (HESS, 1960) modificada pelo Laboratório de Virologia da UFRJ (RODRIGUES, 1980).

Os materiais utilizados foram estéreis e rigorosa assepsia foi mantida durante todo o processamento das amostras.

#### 3.2.1. Amostras de Sangue Bovino:

Foi obtido um volume aproximado de 400 ml de sangue bovino por punção direta da veia jugular de bovinos, utilizando-se agulhas calibre 20 adaptada em mangueira de borracha latex, acoplada em balão de vidro, contendo em seu interior pérolas de porcelana. O recipiente de coleta foi mantido sob constante agitação manual até completa desfibrinação do sangue, em seguida conservado à 4°C e transportado para

o laboratório.

### 3.2.2. Obtenção dos leucócitos bovinos:

O processamento de obtenção dos leucócitos foi feito em capela de fluxo laminar. Inicialmente o sangue foi filtrado em gase estéril, retendo-se desta maneira o coágulo formado, e o sangue distribuído em frascos de centrífuga com 200 ml de capacidade e centrifugado a 2000 x g a 4°C, durante 30 minutos, obtendo-se assim 3 camadas distintas: uma inferior, representada pelos eritrócitos, uma intermediária correspondente aos leucócitos e a superior constituída pelo soro sangüíneo.

Com auxílio de uma seringa de vidro de 50 ml de capacidade, munida de uma cânula longa 150 x 14), retirou-se 150 ml da camada correspondente ao soro e transferiu-se para um Erlenmeyer de 250 ml de capacidade, adicionando-se a este soro 2 ml de antibiótico (penicilina + estreptomicina) e 2 ml de fungistático (anfotericina). O soro foi então estocado a 4°C para uso posterior.

Com a mesma seringa, fez-se a aspiração da camada intermediária correspondente aos leucócitos, transferindo-os para tubos de centrífuga com 50 ml de capacidade. Em seguida centrifugou-se a 2000 x g a 4°C durante 60 minutos. De maneira semelhante à anterior, coletou-se a camada de leucócitos transferindo-a para tubos de 50 ml de capacidade, adicionando-se aproximadamente 10 a 20 ml de água destilada estéril pH



7,2, homogeneizando-se delicadamente com uma pipeta durante 30 segundos, para lise dos eritrócitos ainda presentes. Em seguida adicionou-se 20 a 40 ml de PBS pH 7,2 homogeneizando-se mais uma vez por 30 segundos, para recuperação da tonicidade da suspensão, a seguir centrifugando-se a 1000 x g a 4°C por 20 minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento representado pelo lavado de leucócitos, foi adicionado 1 ml de soro e a seguir agitado para homogeneização do mesmo.

#### 3.2.3. Preparo das Culturas de leucócitos:

Os leucócitos obtidos foram transferidos para um Erlenmeyer e a este adicionado 60 ml de soro, anteriormente estocado, sendo a suspensão mantida durante 10 minutos sob constante agitação com auxílio de um agitador magnético, para manutenção dos leucócitos em suspensão.

Após este período, a suspensão foi distribuída em alíquotas de 1,0 ml em tubos de Leighton com lamínula (10 x 30 mm), tampados com rolha de borracha e em garrafas "xarope" (28 cm<sup>2</sup>) com 10 ml da suspensão, tampadas com roscas de baquelite. Após a devida identificação, o material foi incubado a 37°C em estufa.

#### 3.2.4. Inoculação e leitura das culturas de leucócitos:

a) Inoculação:

Os tubos e/ou garrafas de culturas de leucócitos, com 48 horas, foram inoculadas, com suspensão de culturas positivas de leucócitos, de animais positivos, preparadas da mesma forma que a descrita para animais sadios, com 0,1 ml e 1 ml, respectivamente para tubos de Leighton e garrafas xarope.

b) Leitura:

As leituras das lamínulas foram feitas a intervalos médios de 18 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas, através de coloração pelo Giemsa examinando-se em microscópio ótico; e a intervalos de 72 a 96 horas por imunofluorescência direta em microscópio de luz ultra-violeta.

3.3. Identificação de *E. bovis* por imunofluorescência direta (IFD):

Para obtenção de soros imunes, foi utilizada a técnica descrita por KWAPINSKI (1982) modificada nos laboratórios de Imunoparasitologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.3.1. Obtenção de soro imune bovino:

Para obtenção de soro imune foi coletado 20 ml de sangue de um bovino com infecção natural recente de *E. bovis*.

As gamaglobulinas séricas foram precipitadas com solução saturada de sulfato de amônio, conjugadas a fluoresceína e tituladas contra cultivo de leucócitos infectados e não infectados com *E. bovis* em microscópio de luz ultra-violeta.

### 3.3.2. Obtenção de soro imune em Coelho

As amostras de cultivo de *E. bovis* "in vitro" foram inativadas por aquecimento em banho-Maria durante 30 minutos. Após resfriamento, 2 ml da suspensão de antígeno inativado foi emulsificado com 2 ml de Adjuvante completo de Freund. Segundo o esquema do Quadro 3, foi inoculado em coelho. No 3º dia após a última inoculação do antígeno, foi feita uma sangria parcial do coelho, colhendo-se 20 ml de sangue por punção cardíaca. Após a separação do soro, procedeu-se à

QUADRO 3. Esquema de obtenção de soro imune em coelhos Nova Zelândia.

DIA	VIA DE INOCULAÇÃO	VOLUME INOCULADO	MATERIAL INOCULADO	SANGRIA
0	Subcutânea	2 ml	Ag inativado + Adj. Comp. Freund	
3	Subcutânea	1 ml	Ag vivo (cultura)	
6	Endovenosa	0,2 ml	Ag vivo (cultura)	
13	Subcutânea	2 ml	Ag vivo (cultura)	
16	—	—	—	20 ml

obtenção das imunoglobulinas, conjugação e posterior titulação.

### 3.3.3. Obtenção das Imunoglobulinas:

Foram precipitados 5 ml de soro imune anti-*E. bovis* com uma solução saturada de sulfato de amônio,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , a 4°C, sob agitação durante 30 minutos. Após repouso de 4 horas a 4°C, a suspensão foi centrifugada a 1000 x g (4°C) durante 15 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 3 ml de água destilada (pH 6,3) e passado em coluna de 2 cm de diâmetro x 15 cm de comprimento, preparada com Deoxietilaminoetil-celulose (DEAE-Celulose) A-50, pH 6,3. O material foi eluído através de adições sucessivas de tampão fosfato pH 6,3 e o eluato coletado em alíquotas de 3 ml.

As frações proteicas foram identificadas espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 280 nanômetros e agregadas, de modo a fornecer um eluato puro contendo principalmente imunoglobulinas da classe G (IgG).

O eluato obtido foi liofilizado, devidamente identificado e estocado a 4°C.

### 3.3.4. Preparação dos conjugados:

As imunoglobulinas foram dissolvidas na proporção de 30 mg da IgG para 2,5 ml de salina 0,85%. A solução obtida foi adicionada de 0,5 ml de tampão carbonato-bicarbonato 0,5 M pH 9,5 contendo 1 mg de isotiocianato de fluoresceína\* e deixadas a 4°C, sob agitação lenta, durante uma noite.

\* ISOMER I-BBC

O conjugado obtido foi purificado em coluna de cromatografia, com as mesmas dimensões anteriormente descritas, contendo resina Sephadex G-50, grão fino, pH 7,2, através de eluição com solução salina tamponada (PBS) pH 7,2.

#### 3.3.5. Titulação dos conjugados:

O conjugado de imunoglobulinas-fluorocrómio foi titulado através de diluições previamente estabelecidas ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $2 \times 10^{-1}$ ,  $3 \times 10^{-1}$ ,  $4 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ .)

As diluições obtidas foram, separadamente adicionadas aos controles positivos e negativos para *E. bovis*, de modo a se comparar a especificidade e sensibilidade relativas.

#### 3.3.6. Teste de Imunofluorescência direta:

A metodologia seguida foi semelhante para os antígenos originários de lâminulas com tapete celular de leucócitos parasitados e não parasitados, lâminas feitas com sedimento da suspensão das culturas de leucócitos, esfregaços sangüíneos, esfregaços e impressão de órgãos de animais, e esfregaços de órgãos de carrapato.

Os testes de imunofluorescência foram feitos com os conjugados *anti-Ehrlichia* de origem bovina e *anti-Ehrlichia* procedentes de coelho imunizado.

##### a) Em lamínulas com cultivo de leucócitos:

As lamínulas dos tubos de Leighton dos cultivos de leucócitos foram coletadas entre 72 e 96 horas de incubação

e deixadas secar à temperatura ambiente, e a seguir fixadas em acetona por 10 minutos e deixadas secar.

Após a fixação, as lamínulas com o tapete celular de leucócitos foram acondicionadas individualmente em tubos de ensaio, fechados com rolha de borracha, devidamente identificados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso.

b) Em sedimento de culturas de leucócitos:

Após a retirada das lamínulas dos tubos de Leighton, a suspensão foi transferida para tubos e centrifugada a  $4^{\circ}\text{C}$  a  $1000 \times g$  durante 15 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e com o sedimento foram feitos esfregaços em lâminas, deixadas secar ao ar e em seguida fixadas em acetona por 10 minutos.

Após a secagem foram devidamente acondicionadas, identificadas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

c) Em esfregaços sanguíneos, impressões de órgãos de animais e carrapatos:

Feito o esfregaço ou impressão de órgãos em lâminas, o material foi deixado secar, à temperatura ambiente, sendo fixado em acetona por 10 minutos. Deixado secar, identificado e estocado como os anteriormente descritos.

d) Técnica da imunofluorescência direta:

No momento de uso, as lâminas e lamínulas estocadas, foram deixadas em câmara úmida à temperatura ambiente até o equilíbrio da temperatura.

O conjugado *anti-Ehrlichia*, previamente titulado, foi adicionado sobre as lamínulas e/ou lâminas (2 para cada diluição) de modo a cobrir toda a sua extensão, sendo em seguida incubadas a 37°C durante 30 minutos e após lavadas com solução salina tamponada (PBS) pH. 7,2. O material foi rapidamente imerso por duas vezes consecutivas e posteriormente deixado por 10 minutos na solução tamponada. Após a secagem, as lamínulas foram montadas em lâminas com glicerina para imunofluorescência tamponada a 50%, com PBS, mantendo-se o tapete celular voltado para baixo. As lâminas foram cobertas com lamínulas em glicerina a 50%. As leituras foram feitas em microscópio ZEISS (Fotomicroscópio III) para imunofluorescência, com lâmpada HBO 200.

Os resultados positivos foram evidenciados pela presença de fluorescência no citoplasma das células infectadas com *E. bovis*.

OS registros morfológicos e de imunofluorescência de *E. bovis* foram realizados em microscópio ótico e em microscópio de luz ultra-violeta com filme Ektachrome Kodak, 35 mm, 64 ASA, 19-DIN.

3.4. Procedência, manutenção e finalidade dos animais utilizados:

3.4.1. Bovinos:

No Estado do Rio de Janeiro (RJ), foram examinados

278 bovinos de 10 municípios e em 2 municípios do Estado de Minas Gerais (MG), em divisa com o Estado do Rio de Janeiro, foram examinados 18 bovinos.

Os animais examinados no Estado do Rio de Janeiro procederam dos municípios de Angra dos Reis, Barra Mansa, Barra do Piraí, Friburgo, Itaguaí, Petrópolis, Resende, Rio Claro, Rio de Janeiro e Valença. No Estado de Minas Gerais, foram examinados bovinos dos municípios de Rio Preto e Itamonte (Planalto do Parque Nacional de Itatiaia). A localização dos municípios nos Estados do RJ e MG pode ser observada na Figura 6.

Cinco bezerros com 8 meses de idade, machos procedentes da Fazenda do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, criados em regime semi-extensivo foram esplenectomizados para conhecimento dos hemoparasitos daquele rebanho. Dois deles foram medicados com diamidinas aromáticas após a comprovação da infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* em esfregaços sangüíneos. Estes animais foram acompanhados diariamente através de esfregaços sangüíneos, temperatura retal e exame clínico. Os animais que morreram foram necropsiados e foram feitas impressões dos órgãos para exames por IFD e pela coloração de Giemsa. O mesmo foi realizado com 2 bezerros de 8 meses de idade procedentes de região indeterminada do Estado de Minas Gerais.

Um bezerro girholando (n° 158), macho, com 3 meses de idade, naturalmente infectado com *E. bovis*, procedente da Fazenda do Ermo, Rio Claro (RJ), foi incorporado aos estudos



laboratoriais, em janeiro de 1981. Inicialmente este animal foi mantido no Biotério da Unidade de Pesquisa em Patologia Animal-EMBRAPA, km. 47, identificado sob o nº 16. Após um ano de acompanhamento foi transferido para a Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da UFRRJ, recebendo o nº 158. Em seguida foi esplenectomizado, tratado com diamidinas aromáticas como profilático para babesioses. Durante 2 anos, este animal serviu como portador de *E. bovis* utilizando-se sangue para inoculações, preparação de culturas de leucócitos infectados e ainda para alimentação de carrapatos, sendo acompanhado através esfregaços sangüíneos, controle de temperatura retal e desenvolvimento ponderal. Após a esplenectomia sempre que necessário foi feito tratamento babesicida.

Para os estudos de transmissão de *E. bovis*, por inoculações de sangue infectado, inoculações de culturas de leucócitos infectados com *E. bovis* obtidas "in vitro" e exposições a carrapatos, foram utilizados 11 bovinos machos esplenectomizados procedentes de criações localizadas no Campus da UFRRJ e 4 bezerros não esplenectomizados procedentes do Município do Rio de Janeiro onde exames periódicos de animais desta propriedade nunca revelou a presença de *E. bovis*. Antes dos animais serem incorporados aos experimentos, foram acompanhados diariamente por um período mínimo de 20 dias, através de exames microscópicos diários de esfregaços de sangue periférico, observações da temperatura retal, exames clíni-

cos, e previamente pulverizados com produtos carrapaticidas piretróides sintéticos. Estes animais receberam na véspera da cirurgia 1 dose de diamidina aromática e 1 segunda dose 3 dias após a cirurgia. Após a esplenectomia foram examinados por 15 dias diariamente, mostrando-se negativos à *E. bovis*, foram incorporados aos experimentos.

Os bezerros utilizados nos testes laboratoriais foram mantidos em estábulos de alvenaria fechados, da Estação Experimental de Itaguaí (EEI)-Pesagro-Rio, mantendo-se condições de isolamento para estes estudos.

A alimentação dos bovinos jovens até 2 meses de idade consistiu de leite bovino natural e ração balanceada apropriada. A partir desta idade os animais foram desmamados e receberam ração balanceada, verde constituído de capim nã-pier picado, *Penisetum purpureum*, procedente de capineira, além de farelo de trigo.

#### 3.4.2. Ovino e caprino:

Para as infecções experimentais de *E. bovis* foi utilizado ainda um ovino macho, adulto, procedente da criação do Biotério da Unidade de Pesquisa em Patologia Animal (UPPA)-EMBRAPA, para inoculação de sangue infectado com *E. bovis*. Este ovino foi esplenectomizado, sendo acompanhado microscopicamente através de esfregaços sangüíneos, temperatura retal e exames clínicos por período de 90 dias. Este animal foi mantido em baia de alvenaria da UPPA, durante todo o pe-

ríodo de observação, sendo alimentado com ração balanceada e verde picado. Também 2 caprinos machos, irmãos, com 15 dias de idade, nascidos e criados no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro foram utilizados em estudos de transmissão de *E. bovis*, com culturas de leucócitos infectadas, sendo transferidos para as instalações da EEI-Pesagro-Rio e mantidos em condições de isolamento junto com a mãe. Estes animais foram acompanhados através de esfregaços sanguíneos, controle da temperatura retal, e exames clínicos por período superior a 90 dias. Da mesma forma que os demais ruminantes, receberam aleitamento natural complementado por ração balanceada e verde picado.

#### 3.4.3. Cães:

Para estudos experimentais com inoculação de sangue infectado por *E. bovis* foram utilizados ainda 4 cães machos adultos, sem raça definida, procedentes do município do Rio de Janeiro. Estes animais foram mantidos na Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em gaiolas de arame, recebendo arroz cozido misturado com ração balanceada e acompanhados através esfregaços sanguíneos e temperatura retal por período de até 90 dias.

#### 3.4.4. Coelhos:

De uma pequena criação doméstica localizada em Sero-

pédica-Itaguaí, foram adquiridos 3 coelhos jovens, machos da raça Nova Zelândia com 2.500 g de peso corporal. Um deles foi mantido como controle e os outros 2 foram utilizados em estudos imunológicos e infecção com *E. bovis*. Foram também mantidos nas instalações da EEI-Pesagro-Rio em baía de alvenaria fechada, recebendo como alimento capim angola (*Brachiaria mutica*) e ração apropriada.

### 3.5. Infecções experimentais com *E. bovis*:

#### 3.5.1. Inoculação de sangue infectado por *E. bovis* em bovinos:

Tentando-se estabelecer a infecção por *E. bovis* a outros animais, foi inoculado sangue de animais infectados por *E. bovis*, via endovenosa e via subcutânea em bovinos jovens.

Para inoculações com sangue infectado de *E. bovis* foram utilizados 3 bezerros esplenectomizados com 25 a 30 dias de idade procedentes da EEI. Um dos animais recebeu por via endovenosa 30 ml de sangue do bovino n° 158, portador da infecção por *E. bovis* e, após 7 dias, 5 ml de sangue da mesma procedência por via subcutânea. O segundo bezerro recebeu, durante três dias alternados, 5 ml de sangue do mesmo animal por via subcutânea. O terceiro animal deste grupo permaneceu como controle, não tendo sido inoculado.

Dois bovinos com 5 meses de idade procedentes da Fazenda do IZ da UFRRJ e esplenectomizados, receberam 3 inocula-

ções de 20 ml de sangue desfibrinado via endovenosa do bovino nº 158 com intervalos de 7 dias.

Todos os animais inoculados com sangue foram acompanhados diariamente através de exames microscópicos de esfregaços de sangue e temperatura retal.

### 3.5.2. Inoculação de sangue infectado por *E. bovis* em ovino:

Um ovino macho adulto recebeu 7 dias após a esplenectomia, por via endovenosa, 20 ml de sangue de um bovino portador de *E. bovis*. Sete dias após, foi reinoculado com 5 ml de sangue do mesmo doador via subcutânea. Durante 3 meses, este ovino foi examinado, tomando-se diariamente a temperatura retal e examinando-se microscopicamente os esfregaços sanguíneos.

### 3.5.3. Inoculação de sangue infectado por *E. bovis* em cães:

Dois cães adultos, sem raça definida, foram inoculados por via endovenosa com 10 ml de sangue desfibrinado do bovino nº 158, infectado naturalmente com *E. bovis*; outros dois, também adultos foram inoculados por via subcutânea com 5 ml do sangue proveniente do mesmo animal. Durante 60 dias, os animais foram observados diariamente com tomada de temperatura retal e exame de esfregaços sanguíneos.

3.5.4. Inoculação de culturas de leucócitos bovinos infectadas por *E. bovis* em bovinos:

Foram inoculados três bovinos machos, com aproximadamente 30 dias de idade, não esplenectomizados, com suspensão de cultura de leucócitos infectada com *E. bovis*. O 4º animal deste grupo permaneceu durante 3 meses como controle para avaliações do desenvolvimento em relação aos animais inoculados.

Um dos animais recebeu 2 inoculações endovenosas: uma de 15 ml e outra de 10 ml com intervalo de uma semana. Os outros dois animais, receberam apenas uma inoculação de 10 ml de culturas de leucócitos infectada também por via endovenosa.

Diariamente, foram feitos exames clínicos, esfregaços sangüíneos e verificação da temperatura retal.

3.5.5. Inoculação de culturas de leucócitos bovinos infectadas por *E. bovis* em caprino:

Dos dois caprinos utilizados neste experimento, um deles recebeu um inóculo de 10 ml de cultura de leucócitos bovinos infectada com *E. bovis* por via intraperitoneal e o outro permaneceu como controle. Vinte dias após a inoculação, o mesmo animal foi reinoculado com 5 ml de cultura obtida "in vitro" por via endovenosa.

Durante todo o experimento, estes animais foram acompanhados microscopicamente através de esfregaços sangüíneos e verificação da temperatura retal e desenvolvimento ponderal

por período de 4 meses.

3.5.6. Inoculação de culturas de leucócitos bovinos infectadas por *E. bovis* em coelhos:

Dois coelhos brancos foram inoculados por via subcutânea e endovenosa conforme o modelo do Quadro 3 e examinados diariamente através do exame de esfregaços sangüíneos pelo Giemsa e também acompanhados 2 vezes por semana pelo exame de esfregaços sangüíneos pela técnica de IFD, durante 60 dias.

3.5.7. Infecção experimental por *E. bovis* através de exposições a ixodídeos:

a) Criação e manutenção dos carrapatos:

Fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini), *Anocentor nitens* (Neumann) e *Amblyomma cajennense* (Fabricius), foram colhidas em bovinos e eqüídeos nas diferentes regiões estudadas do Estado do Rio de Janeiro.

O método para criação dos carrapatos mono e trioxenos foi baseado na descrição de NEITZ, BOUGHTON & WALTERS (1971) modificado, utilizando-se seringas de plástico descartáveis para manutenção das colônias de carrapatos.

Durante todas as fases não parasíticas, os carrapatos foram sempre mantidos em câmara climatizada com temperatura controlada a 27°C e umidade relativa acima de 80%.

Após a identificação específica, foram distribuídas em grupos de 4 a 6 fêmeas em placas de petri (10 cm de diâme-

tro) e levadas a câmara climatizada para realização da postura.

Quinze dias após o início da postura, os ovos foram cuidadosamente homogeneizados e pesados em lotes de 0,5 g. Cada grupo de ovos foi então acondicionado em seringas descartáveis adaptadas para criação de carrapatos, tendo a sua extremidade anterior cortada e fechada com tecido "nylon ou opala" com auxílio de fita crepe adesiva ou esparadrapo, devidamente identificadas e mantidas em câmara climatizada.

b) Infestação dos bovinos:

Foram utilizados 12 bovinos para este teste. As infestações dos bovinos foram realizadas na orelha dos animais, empregando-se sacos de tecido brim providos de aba larga na extremidade inferior, albergando toda a orelha do animal. Este saco foi aderido ao hospedeiro com auxílio da pasta de Ulna, que consiste numa mistura de óxido de zinco (30 g), gelatina (40g), água destilada (60 g) e glicerina (30 ml). No momento do uso, a pasta foi aquecida em banho-Maria e em seguida espalhada com espátula à base da orelha do animal, ajustando-se cuidadosamente o saco de pano, reforçando-se a vedação com esparadrapo. Após a aderência do saco de pano ao hospedeiro, os carrapatos contidos nas seringas foram injetados no seu interior e a extremidade superior do saco cuidadosamente costurada à mão.

I - Infestações de bovinos com os carrapatos monoxenos, *B. microplus* e *A. nitens*:

Aproximadamente 10 a 15 dias após a eclosão das lar-



vas, o conteúdo de 2 seringas, correspondente a 20.000 larvas aproximadamente, foram expostas a bovinos comprovadamente positivos para *E. bovis* pelo exame de esfregaços de sangue. Diariamente, foi feito o controle do desenvolvimento das larvas, ninfas e adultos pela abertura da extremidade superior do saco aderido à orelha do bovino. As fêmeas ingurgitadas, coletadas desta geração, foram levadas ao laboratório e a mesma metodologia anterior foi seguida.

Em uma segunda fase, as larvas oriundas destas fêmeas, foram expostas a bovinos previamente considerados negativos para *E. bovis* após exames microscópicos periódicos, procurando-se com isso, comprovar a possível ocorrência da transmissão transovariana de *E. bovis* com estas espécies de carrapatos.

Os animais infestados com carrapatos foram acompanhados diariamente por meio de observações clínicas, exame dos esfregaços sangüíneos e observação da temperatura retal.

## II - Infestação de bovinos com carrapato trioxeno *A. cajennense*:

Da mesma maneira que nas espécies de carrapatos anteriores, as larvas de 2 seringas, com idade de 10 a 15 dias, foram expostas à orelha de bovinos portadores de *E. bovis*.

Diariamente, por períodos de 30 dias, foram feitas observações da temperatura retal do animal, esfregaços sangüíneos e o saco de pano foi cuidadosamente aberto para exa-

me dos carrapatos. Do quarto ao sexto dia, as larvas ingurgitadas e soltas do hospedeiro foram coletadas. Em seringas apropriadas, as larvas foram agrupadas em número de 50 e levadas à câmara climatizada nas mesmas condições anteriormente descritas, para a criação dos carrapatos. Após a ecdise, 200 a 1500 ninfas com idade de 15 a 20 dias, foram expostas de maneira semelhante à bovinos previamente considerados não infectados com *E. bovis*, visando-se com isso, observar a transmissão transestadial de *E. bovis* com ninfas de *A. cajennense*. Da mesma forma, 200 ninfas foram colocadas na orelha de bovinos portadores de *E. bovis*.

Após completa repleção, as ninfas alimentadas em hospedeiros positivos e negativos a *E. bovis* foram coletadas e separadas em grupos de 20 por seringa, mantidas em câmara climatizada até a muda para adulto.

Os exemplares adultos com 15 a 20 dias após ecdise foram separados em número de 30, sendo 20 fêmeas e 10 machos, em seguida expostos da mesma maneira à orelha de 2 bovinos. Um dos bovinos portador de *E. bovis* o outro negativo à infecção por *E. bovis*.

Todos os animais infestados artificialmente com os carrapatos foram acompanhados diariamente através do exame de esfregaços sangüíneos e da temperatura retal, por período médio de 60 dias. Periodicamente também foram avaliados através imunofluorescência direta.

### 3.6. Coleta e análise das amostras de sangue e órgãos:

Para a evidenciação dos protozoários e riquetsias foram feitos esfregaços sanguíneos utilizando-se em geral a primeira gota de sangue, obtida por punção de vasos superficiais da orelha, que foram corados pelo método de Giemsa.

Utilizando-se 3 gotas da solução corante estoque de Giemsa\* para 1 ml de solução tampão pH 7,2, os esfregaços previamente fixados em metanol foram imersos em vasos Coplin contendo a solução corante diluída, por período de 1 a 2 horas.

O exame microscópico dos esfregaços sanguíneos corados, foi realizado com ocular 10X e objetiva de 100X embebido em óleo de imersão, em microscópio Wild M20, dando-se especial atenção aos bordos laterais e parte final dos esfregaços, onde ocorre maior concentração dos leucócitos. A leucometria específica foi feita nestes mesmos esfregaços e em centrífuga de microhematócrito\*\* foram efetuadas as leituras de volume globular das amostras de sangue colhidas em tubos capilares heparinizados.

Durante o desenvolvimento dos experimentos foram ainda coletadas amostras de sangue da veia jugular dos animais em tubos de Vacutainer contendo EDTA para hemogramas, processados em "Coulter Counter" Veterinário\*\*.

\* Merck-Darmstadt

\*\* Centrífuga Microhematócrito FANEM

\*\*\* Coulter Counter eletrônico mod. DN VET.

### 3.7. Uso de Quimioterápicos:

Os animais utilizados para estudos experimentais foram em algumas ocasiões medicados com drogas específicas.

#### 3.7.1. Diamidinas aromáticas (Babesicidas):

Produtos à base de acetato de diaminazina foram empregados na dose de 4 mg/kg de peso por via intramuscular profunda, utilizando-se 2 doses do medicamento com intervalo de 3 dias. A ação destas drogas em relação aos hemoparasitos foram registradas.

#### 3.7.2. Antibióticos:

Os animais esplenectomizados foram medicado com produtos à base de penicilina G benzatina, penicilina G procaína, penicilina G potássica cristalina, sulfato dehidroestreptomicina e sulfato de estreptomicina nas doses terapêuticas recomendadas, em 2 doses por via intramuscular, com intervalo de 5 dias como profilático à infecções operatórias.

Produtos a base de cloridrato de oxitetraciclina foram também empregados em alguns animais na dose de 10 mg/kg de peso vivo durante 3 a 5 dias consecutivos, visando-se o controle de *Anaplasma* e *E. bovis*.

#### 3.7.3. Ixodicidas :

As infestações por carrapatos foram controladas com

o emprego de produto piretróide à base de decametrina a intervalos regulares de 21 dias, de acordo com a finalidade do animal em estudo. O produto foi diluído em água limpa na proporção de 25 ppm, homogeneizado e aspergido de maneira uniforme em todo o corpo do animal.

### 3.8. Soluções e suspensões:

As soluções e suspensões utilizadas foram preparadas no Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia da UFRJ de acordo com RODRIGUES (1980).

#### 3.8.1. Solução de Antibióticos:

##### a) Penicilina:

Penicilina	sódica	cristalina	.....	10 <sup>6</sup>	UI
H <sub>2</sub> O	bidest.	estéril	q.s.p.	.....	50,0 ml

(20.000 UI/ml)

##### b) Estreptomicina:

Sulfato	de	estreptomicina	.....	1,0	g
H <sub>2</sub> O	bidest.	estéril	q.s.p.	.....	50,0 ml

(0,02 g/ml)

Prepará-las assepticamente;

Misturá-las volume a volume;

Usar 1,0 ml da mistura para cada 100,0 ml de solução ou meio de cultura (10<sup>5</sup> UI de penicilina

por litro e 0,1 g de estreptomicina por litro).

### 3.8.2. Solução de Fungistático:

Anfotericina (Fungizona Squibb)	.....	50,0	mg
H <sub>2</sub> O bidest. estéril q.s.p.	.....	200,0	ml
		(0,25	mg/ml)

Preparar assepticamente;

Usar 1,0 ml da solução para cada 100,0 ml da solução ou meio de cultivo (0,0025 mg/ml)

### 3.8.3. Solução Salina Tamponada:

"Phosphate Buffer Solution" (PBS)

É uma solução de NaCl 0,15 M, adicionada de diluente fosfato 0,005 M, pH 7,2

NaCl	.....	8,50	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)	.....	0,56	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.....	0,14	g
H <sub>2</sub> O dest. q.s.p.	.....	1.000,00	ml

Distribuir em alíquotas de 90,0 ml;

Esterilizar em autoclave (120°C/20 minutos);

Deixar esfriar e estocar a 4°C.

### 3.8.4. Glicerina Tamponada 50%:

Glicerina para microscópio fluorescente	...	10,0	ml
PBS (pH 7,2)	.....	10,0	ml

3.8.5. Solução Salina 0,85%:

NaCl ..... 17,0 g  
H<sub>2</sub>O dest. q.s.p. .... 2.000,0 ml  
Agitar para dissolver o sal;  
Estocar a 4°C.

3.8.6. Solução Saturada de Sulfato de Amônio: ..

Sulfato de amônio ..... 750,0 g  
H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p ..... 1.000,0 ml  
Manter sob agitação magnética durante 2 a 3 dias;  
Deixar repousar e eliminar o sal não dissolvido;  
Adicionar ao sobrenadante uma solução de Soda Normal,  
ajustando o pH para 7,0.

3.8.7. Suspensão de "DEAE" - Celulose:

DEAE-Celulose ..... 20,0 g  
Soda N/2 ..... 1.000,0 ml  
Após sedimentação, proceder com novas lavagens, por 3  
vezes, com a mesma solução;  
Lavar com água destilada até obtenção de um sobrena-  
dante límpido;  
Lavar com solução fosfatada, pH 6,3, até que o sobre-  
nadante da suspensão adquira este pH (6,3);  
Usar colunas com 2,0 cm de diâmetro, na razão de 15,0  
cm de altura para cada 5,0 ml de soro a passar;

Conservar as colunas a 4°C até o momento do uso, com excesso de solução fosfatada pH 6,3 na parte superior.

3.8.8. Suspensão de "SEPHADEX" - G50 grão fino:

"SEPHADEX" - G50 .....	20,0	g
H <sub>2</sub> O dest. q.s.p .....	1.000,0	ml

Esperar sedimentar e prosseguir com mais duas lavagens;

Efetuar novas lavagens com PBS pH 7,2 até que o sobrenadante da suspensão adquira este pH (7,2);

Usar coluna de 2,0 cm de diâmetro de modo a preencher 3/4 de sua altura;

Conservar a 4°C até o momento do uso, cobrindo a parte superior da coluna com PBS pH 7,2.

3.8.9. Solução tampão Carbonato-bicarbonato 0,5 M:

Solução A:

Carbonato de Sódio .....	2,1	g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p. ....	50,00	ml

Solução B:

Bicarbonato de Sódio .....	2,65	g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p. ....	50,00	ml

Misturar A e B;

Ajustar o pH, para 9,5 (se inferior a este, adicio-



na-se a sol. B e se superior, a sol. A).

3.8.10. Solução Fosfatada, pH 6,3:

Solução A:

Fosfato monopotássico ..... 2,38 g

H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. .... 1.000,00 ml

Solução B:

Fosfato dissódico ..... 1,56 g

H<sub>2</sub>O deionizada ..... 500,00 ml

Misturar 773,0 ml da sol. A com 227,0 ml da sol. B;

Ajustar o pH para 6,3 (se inferior a este adicionar a sol. A e se superior, a sol. B).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Identificação Morfológica de *E. bovis*:

O exame de esfregaços sangüíneos possibilitou diagnosticar pela 1ª vez no Brasil a presença de *E. bovis* em células mononucleares do sangue periférico, de um bovino *Bos taurus* (L.), da raça Guernsey, puro de origem, acentuadamente debilitado, com 1 ano de idade, procedente do município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro.

O diagnóstico de *E. bovis* foi efetuado pela presença das mórulas, consideradas como formas características do parasito embora em muitas ocasiões, fosse necessário o exame sangüíneo dos animais por vários dias consecutivos para encontro destas mórulas.

Estas riquetsias apresentam-se em forma de grânulos cocóides, arredondados ou ovais agrupados em colônias, geralmente localizadas em vacúolos no citoplasma da célula hospedeira. A coloração é ligeiramente diferente do núcleo da célula, em tonalidade azul púrpura, lilás ou vermelho (Fig. 3 e 4).

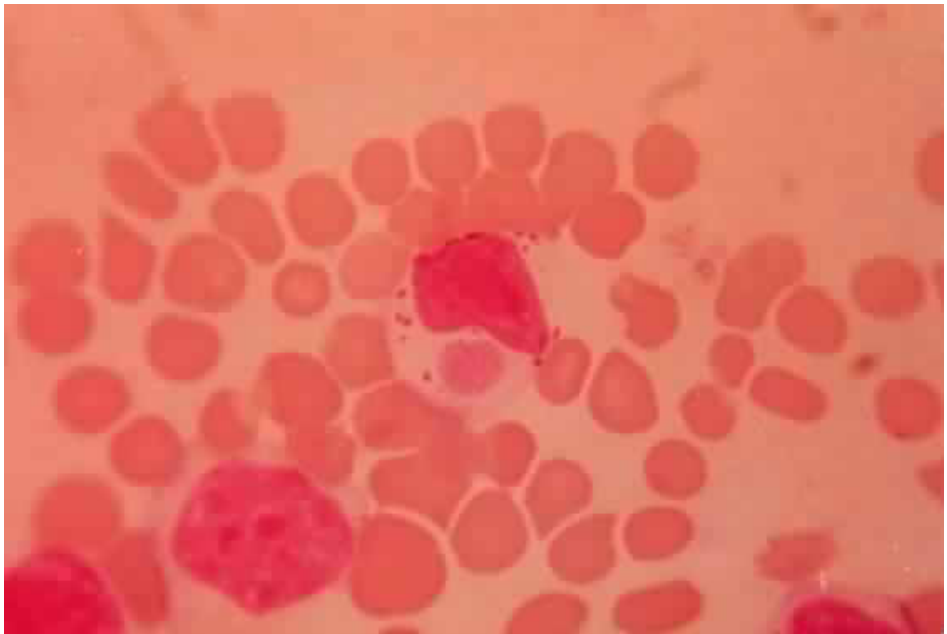


Fig. 3. Mórula de *E. bovis* em linfócito; esfregaço de sangue periférico de bovino. Coloração de Giemsa (Oc. 10X, obj. 100X).



Fig. 4. Mórula de *E. bovis* em leucócito mononuclear; esfregaço de sangue periférico de bovino. Coloração de Giemsa (Oc. 10X, obj. 100X).

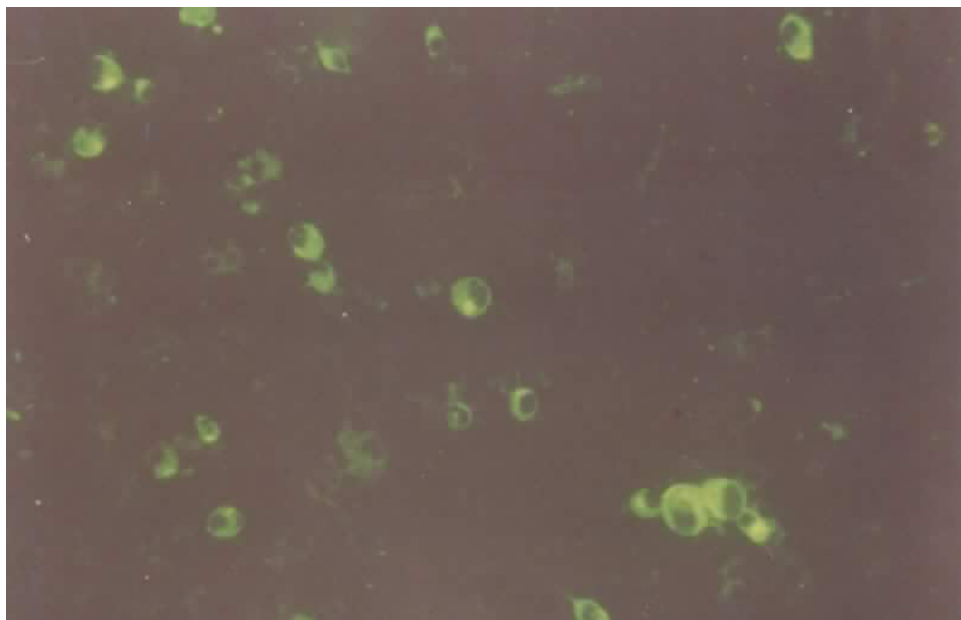


Fig. 5. Aparência de uma reação positiva observada por imuno fluorescência direta de cultivo de leucócitos. As células infectadas com *E. bovis* estão fluorescentes (Oc. 10X, obj. 40X).

As parasitemias por *E. bovis* foram sempre baixas, mesmo na fase aguda, acompanhada por hipertermia, não se observando o aparecimento de mais de uma mórula por célula parasitada.

Nos estudos experimentais, formas semelhantes a corpos iniciais e corpúsculos elementares foram vistas por 3 a 5 dias antes do aparecimento das mórulas, as quais foram evidenciadas entre o 8° e 14° dia após inoculações de sangue infectado ou cultura de leucócitos.

Em esfregaços e impressões de órgãos, de animais previamente conhecidos como portadores da infecção por *E. bovis*, foram encontradas diferentes formas evolutivas deste parasito, sendo observados somente no citoplasma de células mononucleares de órgãos, como o pulmão, rim, fígado, baço e linfonodos. Jamais foram vistas inclusões semelhantes, em esfregaços de endotélio vascular, mesmo após um minucioso e exaustivo exame dos esfregaços.

Essas observações morfológicas determinaram que o parasito em estudo foi *E. bovis* já caracterizada anteriormente por vários autores, destacando-se os trabalhos de DONATIEN & LESTOQUARD (1936a, 1937b, 1938).

Nos casos crônicos, a presença de *E. bovis* pode ser observada por períodos relativamente mais longos do que 13 meses, como foi referido por DONATIEN & LESTOQUARD (1937b), uma vez que um dos animais, ora estudado, aparentemente sadio e esplenectomizado demonstrou a infecção por mais de 36 meses, com a presença de formas sangüíneas de *E. bovis*. Este fato foi con-

siderado como um estado de premunição como o sugerido por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a, 1938, 1940a), assemelhando-se também às referidas para outras formas de riquetsioses como as do grupo tipo exantemático, tipo murino e ainda com as riquetsioses causadas por *C. ruminantium*, *E. canis* e *E. ovina* referidas por DONATIEN & LESTOQUARD (1936b, 1937a, 1940b) .

#### 4.2. Cultivo de *E. bovis* "in vitro":

Em cultura de leucócitos de bovinos infectados com *E. bovis*, foi observado, "in vitro", o desenvolvimento deste microrganismo.

O cultivo celular primário de leucócitos a partir sangue desfibrinado, foi adaptado da técnica modificada por RODRIGUES (1980), utilizada para cultivos de leucócitos suínos, que tem a vantagem de proporcionar um grande volume de cultura, obtendo-se assim, um maior número de lamínulas, contendo os antígenos necessários para os estudos.

As lamínulas dos cultivos primários de leucócitos, assim obtidos e coletados a intervalos de 18, 24, 48, 72 e 96 horas, quando tratadas pelo método de Giemsa, mostraram inclusões intracitoplasmáticas semelhantes àquelas observadas em esfregaços sangüíneos de animais portadores de *E. bovis*. As lamínulas com 72 a 96 horas de incubação mostraram um maior número de células infectadas, indicando haver multiplicação das riquetsias.

Por inoculação de suspensão de cultivo celular de leucócito de bovino infectado, em cultura de leucócito livre do parasito com 48 horas de incubação, foi possível evidenciar inúmeros leucócitos infectados após 24, 48 e 72 horas. Este fato proporcionou um meio de propagação contínua do parasito para estudos deste microrganismo.

Várias tentativas de cultivar parasitos do gênero *Ehrlichia* em meios bacteriológicos e ovos embrionados de pintos, foram realizadas por GIRARD & ROUSSELOT (1945); FOGGIE (1951); BOOL (1959); TUOMI (1967); DAWE, OHDER, WEGENER & BRUCE (1970), THRUSFIELD, SYNGE & SCOTT (1978), sem sucesso. Da mesma forma, inoculações de sangue infectado com *E. bovis* por via intraperitoneal em camundongos, e por via intracardiaca em cobaios, realizadas por RIOCHE (1966) não estabeleceram a infecção a estes animais.

Entretanto, FOGGIE & HOOD (1961) tiveram sucesso na adaptação de uma cepa ovina de *C. phagocytophila* a camundongos e cobaios sem perda da infectividade para ovinos. Ao contrário, foi relatado por DANSKIN & BURDIN (1963) que inúmeras tentativas para infectar camundongos, hamsters, cobaios e coelhos com material de *C. ondiri* tem resultado negativas. Estes mesmos autores também reportaram que a manutenção de *C. ondiri* em ovos embrionados e cultivos do microrganismo em sistema de monocamadas de células renais e de testículo de bovinos e ovinos não determinaram lesões citoplasmáticas e conseqüentemente as inoculações desses materiais



não foram infectivas para bovinos.

NYINDO et al. (1971) foram os primeiros a manter em cultivos primários de monócitos, um organismo ehrlichial, procedente de sangue de cães infectados na fase aguda com *E. canis*. A cultura de monócitos foi complementada com meio mínimo essencial de Eagle (MEM) e 20% de soro canino. O material obtido foi infectivo para cães sensíveis ao parasito, como também, culturas não infectadas poderiam ser infectadas pelos parasitos provenientes de cultura infectada com *E. canis*. O antígeno obtido "in vitro" permitiu estudos estruturais do parasito, bem como a comparação do diagnóstico pelo método de coloração de Giemsa e o teste de imunofluorescência direta.

Após numerosas tentativas, o desenvolvimento de *C. phagocytophila* em cultivos de sangue total de ovino foi realizado por WOLDEHIWET & SCOTT (1982). Os leucócitos separados foram adicionados de Meio 199 em tampão HEPES, ocorrendo um considerável aumento do número de células infectadas entre 4 horas e 24 após a incubação a 37°C. Esta técnica possibilitou um meio de crescimento do organismo, em quantidades suficientes para estudos das propriedades físicas e químicas, como também para produção do antígeno "in vitro" para estudos sorológicos e imunológicos.

#### 4.3. Identificação de *E. bovis* por imunofluorescência direta:

A dificuldade de diagnosticar *E. bovis* através de

esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, seja pela baixa parasitemia, havendo necessidade de um minucioso e demorado exame dos esfregaços, seja pela presença de corpos elementares difíceis de serem diferenciados, levou ao desenvolvimento de um teste de imunofluorescência, a partir dos antígenos obtidos nas culturas "in vitro".

As lamínulas dos cultivos celulares obtidos "in vitro" infectadas por *E. bovis* examinadas por imunofluorescência direta, utilizando-se soro imune anti-*Ehrlichia* obtido de bovino ou soro imune anti-*Ehrlichia* produzido em coelho, e conjugados com fluoresceína, demonstraram a presença do parasito no citoplasma dos leucócitos infectados (Fig. 5).

Esfregaços feitos com o sedimento obtido da centrifugação das culturas de leucócitos infectadas com *E. bovis*, também resultaram positivos ao teste de imunofluorescência direta, devido à presença de leucócitos infectados na suspensão.

Lamínulas com tapete celular de cultura de leucócitos provenientes de animais livres de infecção por *E. bovis* utilizados como controle neste experimento não reagiram em presença dos antissoros anti-*Ehrlichia* marcados, não havendo, assim, emissão de fluorescência.

Da mesma forma, os esfregaços sanguíneos de animais da região do Planalto de Itatiaia, considerados livres de infecção para *E. bovis*, também mostraram-se negativos quando examinados pela técnica de imunofluorescência direta e atra-

vés de coloração pelo método de Giemsa. Em muitas ocasiões, a imunofluorescência direta revelou as inclusões intraleucocíticas nos esfregaços sanguíneos dos animais experimentalmente infectados, mesmo quando o exame pelo método de Giemsa foi negativo (Quadro 4).

QUADRO 4. Resultados dos esfregaços sanguíneos de bovinos infectados experimentalmente com *E. bovis* e positivos nas provas de coloração de Giemsa e IFD, durante 8 semanas com 2 provas semanais.

ANIMAIS	Nº ANIMAIS	INOCULADOS		CONTROLE	
		GIEMSA	IFD	GIEMSA	IFD
esplenectomizados	5	12/16	16/16	0/16	0/16
não esplenectomizados	3	8/16	16/16	0/16	0/16

Numerador - nº de exames positivos  
Denominador - nº de exames realizados

O exame de esfregaços e impressões de órgãos de animais portadores de *E. bovis* que morreram durante os estudos, mostrou ser mais sensível ao teste de imunofluorescência direta, que ao Giemsa. O rim, pulmão, fígado, baço e linfonodos foram os órgãos onde maior número de organismos

foram evidenciados, pela fluorescência direta. Pelo método de Giemsa, o pulmão pareceu estar mais parasitado que o rim.

Os conjugados anti-*Ehrlichia*, de origem bovina e leporina desenvolvidos, não demonstraram diferenças quanto à emissão de fluorescência em lamínulas de cultura. O título para o conjugado de origem bovina foi 1/30 enquanto o procedente do coelho imunizado apresentou o título 1/10. Os resultados da pesquisa de anticorpos, conjugados à fluoresceína originário de bovino infectado e o produzido em coelhos são mostrados no Quadro 5.

QUADRO 5. Resultados da pesquisa de anticorpos por IFD em soros conjugados com fluoresceína, produzidos em coelhos e bovino.

HOSPEDEIRO	Nº ANIMAIS	I F D		
		CULTURA DE LEUCÓCITOS	ESFREGAÇOS DE SANGUE DE BOVINOS POSITIVOS	CONTROLES
Coelho	2	+	+	-
Bovino	1	+	+	-

O estudo comparativo de esfregaços sangüíneos, esfregaços e impressões de órgãos de animais portadores de *E. bovis*, e dos cultivos celulares infectados obtidos "in vitro", examinados pelo método de Giemsa e imunofluorescência direta

para detecção de *E. bovis*, mostrou que a imunofluorescência direta é um método mais rápido e mais seguro para o diagnóstico desta riquetsiose. A imunofluorescência direta se apóia na presença das inclusões riquetsiais intracitoplasmáticas na célula hospedeira, que reage com o anticorpo marcado com fluoresceína, havendo emissão de fluorescência após a reação. As preparações para imunofluorescência permitem o exame em menor aumento microscópico e um maior número de inclusões são visualizadas mais facilmente e mais rapidamente, que pelo método de Giemsa. Estas observações estão de acordo com CARTER, SEAMER & SNAPE (1971) que desenvolveram um teste de imunofluorescência direta para *E. canis* a partir de conjugado de soro canino de animais doentes. Observaram que o diagnóstico em esfregaços sanguíneos e tecidos de cães por este método foi superior em comparação ao método de Giemsa. Para estudos epidemiológicos, o conjugado por eles obtido foi considerado inviável, devido à necessidade de consumo de grandes quantidades de soro de animais infectados. De maneira semelhante, após cultivar "in vitro" *E. canis*, NYINDO *et al.* (1971) desenvolveram o teste de imunofluorescência direta a partir de soro de cães infectados e realizaram estudos estruturais do parasito, observando ainda que o diagnóstico realizado por imunofluorescência foi mais eficiente do que pelo método clássico de Giemsa, frequentemente utilizado.

O desenvolvimento de um método de propagação "in vitro" de *E. bovis* em culturas de leucócitos e a demonstração de

anticorpos no soro de bovinos infectados e de coelhos imunizados com material desta cultura, propicia um suporte para a produção do antígeno em quantidades suficientes para desenvolvimento de um soro-diagnóstico para ehrlichiose bovina, constituindo ainda, um subsídio para estudos entre as manifestações clínicas e patológicas e as variações no título por imunofluorescência indireta.

Estudos epidemiológicos da ehrlichiose bovina poderão ser desenvolvidos, procurando-se determinar a prevalência desta riquetsiose particularmente em outros estados brasileiros. Bem como para comparações das relações antigênicas entre organismos ehrlichiais.

Estudos desta natureza foram realizados para ***E. canis***, a partir de culturas deste microrganismo obtidas "in vitro", pelo método de NYINDO ***et al.*** (1971), testes imunológicos através da imunofluorescência indireta foram desenvolvidos por RISTIC, HUXSOLL, WEISIGER, HILDEBRANDT & NYINDO (1972). Os resultados obtidos no estudo de imunofluorescência indireta para ***E. canis*** demonstraram ser altamente específicos para o organismo em questão, não ocorrendo reação cruzada com nenhum patógeno comum de cães, nem mesmo com soros específicos de outras oito espécies de riquetsias testadas. Do mesmo modo, um teste de imunofluorescência indireta, similar ao de ***E. canis***, foi desenvolvido por RISTIC, HUXSOLL, WEISIGER & LEWIS Jr. (1973) para diagnóstico de ***E. equi*** em eqüinos, macacos, cães e gatos. O antígeno de ***E. equi*** foi

preparado de células obtidas de "buffy coat" e o teste demonstrou ser seguro e específico para detecção e titulação de anticorpos séricos de **E. equi**.

#### 4.4. Infecção natural em bovinos:

##### 4.4.1. Infecção natural por hemoparasitos em animais não esplenectomizados:

Os exames através de esfregaços de sangue periférico de 278 bovinos procedentes de 10 municípios do Estado do Rio de Janeiro (RJ) e de 18 bovinos do Estado de Minas Gerais (MG), revelaram positividade para **E. bovis** em 29 animais, totalizando 9,8% das amostras estudadas, onde em 11 casos, observou-se esta infecção associada a hemoparasitos pertencentes aos gêneros **Babesia** e **Anaplasma** (Fig. 6).

Em relação a **B. bigemina**, foram constatados 62 casos microscopicamente positivos, com 20,9% e para **B. bovis**, apenas 3,8% (10 animais) dentre a população estudada.

Os índices de infecção microscópica em esfregaços sanguíneos foram mais significativos para **A. marginale**, atingindo 29,1% (86 casos) entre os 296 bovinos estudados. Nenhum outro hemoparasito foi encontrado nos exames microscópicos de esfregaços sanguíneos dos animais estudados.

Em um bovino mestiço gir-holando, naturalmente infestado com carrapatos identificados como **B. microplus**, pro-

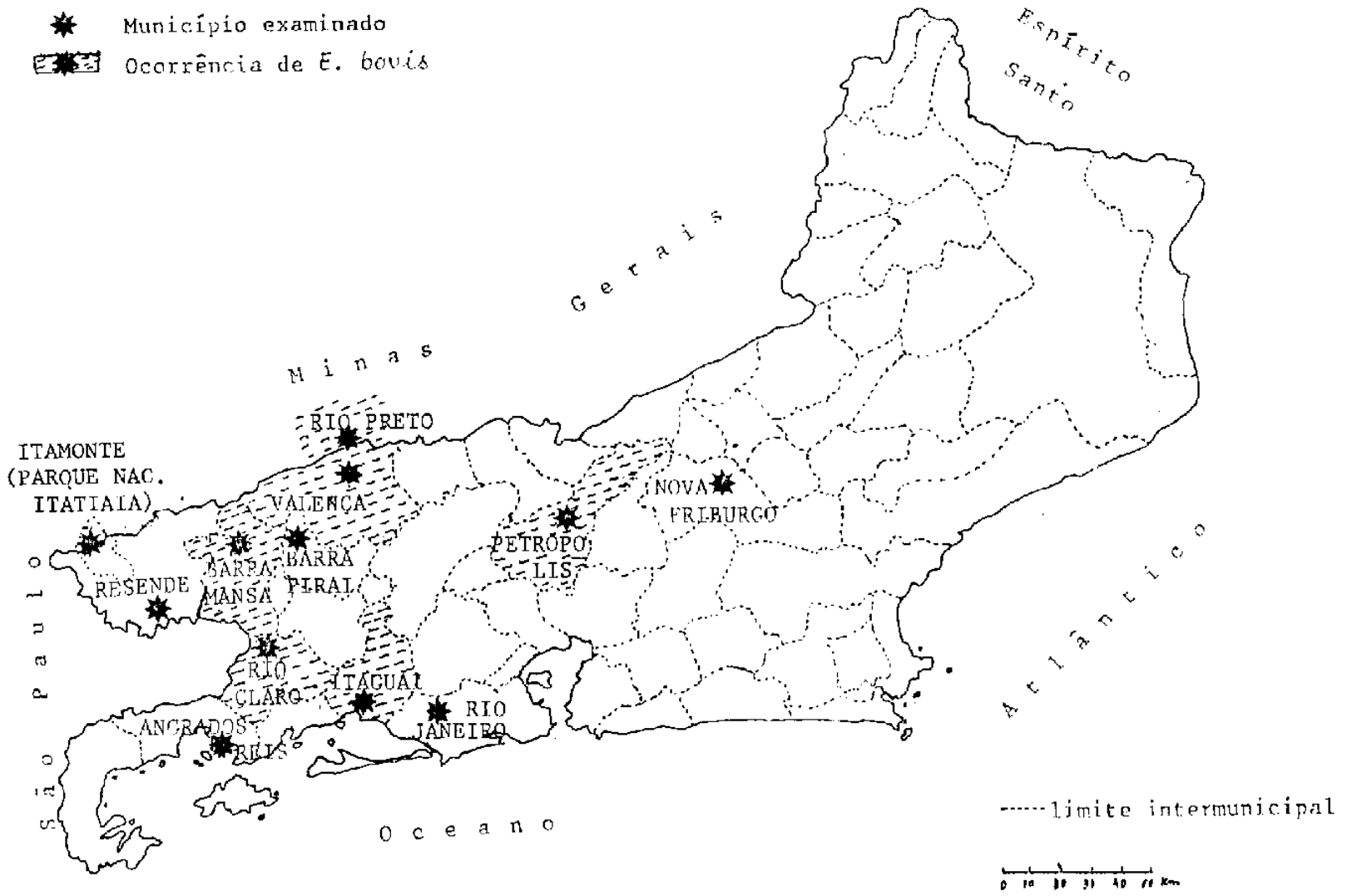


Fig. 6. Registros de *E. bovis* em infecções naturais de bovinos nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (Presente trabalho).



cedente do município Rio Claro-RJ e com infecção natural por *E. bovis* observou-se infecção concomitante por *B. bigemina* e *A. marginale*. Este animal recebeu tratamento com drogas babesicidas à base de diamidinas aromáticas, principalmente quando, *B. bigemina* aparecia na circulação em percentuais superiores a 5% do número total de hemácias circulantes.

Todos os bezerros utilizados nas infecções experimentais, ao apresentarem na circulação periférica, parasitos do gênero *Babesia*, receberam tratamentos com diamidinas aromáticas, num total de duas doses terapêuticas do medicamento, a intervalo de 3 dias, com resultados considerados excelentes.

Em relação a parasitemias por *A. marginale*, o tratamento com drogas específicas (tetraciclina) não foi realizado, uma vez que estas drogas possuem atividade anti *E. bovis*.

O estudo experimental relativo a *E. bovis* foi conduzido de forma associada a *A. marginale* e, separadamente de *B. bigemina* e *B. bovis*, através do uso de quimioterápicos.

Os resultados referentes à *E. bovis* dos bovinos examinados por município e a relação com os hemoparasitos encontrados pode ser observada no Quadro 6.

O exame de 39 bovinos também com menos de um ano de idade nascidos e criados em fazendas do Estado do Rio de Janeiro, realizados por MASSARD & MASSARD (1982) revelou que 15,3% dos animais, apresentaram a infecção natural por *E. bovis*, associada a *Babesia* e/ou *Anaplasma*.

QUADRO 6. Prevalência dos hemoparasitos em bovinos examinados em condições naturais nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (Presente trabalho).

MUNICÍPIO	Nº ANIMAIS	E. b.	A. m.	B. big.	B. bov.	E. b+ A. m.	E. b B. big.	E. b.		E. b. A. m. B. big.	A. m. B. bov.	B. big. B. bov.
								A. m.	B. big.			
RJ												
A. REIS	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B. MANSA	20	0	3	2	0	2	1	0	0	0	0	1
B. PIRAÍ	32	0	13	2	0	0	0	0	0	0	3	0
FRIBURGO	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ITAGUAÍ	109	12	27	14	2	1	1	0	14	1	0	0
PETRÓPOLIS	13	0	6	1	0	0	0	1	0	0	0	0
RESENDE	16	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RIO CLARO	25	3	2	18	0	0	0	0	0	0	0	0
R. JANEIRO	15	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VALENÇA	17	1	3	1	2	0	0	1	0	0	0	0
MG												
RIO PRETO	12	2	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0
ITAMONTE	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	296	18	62	39	4	3	4	2	14	2	3	1
		(6,08%)	(20,94%)	(13,17%)	(1,35%)	(1,01%)	(1,35%)	(0,67%)	(4,73%)	(0,67%)	(1,01%)	(0,34%)

Infecções intercorrentes de *E. bovis* com *Theileria* foram reportadas por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a, 1940a), DE KOCK et al. (1937), NEITZ & JANSEN (1952) e FLOCH et al. (1972). Também SENEVIRATNA & DHANAPALA (1963) observaram a presença de *E. bovis* em 3 bovinos, sendo que em duas oportunidades, associado com *Babesia* sp. Do mesmo modo, PIERRE (1983) diagnosticou em 10% entre 200 zebuínos examinados, infecção microscópica por *E. bovis*, relatando que em muitas ocasiões, a infecção estava associada com *Theileria mutans* (Theiler, 1906), *Babesia* e/ou *Anaplasma*.

Nos 12 municípios estudados, as infecções por *E. bovis* variaram de 0-41% dos animais, quando o diagnóstico foi realizado em esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa. Estes dados dão uma indicação da existência do parasito, embora não se possa afirmar que *E. bovis* não ocorra nas áreas onde não foi diagnosticada por este método, pois o fato deste parasito determinar baixas parasitemias, dificulta o diagnóstico pelo método de coloração pelo Giemsa.

O desenvolvimento do teste por imunofluorescência direta, veio confirmar esta sugestão. Durante os estudos experimentais, animais comprovadamente portadores da infecção por *E. bovis* foram microscopicamente negativos por vários dias, pelo exame de esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa. Esfregaços sanguíneos dos mesmos animais quando examinados pela técnica de anticorpo fluorescente resultaram positivos, devido à ocorrência da reação antígeno-anticorpo fa-

cilmente visualizada por esta técnica (Quadro 4). Da mesma forma, o desenvolvimento do teste de imunofluorescência indireta deverá diagnosticar um maior número de animais infectados por *E. bovis*, uma vez que detecta a presença de anticorpo no soro de animais suspeitos.

Com relação a *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, os índices de infecção, reveladas ao microscópio com base em esfregaços sanguíneos, estão de acordo com os dados de outros autores brasileiros como CARINI (1910), FONSECA & BRAGA (1923), SERRA FREIRE (1979) e mesmo de observações pessoais realizadas desde 1978.

CARINI (1910), DUPONT (1916, 1922), FONSECA & BRAGA (1923) e PINTO (1933), fizeram importantes considerações a respeito de *A. marginale* e naquela época já consideravam o Brasil como área enzoótica para este parasito. TOKARNIA & DOBEREINER (1962) e SANTOS (1967) retrataram o quadro da Anaplasmoze bovina no Rio de Janeiro como doença que determina altos índices de morbidade e mortalidade nos bezerros, fato este também referido por DUPONT (1916), sem entretanto se referirem a outras riquetsioses.

Recentemente, SERRA FREIRE (1979) examinou 30 bovinos do município de Barra Mansa, através de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa e observou que 16 animais apresentaram parasitismo por *A. marginale* e/ou *B. bigemina*. Reportou ainda que não encontrou nenhum outro hemoparasito no sangue dos animais estudados.

Neste trabalho, examinando-se 20 bovinos do mesmo município e pela mesma técnica, foi constatada a presença de *E. bovis*, associada a *A. marginale* em 2 animais e em 1 associado a *B. bigemina*. Infecções únicas por *A. marginale* e *B. bigemina* foram diagnosticadas em 3 e 2 bovinos respectivamente, totalizando 8 animais com infecções microscópicas para estes hematozoários.

Em relação aos hospedeiros naturais de *E. bovis* ficou caracterizado que este parasito foi capaz de infectar, animais taurinos e zebuínos e mesmo os mestiços destas raças. Este fato está de acordo com as observações de DONATIEN & LESTOQUARD (1936a); ROUSSELOT (1943); GIRARD & ROUSSELOT (1945); FINELLE (1958) e RIOCHE (1966), porém diverge dos resultados de PIERRE (1983), que observou a doença como característica de bovinos zebuínos determinando alta morbidade e mortalidade em rebanhos da Costa do Marfim, não encontrando casos clínicos de ehrlichiose bovina em animais taurinos. Este autor verificou que, bovinos de raças taurinas poderiam ser portadores do parasito, sem apresentarem sinais clínicos da doença.

Durante os exames, realizados nos rebanhos, foi constatado febre, enfartamento de linfonodos, emagrecimento e atraso de desenvolvimento em animais portadores de *E. bovis*. A maior percentagem de bovinos infectados foi encontrada em criações, onde os animais mostravam-se debilitados e em condições de manejo deficientes, principalmente durante as épocas de mai-

or intensidade populacional de carrapatos.

Em rebanhos examinados no município de Itamonte, região do Planalto do Parque Nacional de Itatiaia (MG), situada entre 2000 e 2400 m de altitude, em nenhuma ocasião foram evidenciadas formas evolutivas de carrapatos. Naquela região, devido às condições climáticas, e às condições de manejo, onde não se introduz animais procedentes de outras localidades, os animais são criados livres de carrapatos. Nos esfregaços de sangue confeccionados, só em uma ocasião foi observado *A. marginale* que pode ter carrapato como vetor.

Neste estudo, *E. bovis* não pode ser incriminada como o único agente causal responsável pela morte dos animais afetados, uma vez que os doentes, frequentemente apresentaram infecções por outros patógenos. Estas observações estão de acordo com FINELLE (1958), o qual considerou que infecções por *E. bovis* em animais debilitados e criados em condições adversas ou em associação com doenças intercorrentes, podem provocar uma doença grave e até mesmo mortal, ao contrário de DONATIEN & LESTOQUARD (1936a, 1940a), MALBRANT et al. (1939), SENEVIRATNA & DHANAPALA (1963), que consideraram *E. bovis* como um parasito pouco patogênico para os animais.

Os sintomas de uma forma aguda da doença como os descritos por GIRARD & ROUSSELOT (1945), FINELLE (1958), RIOCHE (1966) e PIERRE (1983), determinando altos índices de mortalidade não foram observados neste estudo. Entretanto, foram observados em animais com *E. bovis*, quadros clínicos de

ptose da orelha, associada ou não à otite, febre, enfartamento de linfonodos, emagrecimento e baixo desenvolvimento dos animais infectados, geralmente ocorrendo infecções mistas.

Um bovino Guernsey, de um ano de idade, foi acompanhado diariamente por 20 dias, apresentando quadro clínico agudo observando-se febre, incoordenação, movimentos de pedalagem, opistótono, mugidos, tosse e salivação abundante, morrendo durante uma crise do tipo epileptiforme como a descrita por RIOCHE (1966). À necrópsia, o exame de esfregaços de impressão de cérebro demonstrou infestação maciça dos eritrócitos dos capilares cerebrais por *B. bovis*. No exame dos esfregaços sanguíneos do animal foram observadas também inclusões intraleucocíticas de *E. bovis*, além de parasitemia moderada por *B. bigemina* e *A. marginale*. Os sintomas apresentados pelo animal, não podem responsabilizar um único agente etiológico, mas sim a interação destes microrganismos determinando o quadro apresentado.

No que tange à transmissibilidade de *E. bovis* para pequenos ruminantes, coelhos e cães, os resultados demonstraram que *E. bovis* não infectou estes animais. Após a esplenectomia do ovino, foi diagnosticada uma baixa parasitemia por *Anaplasma ovis* (Lestoquard, 1924) com um período de incubação de 5 dias. O desaparecimento espontâneo destes parasitos do sangue periférico, ocorreu após o 16º dia de incidência, sem intervenção quimioterápica, indicando ser pouco patogênico para o animal.

Em relação aos cães utilizados para inoculações de sangue bovino infectado com *E. bovis*, foi previamente observado em 3 deles, a presença de formas eritrocíticas de *Babesia canis* (Pianna & Galli-Valerio, 1895). Um destes 3 animais apresentou ainda, infecção intercorrente com *Hepatozoon canis* (James, 1905), observando-se gametócitos em leucócitos neutrófilos. Nenhum organismo rickettsial semelhante a *Ehrlichia* foi encontrado, embora *E. canis* já tenha sido assinalada em cães do Rio de Janeiro por CARRILO, REZENDE & MASSARD (1976).

#### 4.4.2. Infecção natural por *E. bovis* em animais esplenectomizados:

O total de 19 bovinos procedentes de quatro diferentes propriedades rurais do Estado do Rio de Janeiro e 2 de procedência indeterminada do Estado de Minas Gerais, previamente banhados com carrapaticidas, foram examinados diariamente durante as duas semanas procedentes à esplenectomia e por períodos subsequentes de até 7 meses. Destes, 5 bovinos desenvolveram infecções sangüíneas para *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* após a esplenectomia. Dois destes desenvolveram ainda, infecção por *E. wenyoni* e dois por *E. bovis*.

Um bovino procedente de Minas Gerais e o bovino girholando (nº 158) portador de *E. bovis*, apresentaram além de infecções microscópicas por *B. bigemina*, *A. marginale* e *E. bovis*, grande número de organismos de forma cocóide no plasma



sangüíneo, identificadas como *E. teganodes*, após o 8º dia da esplenectomia, sendo este o primeiro relato desta riquetsia no Brasil (MASSARD, FONSECA, MASSARD & ALVES, 1982).

A associação de infecções submicroscópicas de *Babesia* e *Anaplasma* com *E. bovis* ou *E. teganodes* não havia ainda sido observada no Brasil. LOPES (1976) esplenectomizou 12 bovinos, também procedentes do Estado do Rio de Janeiro e observou, além das espécies de *Babesia* e *Anaplasma* já conhecidas, a presença de *E. wenyoni* em 6 animais e de *Borrelia theileri* (Laveran, 1903) em um deles.

No presente trabalho, o período pré-patente para *E. wenyoni* foi de 6 e 7 dias, diferente das observações de LOPES (1976) que ficou compreendido entre 14 a 26 dias. A duração da parasitemia por *E. teganodes* e *E. wenyoni* não pode ser mais amplamente avaliada, pois os animais que a demonstraram foram medicados com diamidinas aromáticas após o 15º dia da cirurgia, ocorrendo o desaparecimento destes parasitos da circulação periférica.

Os animais que tiveram parasitemias por *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *E. bovis* desenvolveram febre variando de 39,5°C a 41°C, anorexia, apatia e acentuada anemia, caracterizada por anisocitose, hipocromia dos eritrócitos, leucocitose caracterizada por monocitose, e eosinopenia, com acentuada baixa do volume globular (9%), desenvolvendo ainda hipertrofia de linfonodos periféricos. O bovino mestiço girholando (nº 158) manteve a infecção por *E. bovis* em níveis

não muito mais elevado que os anteriores à esplenectomia, desenvolvendo alta parasitemia por *B. bigemina* acompanhada por hemoglobinúria a partir do 10º dia após a cirurgia. O tratamento no 13º dia com 4 mg/kg de acetato de diaminazina, determinou o desaparecimento completo dos parasitos *Babesia* spp. e *Eperythrozoon* do sangue periférico, ocorrendo gradativamente a recuperação clínica do animal, apesar de manter a infecção sangüínea por *E. bovis* e *A. marginale*.

Dois outros animais deste grupo que apresentaram *E. bovis* associada a *Babesia* spp e *Anaplasma*, não receberam nenhum tratamento quimioterápico, sobrevivendo a morte no 15º dia e 18º dias respectivamente após a esplenectomia, sendo evidenciado acentuada parasitemia por *B. bovis* principalmente em eritrócito dos capilares cerebrais, rins e coronárias.

Os outros 3 bezerros foram tratados com os mesmos produtos balsínicos associados a tetraciclina, ocorrendo recuperação gradual e desaparecimento dos parasitos da circulação periférica.

Infecções latentes de *E. bovis* podem ser exacerbadas através da esplenectomia, que funciona como um fator estressante sobre os sistemas hematopoiético e linfóide. Há muito tempo esta técnica vem sendo utilizada para estudo de protozoários e riquetsias patogênicos para eqüinos, ovinos, suínos, caninos, antílopes e bovinos (QUINLAN, DE KOCK & MARAIS (1935). O aparecimento de parasitemias por diferentes hemopatógenos, provavelmente interfere no equilíbrio imunológico

do animal e no estado de imunotolerância, quando o microrganismo está presente, sem demonstrar parasitismo. Este desequilíbrio, determina o aparecimento de recaídas por protozoários e riquetsias patogênicas, fatos estes já relatados por DONATIEN & LESTOQUARD (1937a,b) com relação ao parasitismo por *E. canis* e *E. ovina*. De maneira semelhante, ROUSSELOT (1943) também observou a ocorrência de *E. bovis* em infecções mistas com *Babesia* e *Anaplasma* em bovinos, taurinos e zebuínos esplenectomizados, procedentes da Tunísia.

Onze bovinos esplenectomizados que apresentaram-se microscopicamente negativos a *E. bovis*, quando examinados os esfregaços sangüíneos pela coloração de Giemsa, foram utilizados para os estudos de transmissão, com sangue infectado com *E. bovis*, e exposições a carrapatos. Antes e após a cirurgia, estes bezerros foram medicados com produtos à base de diamidina aromática, não desenvolvendo infecções sangüíneas por protozoários babesídeos, nem *Eperythrozoon*. Os 2 bezerros com idades entre 4 e 5 meses desenvolveram infecções moderadas por *A. marginale*, apresentando febre até 40.5°C, anorexia e apatia durante 8 dias consecutivos, havendo a recuperação clínica sem intervenção quimioterápica específica.

#### 4.5. Infecção experimental com *E. bovis*:

##### 4.5.1. Com sangue bovino infectado por *E. bovis* a bovinos:

Dos 5 animais utilizados para este ensaio, 4 foram

inoculados com sangue de um mesmo bovino portador de *E. bovis*, e um permaneceu como controle.

O bezerro com 25 a 30 dias de idade, esplenectomizado e inoculado por via endovenosa com 30 ml de sangue infectado por *E. bovis* apresentou após o 8º dia da inoculação, febre oscilante entre 39°C a 40°C perdurando por 7 dias, acompanhada de anorexia, apatia e perda de peso corporal. Os exames de esfregaços sangüíneos diários deste animal demonstraram a partir do 10º dia de inoculação, inclusões intracitoplasmáticas nos leucócitos circulantes, porém, em pequeno número e mórulas do parasito foram evidenciadas a partir do 15º dia após a inoculação. O número de mórulas por esfregaço sempre foi baixo, embora o exame dos esfregaços tenham sido exaustivos. Após o período febril, ao exame clínico, foi constatado hipertrofia dos linfonodos superficiais do animal. Embora os parasitos não tenham sido encontrados em todos os esfregaços sangüíneos quando corados pelo Giemsa, baixas parasitemias foram observadas por período de 42 dias.

Um outro bezerro esplenectomizado, também com 30 dias de idade que foi inoculado com sangue da mesma procedência, porém por via subcutânea, não revelou parasitemia por *E. bovis* através do exame de esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa, bem como a temperatura e o comportamento do animal não sofreram alterações, do mesmo modo que o bezerro controle.

Os 2 bezerros esplenectomizados com 5 meses de idade

que receberam 3 inoculações de 20 ml de sangue do mesmo animal, por via endovenosa a intervalos de 7 dias, também desenvolveram a infecção microscópica por *E. bovis*. O aparecimento de inclusões intracitoplasmáticas foram evidenciadas a partir do 9º dia após a 1ª inoculação de sangue, ao mesmo tempo em que foi observado a elevação da temperatura retal, por 12 dias e 15 dias, acompanhada dos sinais da síndrome febril e moderado enfartamento dos linfonodos superficiais pré-escapulares e precurais. Nesta situação, baixa parasitemia por *E. bovis* foi observada por um período de 58 dias, não sendo também encontrado mórulas em todos os dias. A partir daí, raras vezes foi possível detectar esta riquetsia nos esfregaços de sangue periférico corados pelo Giemsa, porém foi diagnosticada por IFD em exame por até 90 dias.

O estabelecimento da infecção por *E. bovis* a outros bovinos, através de inoculações de sangue de animais portadores do parasito está de acordo com os estudos realizados por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a e 1940a). De modo semelhante ao observado por estes autores, o estabelecimento da doença em condições experimentais nunca foi mortal. Os sinais clínico de hipertermia, anorexia, emagrecimento, hipertrofia de linfonodos periféricos, e o período de incubação do parasito em torno de 12 a 15 dias foram semelhantes aos observados por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a e 1940a). Da mesma forma, GIRARD & ROUSSELOT (1945) observaram que a inoculação de sangue de animal apresentando uma forma aguda de ehrlichiose bo-

vina, não reproduziu nos bezerros inoculados os sinais clínicos da doença em condições naturais. Os animais inoculados por estes autores apresentaram uma infecção considerada clinicamente inaparente, caracterizada pelo aparecimento de *E. bovis* nos monócitos do sangue periférico, hipertermia e hipertrofia de linfonodos, correspondendo às observações experimentais realizadas por DONATIEN & LESTOQUARD (1940a) e no presente trabalho.

4.5.2. Com sangue bovino infectado com *E. bovis* a ovino:

O ovino esplenectomizado e inoculado por via endovenosa e via subcutânea com sangue infectado por *E. bovis* procedente de bovino, foi examinado através de esfregaços sanguíneos por 3 meses, não sendo observado durante este período nenhuma alteração clínica, nem mesmo inclusões intraleucocíticas semelhantes a *Ehrlichia*. A elevação da temperatura observada, ocorreu apenas em função provável da parasitemia por *A. ovis*, voltando a níveis normais após o desaparecimento destes parasitos da corrente circulatória.

Ao contrário destas observações, a transmissão de *E. bovis* a ovinos sómente foi estabelecida por DONATIEN & LESTOQUARD (1936a e 1940a), e caracterizada como uma infecção latente, só aparecendo após a esplenectomia do animal, por período de apenas 3 dias, associada também a *A. ovis* e *B. ovis*.

#### 4.5.3. Com sangue bovino infectado com *E. bovis* a cães:

Os quatro cães inoculados com sangue infectado por *E. bovis*, foram acompanhados diariamente através de esfregaços sanguíneos por 60 dias, não sendo encontrado, em nenhuma das ocasiões, formas intraleucocíticas de *Ehrlichia*. Da mesma forma, não ocorreu elevação de temperatura corporal, bem como nenhuma modificação clínica dos animais foi observada, apesar do aparecimento esporádico de parasitos intraeritrocíticos identificados como *B. canis* e ainda gametócitos de *H. canis* em leucócitos pelimorfonucleares. Na literatura sobre *E. bovis*, não foi encontrado nenhum outro estudo envolvendo cães. Entretanto, STANNARD; GRIBBLE & SMITH (1969) demonstraram que *E. equi*, agente causal de uma doença grave e característica de eqüídeos na Califórnia, pode ser transmitida experimentalmente a ovinos, caprinos e cães, determinando uma doença de forma benigna ou inaparente nestas espécies. De maneira semelhante, LEWIS, HUXSOLL, RISTIC & JOHNSON (1975) transmitiram este mesmo agente riquetsial a cães, gatos, macacos (*Macaca mulatta*) e baboons (*Papio anubis*). A susceptibilidade de primatas não humanos à infecção com *E. equi* sugeriu que o homem possa ser um hospedeiro potencial à agentes ehrlichiais. DONATIEN & LESTOQUARD (1935 e 1940a) também reportaram a susceptibilidade de *M. sylvana* à *E. canis* e *E. bovis*, observando parasitemias acompanhadas de sinais clínico da doença, porém nenhuma outra tentativa foi realizada para confirmar a infectividade de *E. bovis* pa-

ra primatas.

4.5.4. Com culturas de leucócitos bovinos infectados com *E. bovis* a bovinos:

Três bezerros criados isolados desde o nascimento e considerados negativos após o exame de esfregaços sangüíneos durante 25 dias, foram utilizados neste experimento.

Um animal com 30 dias de idade aproximadamente, inoculado com 15 ml de cultura de *E. bovis* e reinoculado após uma semana com 10 ml do mesmo material por via endovenosa, apresentou após o 6° dia da 1ª inoculação uma reação febril variando de 39.6° a 40°C, por período de 30 dias, acompanhada de abatimento do animal e anorexia. Pequenas inclusões intraleucocíticas foram observadas nos esfregaços sangüíneos corados pelo método de Giemsa a partir do 8° dia da inoculação e as primeiras mórulas foram observadas no 14° dia após a inoculação da cultura.

A partir do 15° dia de inoculação, observou-se discreto aumento dos linfonodos periféricos e diminuição do ganho de peso corporal. Após 50 dias o animal apresentou sinais de melhora das condições orgânicas, mantendo o enfartamento dos linfonodos periféricos como seqüela. Por período superior a 6 meses, pode-se observar a presença *E. bovis* no sangue periférico deste animal quando examinado por esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa e por imunofluorescência direta. Sangue colhido deste animal, permitiu o rei-



solamento de *E. bovis* em culturas de leucócitos. As lâminas com tapete celular de leucócitos deste animal reagiram positivamente quando examinadas pela técnica da imunofluorescência direta. Este animal frequentemente apresentou oscilações da temperatura corporal, podendo-se nestas ocasiões, observar a presença de inclusões de *E. bovis* ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa, como também por imunofluorescência direta.

Os outros dois bezerros também com 30 dias de idade receberam uma inoculação endovenosa de 10 ml da suspensão de cultura de *E. bovis* obtida "in vitro". Estes animais desenvolveram também a infecção por *E. bovis*, porém, a parasitemia durou de 25 a 40 dias não sendo constante em todos os dias. As variações térmicas foram menos acentuadas não excedendo 39,8°C e com duração aproximada de 8 a 12 dias. Ao exame clínico, não foi evidenciado enfartamento de linfonodos periféricos, bem como não ocorreu alteração no ganho de peso corporal em relação ao animal controle deste grupo.

O diagnóstico de *E. bovis* por imunofluorescência direta dos 2 animais que receberam apenas um inóculo, revelou fraca positividade até 2 meses da inoculação. Exames realizados após este período resultaram negativos tanto por imunofluorescência direta quanto pelo método de coloração pelo Giemsa.

A susceptibilidade dos animais quando inoculados com suspensões de culturas de *E. bovis* obtida "in vitro" assemelham-se às observações realizadas em relação a outras espé-

cies de *Ehrlichia*. O Quadro 7 representa os resultados de esfregaços sangüíneos e cultura de leucócitos de bovinos infectados e negativos a *E. bovis* examinados pela técnica de Giemsa e imunofluorescência direta realizado com soro imune de bovino portador da infecção e soro imune produzido em coelho experimentalmente.

QUADRO 7. Resultados das infecções por *E. bovis* com culturas de leucócitos bovinos e com sangue de bovinos.

ANIMAIS	ESFREGAÇO SANGUÍNEO		CULTURA	
	GIEMSA	IFD	GIEMSA	IFD (*) (**)
Bovino portador natural	+	+	+	+
Bovino inoculado com cultura infectada experimentalmente	+	+	+	+
Bovino controle (negativo)	-	-	-	-

\* soro imune coelho

\*\* soro imune bovino

A infectividade para cães de culturas de leucócitos com *E. canis* foi observada por NYINDO et al. (1971), quando inocularam em cinco cães, suspensão de culturas obtidas "in vi-

tro" deste microrganismo entre 5 e 28 dias após incubação. Os animais desenvolveram sinais de pancitopenia tropical, e os organismos puderam ser reisolados em culturas de leucócitos do sangue destes animais.

Semelhante observações foram ainda realizadas por HEMELT, LEWIS, HUXSOLL & STEPHENSON (1980) que obtiveram até 125 passagens seriadas de *E. canis* em culturas de monócitos de sangue periférico. O material de cultura quando preservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  por até 31 meses, determinou uma perda mínima da infectividade para cães susceptíveis, proporcionando a manutenção de *E. canis* em laboratório sem a necessidade de passagens em cães, reduzindo assim a possibilidade de contaminação com outros microrganismos.

#### 4.5.5. Com culturas de leucócitos bovinos infectadas com *E. bovis* a caprino:

O caprino inoculado com material de cultura, da mesma procedência que o inoculado em bezerros, não apresentou nenhuma alteração clínica, nem sangüínea pelo exame microscópico de sangue periférico. Da mesma forma, o desenvolvimento do animal não sofreu variações em comparação ao seu irmão utilizado como controle.

Os exames de esfregaços sangüíneos realizados pelo método de coloração de Giemsa e por imunofluorescência direta do caprino inoculado com cultura, não demonstraram a presença de *E. bovis*. Estes resultados são mostrados no Quadro

8 e podem indicar a não receptividade desta espécie à *E. bovis*, o que também foi observado por RIOCHE (1966) quando inoculou sangue de bovino infectado por via endovenosa em caprino e o exame do animal durante 2 meses resultou negativo.

QUADRO 8. Resultados da pesquisa de *E. bovis* em esfregaços sangüíneos de coelhos e caprinos inoculados experimentalmente com suspensão de cultivos celulares de *E. bovis*.

HOSPEDEIRO	Nº ANIMAIS	TÉCNICA		CONTROLE	
		GIEMSA	IFD	GIEMSA	IFD
Coelho	2	-	-	-	-
Caprino	1	-	-	-	-

4.5.6. Com culturas de leucocitos bovinos infectados com *E. bovis* a coelhos

Os dois coelhos inoculados com suspensão da cultura de leucócitos infectada com *E. bovis* mostraram-se refratários à infecção por *E. bovis*. Os exames de esfregaços sangüíneos pelo Giemsa e por imunofluorescência direta resultaram negativos. O quadro 8 mostra os resultados referentes aos exames destes animais e de seus controles.

#### 4.5.7. Com *E. bovis* por exposição à ixodídeos:

É fato notório que os organismos do gênero *Ehrlichia* são transmitidos por carrapatos ixodídeos. A espécie de ixodídeo comumente encontrada em bovinos e largamente distribuída em todo o Brasil é o *B. microplus* considerado um ectoparasito monoxeno, embora ninfas e adultos desta espécie tenham sido encontradas livres em áreas de pastagens frequentadas pelos animais em condições naturais. Principalmente nas épocas de maior intensidade de carrapatos, foi relativamente comum o encontro de diferentes formas de *B. microplus* nas vestes e corpo de pessoas em contato com as pastagens. Em bezerros nascidos a campo e transportados em menos de 12 horas de vida para baías especiais de alvenaria com proteção contra carrapatos, foi também observado o parasitismo por teleóginas de *B. microplus* após 8 a 14 dias de vida. Estes dados estão em concordância com as afirmações de UILENBERG (1970); CONNELL & HALL (1972); SUTHERST, WHARTON, COOK, SUTHERLAND & BOURNE (1979) e MASON & NORVAL (1981) que verificaram a possibilidade de transferência das diferentes formas evolutivas de *B. microplus* de um hospedeiro a outro.

Em condições naturais, são também encontrados sobre os bovinos, exemplares de *A. cajennense*, especialmente em rebanhos onde equídeos cohabitam os mesmos pastos, podendo-se também observar o parasitismo esporádico de bovinos por *A. nitens*.

Em extensas e minuciosas coletas de ectoparasitos nos bovinos estudados, nenhuma outra espécie de carrapato foi identificada. Partindo deste princípio, os carrapatos utilizados para identificação dos prováveis transmissores de *E. bovis* no presente trabalho, foram baseados nestas espécies encontradas parasitando bovinos.

Larvas de *B. microplus* procedentes de fêmeas alimentadas em bovinos portadores da infecção por *E. bovis*, foram expostas a bovinos negativos a esta infecção. Três dos bezerros infestados com estas larvas não desenvolveram infecções microscópicas por *E. bovis*, porém parasitos identificados como *B. bigemina* foram evidenciados nos exames microscópicos de sangue periférico após o 9º dia da infestação dos animais com larvas desta espécie de carrapato.

Da mesma forma, as tentativas de transmissão experimental de *E. bovis* a partir de larvas de carrapatos *A. nitens* não estabeleceram a infecção nos 3 animais infestados experimentalmente. As larvas de *A. nitens* eram procedentes de fêmeas alimentadas desde larva em bovinos portadores da infecção por *E. bovis*.

A não observação de transmissão de *E. bovis* de uma geração a outra de *B. microplus* não exclui a possibilidade desta espécie de carrapato atuar como transmissor de *E. bovis*, uma vez que uma transmissão transestadial pode ocorrer, tendo-se em vista, as observações confirmando a transferência de diferentes estádios deste carrapato de um hospedeiro

a outro. A prevalência de *E. bovis* observada nos rebanhos infectados, sugere que a transmissão se faça por uma espécie de carrapato comumente encontrada parasitando os animais. Observações semelhantes foram realizadas por UILENBERG (1970), que considerou *B. microplus* capaz de transmitir *A. marginale* de maneira transestadial através de passagens de um hospedeiro a outro.

Sendo *A. cajennense* uma espécie de carrapato que necessita de 3 hospedeiros para o desenvolvimento de seu ciclo de vida, foram feitas infestações com larvas, ninfas e adultos isoladamente.

A exposição de aproximadamente, 20.000 larvas de *A. cajennense* de cada vez ao bovino nº 158 portador de *E. bovis* resultou no ingurgitamento de 2.000 a 5.000 larvas em 4 a 6 dias.

As larvas após repleção foram levadas à câmara climática até completar a ecdise para ninfa, período este que variou de 11 a 15 dias. As ninfas foram expostas em número de 200 a 1.500, à bovinos previamente examinados e considerados livres de infecção microscópica por *E. bovis*, bem como a bovinos portadores de *E. bovis*.

O acompanhamento através de esfregaços sangüíneos de 5 bezerros livres de infecção por *E. bovis*, demonstrou após o 6º dia da exposição às ninfas, a presença de inclusões intra-leucocítica semelhantes a *E. bovis*, acompanhado da elevação de temperatura retal, embora não ultrapassando 39,8°C. As in-

clusões em forma de mórula não foram encontradas apesar de minucioso exame dos esfregaços, e os parasitos foram observados por período de até 17 dias, seguido de desaparecimento gradual da circulação periférica. Em 2 destes animais, foi observado o aumento da parasitemia por *A. marginale* após o 6º dia de exposição das ninfas de *A. cajennense*. O período médio de ingurgitamento das ninfas foi de 6 a 10 dias e a fase não parasítica após repleção das ninfas variou de 14 a 18 dias.

Dos 2 bezerros infestados com adultos (machos e fêmeas) de *A. cajennense*, nenhum desenvolveu infecção por *E. bovis*. Estes carrapatos não se fixaram bem à orelha dos animais, ocorrendo o ingurgitamento incompleto de poucos exemplares e impossibilitando a avaliação como capazes de transmitir *E. bovis*.

Esfregaços de larvas de *B. microplus*, *A. nitens* e *A. cajennense* não alimentadas, utilizadas nos estudos experimentais e examinados por microscopia de imunofluorescência direta, revelaram-se negativos. Este resultado indica que não houve transmissão destes organismos riquetsiais através do ovário das fêmeas alimentadas em hospedeiros portadores do parasito.

Por outro lado, ninfas de *A. cajennense* procedentes de larvas alimentadas em bovinos portadores de *E. bovis* reagiram positivamente ao teste por imunofluorescência direta, bem como foram evidenciadas formas intraleucocíticas do para-



sito nos animais infestados com ninfas desta mesma geração. Estes resultados indicam que ocorreu a permanência dos organismos *E. bovis* no carrapato ao mudar de larva para ninfa, caracterizando uma clássica transmissão transestadial.

Até o momento, os carrapatos responsabilizados pela transmissão de *E. bovis* têm sido espécies trioxenas. Na África e Irã, espécies de ixodídeos do gênero *Hyalomma* têm sido incriminadas como responsáveis pela transmissão de *E. bovis* DONATIEN & LESTOQUARD (1936a, 1940a); DELPY (1937); NEITZ & JANSEN (1952). Também FINELLE (1958) estabeleceu a infecção por *E. bovis* à bovinos quando inoculou macerado de carrapatos *A. variegatum* coletados de animais doentes, bem como não mais observou surtos de doença após controle de ixodídeos através de banhos carrapaticidas sistemáticos.

Da mesma forma, o controle de carrapatos, através de banhos carrapaticidas contra *B. microplus* e *A. variegatum* em bovinos da Ilha de Guadalupe, aliado ao emprego de tetraciclina e da vacina Richov diminuiu sensivelmente a mortalidade daqueles animais, afetados de uma provável riquetsiose. Igualmente PIERRE (1983) relatou que o uso de tetraciclina e o combate aos carrapatos *Hyalomma* e *A. variegatum* dos animais acometido por *E. bovis* na Costa do Marfim, constituiu um meio eficaz de controle desta doença.

Embora as tentativas de transmitir *E. bovis* com *A. variegatum*, *R. evertsi* e *H. savignyi* colhidos de bovinos infectados, por GIRARD & ROUSSELOT (1945) tenham resultado

negativas, estes autores acreditaram que a transmissão de *E. bovis* no Mali seja efetuada por alguma(s) destas espécies.

A transmissão de outras espécies do gênero *Ehrlichia* por carrapatos foi estudada por diversos autores. Assim, DONATIEN & LESTOQUARD (1936b,c) reportaram a transmissibilidade de *E. canis* a macacos por inoculações de emulsão de larvas de carrapato *R. sanguineus*, caracterizando uma transmissão transovariana. Ao contrário, os estudos conduzidos por EWING & PHILIP (1966) e GROVES, DENNIS, AMYX & HUXSOLL (1975) não estabeleceram a infecção por *E. canis* em cães utilizando larvas procedentes de fêmeas alimentadas em cães infectados, concluindo que a transmissão se faz de maneira transestadial. Igualmente, SMITH, SELLS, STEPHENSON, RISTIC & HUXSOLL (1976) estudaram o desenvolvimento de *E. canis* em tecidos de *R. sanguineus* e não evidenciaram este microrganismo no ovário das fêmeas desta espécie de carrapato, quando examinadas por imunofluorescência, considerando que a transmissão é do tipo transestadial.

MacLEOD (1936) demonstrou que a transmissão de *C. phagocytophila* é realizada por carrapatos *Ixodes ricinus* (L.), de maneira transestadial e que o agente persiste no carrapato adulto, mesmo quando ninfas se alimentam em coelhos, considerados refratários à esta infecção.

O envolvimento de carrapatos na transmissão de *E. equi* e *C. ondiri* é aceito, embora estudos experimentais de transmissão envolvendo espécies parasitando os hospedeiros in-

fectados não tenham sido conclusivos (HAIG & DANSKIN, 1962; GRIBBLE, 1969).

Também carrapatos *Rhipicephalus bursa* (Canestrini & Fanzago), foram relacionados por LESTOQUARD & DONATIEN (1936) como os transmissores de *E. ovina* na Argélia. Os estudos realizados no Mali por ROUSSELOT (1943) e no Sri Lanka por SE-NEVIRATNA & JAINUDEEN (1967) não identificaram os transmissores de *E. ovina* nestas regiões.

#### 4.6. Alterações Hematológicas:

Nos animais em que foi diagnosticado em esfregaços sanguíneos a presença de *E. bovis*, observou-se também leucocitose. A leucometria realizada em "Coulter counter" variou de 9.000/mm<sup>3</sup> a 18.000/mm<sup>3</sup>. Em casos de ehrlichiose bovina crônica, as contagens médias foram de 12.000/mm<sup>3</sup> a 15.000/mm<sup>3</sup>. Durante o exame microscópico dos esfregaços sanguíneos sempre chamou a atenção a ocorrência de monocitose (8 a 18%) e a presença de vacúolos no citoplasma de grande número destas células. Eosinopenia (1-4%) também foi observada, e em algumas ocasiões atingindo 0%. Os linfócitos apresentavam-se aumentados (acima de 58%) ou diminuídos (menos de 50%), sendo frequentemente observado células em mitose e linfócitos jovens, muito pequenos, com núcleo picnótico e citoplasma muito reduzido.

Os neutrófilos em geral apresentaram-se dentro dos

limites considerados normais para a espécie (26 a 30%) ou às vezes um pouco abaixo desta média (24%), geralmente quando ocorria linfocitose e monocitose mais acentuada.

Em relação aos basófilos, não foram observadas alterações dos parâmetros consideradas normais para a espécie. Embora não se tenha realizado a contagem de plaquetas, a leitura dos esfregaços sanguíneos não demonstrou que alterações acentuadas possam ter ocorrido.

As riquetsias foram observadas mais frequentemente em leucócitos do tipo grande linfócito que em monócitos, embora em muitas ocasiões houvesse uma retração do núcleo da célula dando a impressão semelhante a monócito (Figs. 3 e 4).

As alterações hematológicas observadas nos animais com *E. bovis*, incluindo a monocitose e eosinopenia estão de acordo com as observações de GIRARD & ROUSSELOT (1945) e RIOCHE (1966). DONATIEN & LESTOQUARD (1935) também já haviam relacionado a eosinopenia em casos de ehrlichiose canina. O aspecto vacuolado dos monócitos, a presença de numerosas células jovens e células em mitose observadas ao exame de esfregaços sanguíneos, foram consideradas por RIOCHE (1966, 1967) como quase patognomônicas para o diagnóstico da ehrlichiose bovina, mesmo em ausência das riquetsias.

Durante os estudos experimentais estas alterações hematológicas foram frequentemente observadas nos animais e o exame sistemático diário de esfregagos sanguíneos permitiu confirmar a presença de *E. bovis* nos animais. Este fato re-

força a opinião de RIOCHE (1966, 1967) de que o quadro hematológico apresentado pelos animais permite um diagnóstico presuntivo de ehrlichiose bovina.

## CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- O agente etiológico da ehrlichiose bovina, *E. bovis*, ocorre em bovinos do Brasil em percentuais que podem atingir à 9,8% dos bovinos, quando esfregaços sangüíneos são examinados pelo método de coloração de Giemsa;

- As infecções sangüíneas microscópicas de bovinos por *E. bovis* foram assinaladas também em combinações com *A. marginale*, *B. bigemina* e/ou *B. bovis*;

- A esplenectomia de bovinos pode exacerbar as infecções por *E. bovis*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale*, *E. wenyoni* e *E. tejanodes*, com o desenvolvimento de parasitemias e aparecimento de sinais clínicos de doença;

- Os estágios evolutivos de *E. bovis* encontram-se sempre em células mononucleares do sangue periférico e de órgãos internos como o pulmão, rim, fígado, baço e linfonodos;

- Pela primeira vez *E. bovis* foi cultivada "in vitro" e a viabilidade infectiva dos microrganismos provenientes destes cultivos foi comprovada pela reprodução da infecção em bovinos inoculados com estas amostras após 48 horas de incubação à 37°C;

- O diagnóstico de *E. bovis* por imunofluorescência direta demonstrou ser um método de diagnóstico rápido e mais eficiente que o método convencional de coloração pelo Giemsa;

- Inoculações experimentais com sangue ou culturas positivas para *E. bovis* não foram infectivas para ovino, cães, caprinos e coelhos porém, bovinos mostraram-se sensíveis à infecção e coelhos imunogênicos;

- Infestações experimentais com ixodídeos demonstraram a transmissão transtadial de *E. bovis* somente através de ninfas de *A. cajennense*;

- Alterações hematológicas tais como monocitose, linfocitose e eosinopenia associadas aos sinais clínicos de hipertermia e enfartamento de linfonodos periféricos permitem o diagnóstico presuntivo de ehrlichiose bovina. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado inicialmente em esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa e confirmado pelo método de imunofluorescência direta, que se revelou ser mais sensível que aquele.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOLL, P.H. 1959. Studies on *Ehrlichia canis* (syn. *Rickettsia canis*). *Acta Trop*, 16:97-107.
- CANHAM, A.S. 1943. A rickettsia-like organism found in the blood of pigeons. *J. S. Af. Vet. Med. Assoc.*, 14:83-89.
- CARINI, A. 1910. O anaplasma marginal em S. Paulo. *Rev. Med.*, S. Paulo, 24 p.
- CARRILO, B.J.; REZENDE, H.E.B. & MASSARD, C.L. 1976. Ehrlichiose canina no Rio de Janeiro, Brasil. *XV Cong. Bras. Med. Vet. RJ. Anais*: 162.
- CARTER, G.B.; SEAMER, J. & SNAPE, T. 1971. Diagnosis of Tropical Canine Pancytopenia (*Ehrlichia canis* Infection) by Immunofluorescence. *Res. Vet. Sci.*, 12:318-322.
- CONNEL, M.L. & HALL, W.T.K. 1972. Transmission of *Anaplasma marginale* by tick, *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.*, 48:477.
- DANSKIN, D. & BURDIN, M.L. 1963. Bovine Petechial Fever. *Vet. Rec.*, 75:391-394.



- DAVIES, F.G.; ODEGAARD, O.A. & COOPER, J.E. 1972. The morphology of the causal agent of bovine petechial fever (Ondiri disease). *J. Com. Pathol.* 82:241-246.
- DAWE, P.S.; OHDER, H.; WEGENER, J. & BRUCE, W. 1970. Some observations on bovine petechial fever (Ondiri disease) passaged in sheep. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 18:361-368.
- DE KOCK, G.; VAN HEERDEN, C.J.; DU TOIT, R. & NEITZ, W.O. 1937. Bovine Theileriasis in South Africa with special reference to *Theileria mutans*. *Onderst. J. Vet. Sci. An. Ind.*, 8(1):9-125.
- DELPY, L.P. 1937. Citado por DONATIEN & LESTOQUARD, 1940a *Arch. Inst. Pasteur Algerie*, 15:142.
- DONATIEN, A. & GAYOT, G. 1943. *Rickettsia* générale du porc. *Arch. Inst. Pasteur Algerie*, 21(1):5.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1935. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 28:418-419.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1936a. *Rickettsia bovis*, nouvelle espèce pathogène pour le bouef. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 29(10):1057-1061.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1936b. Existence de la premunition dans la rickettsiose naturelle ou expérimentale du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 29:378-383.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1936c. Recherches sur *Rickettsia*

- canis* comparaison avec *Rickettsia conori*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 29:1052-1056.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1937a. État Actuel des connaissances sur les rickettsioses animales. *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 15:142-187.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1937b. Particularités des *Rickettsia* des monocytes. *Bull. Acad. Vet. France*, 10:183-187.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1938. Du cycle évolutif de quelques *Rickettsia*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 31:593-599.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1940a. Rickettsiose bovine algérienne à *R. bovis*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 33:245-248.
- DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. 1940b. Du cycle évolutif de quelques *Rickettsia*. *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 18:203-213.
- DUPONT, O. 1916. A tristeza em bezerros. I. *Conf. Agric. Pecuária Brasil*.
- DUPONT, O. 1922. Tristeza no Brazil. Paratypho do bezerro e outras afecções da primeira idade. O banheiro Carrapaticida. I. *Cong. Bras. Med. Vet.*, RJ. Anais: 26-31.
- ENIGK, K. 1942. Eine Rickettsieninfektion Beim Bison *Berl. Münch. Tierärztl. wochenschr. Jan.*, 23:25-27. In: *Parasitic Protozoa*, Kreier, J.P. 1977. Vol. IV.
- EWING, S.A. & PHILIP, C.B. 1966. *Ehrlichia*-like rickettsiosis

- in dogs in Oklahoma and its relationship to *Neorickettsia helminthoeca*. *Am. J. Vet. Res.*, 27:67-69.
- FINELLE, P. 1958. Rickettiose à *Rickettsia bovis* en Oubanghi-Chari. *Rev. Élev. Med. Vet. Pays. Trop.*, [N.S.] 11:291-292.
- FLOCH, H., CAPPONI, M. & GIROUD, P. 1972. Une rickettsiose bovine probable en Guadeloupe: difficultés du diagnostic. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 65:194-198.
- FOGGIE, A. 1951. Studies on the infections agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol Bacteriol.* 63:1-15.
- FOGGIE, A. & HOOD, C.S. 1961. Adaptation of the infections agent of tick-borne fever to guine-pigs and mice. *J. Comp. Pathol.*, 71:414-427.
- FONSECA, A. & BRAGA, A. 1923. Noções sobre a Tristeza Parasitária dos Bovinos. *Of. Typ. Min. Agricult.*, RJ. 216 p.
- GIRARD, H. & ROUSSELOT, R. 1945. La Rickettsiose bovine a *Rickettsia bovis* au Sudan Français. *Bull. Soc. Panthol. Exot.*, 38:64-77.
- GRIBBLE, D.H. 1969. Equine Ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 155:462-469.
- GROVES, D.H; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L. & HUXSOLL, D.L. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.*, 36:937-940.
- HAIG, D.A. & DANSKIN, D. 1962. The aetiology of bovine

- petechial fever (Ondiri disease). *Res. Vet. Sci.*, 3:129- 138.
- HEMELT, IRENE E.; LEWIS, G.E. Jr.; HUXSOLL, D.L. & STEPHENSON, E.H. 1980. Serial propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocyte cultures. *Cornell Vet.*, 70:37-42.
- HESS, W.R. 1960. The use of leucocyte culture for diagnosing African Swine Fever. *Bull. Epizoot. Dis. African.*, 8:317-330.
- HILDEBRANDT, P.K. ; CONROY, J.D.; MCKEE, A.E. ; NYINDO, M.B.A. & HUXSOLL, D.L. 1973. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infect. Immunol.*, 7:265-271.
- KRAUSS, H.; DAVIES, F.G.; ODEGAARD, O.A. & COOPER, J.E. 1972. The morphology of the causal agent of bovine petechial fever (Ondiri disease). *J. Comp. Pathol.* 82:241-252.
- KREIER, J.P. 1977. Parasitic Protozoa Vol. IV *Babesia, Theileria, Myxosporidia, Microsporidia, Bartonellaceae, Anaplasmataceae, Ehrlichia* and *Pneumocystis*. Academic Press. INC. 386 p.
- KWAPINSKI, G. 1982. The methodology of investigative and clinical immunology. Robert E. Keieger. Publ. Co., Inc. 515 p.
- LESTOQUARD, F. & DONATIEN, A. 1936. Sur une nouvelle *Rickettsia* du mouton. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 29:105-108.
- LEVINE, N.D. 1973. Protozoan Parasites of domestic animals

- and of man. 2 ed. Minneapolis, Burgess. 406 p.
- LEWIS, G.E. Jr.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M. & JOHNSON, A.J. 1975. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.*, 36:85-88.
- LOPES, C.W.G. 1976. Ocorrência de Protófitas em Ruminantes e Suínos domésticos ainda não descritos no Brasil. Tese Mestrado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 73 p.
- MacLEOD, J. 1936. Studies in tick-borne fever of sheep. II. Experiments on transmission and distribution of the disease. *Parasitology.*, 28:320-329.
- MALBRANT, R.; BYRON, M. & RAPIN, P. 1939. Protozooses sanguines des animaux domestiques en Afrique Équatoriale Françaises. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 32:953-960.
- MASSARD, C. de A. & MASSARD, C.L. 1982. *Ehrlichia bovis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em Gado de Leite no Brasil. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J.*, 5(2):237-239.
- MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H.; MASSARD, C. de A. & ALVES G.H.I. 1982. Sobre o diagnóstico de *Eperythrozoon teganodes* Hoyte, 1962 (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos no Brasil. XVIII Cong. Bras. Med. Vet. Camboriu-SC. Anais p. 194.
- MASON, A. & NORVAL, R.A.I. 1981. The transfer of *Boophilus*

- microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. *Vet. Parasitol.*, 8:185-188.
- MOSHKOVSKI, C. 1937. Sur l'existence chez le cobaye, d'une rickettsiose chronique déterminée par *Rickettsia (Ehrlichia) kurlovi* subg. nov. sp. nov. *C. R. Soc. Biol. Paris.*, 126:379-382.
- MOSHKOVSKI, S.D. 1945. Cytotropic inducers of infections and the classification of the Rickettsiae with Chlamydozoa. *Adv. Mod. Biol.*, 19:1-44.
- MOSHKOVSKI, S.D. 1947. Comments by readers. *Science* (Washington), 106:62.
- NEITZ, W.O. 1956. Classification, Transmission and Biology of Piroplasms of Domestic Animals. *An. New York Acad. Sci.*, 64:56-111.
- NEITZ, W.O. 1957. Theileriosis, Gonderiosis and Cytauxzoonoses. A review. *Onderst. J. Vet. Res.*, 27(3):275-430.
- NEITZ, W.O. 1967. The Epidemiological pattern of viral, protophytal and protozoal zoonoses in relation to preservation in South Africa. *J. S. Afr. Med. Ass.*, 38(2):129-141.
- NEITZ, W.O. 1968a. Heart-water. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 70:329-336.
- NEITZ, W.O. 1968b. *Ehrlichia ovina* infection. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 70:337-340.

- NEITZ, W.O. 1968c. Tick-Borne-Fever. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 70:351-357.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F. & WALTERS, H.S. 1971. Laboratory investigations on the life-cycle of the Karao paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderst. J. Vet. Res.*, 38(3):215-224.
- NEITZ, W.O. & JANSEN, B.C. 1952. Onderstpoort Experimental Observations.
- NYINDO, M.B.A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. & SMITH, A.R. 1971. Tropical canine pancytopenia: In vitro cultivation of the causative agent - *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.*, 32:1651-1658.
- PELLISSIER, A.; TROQUEREAU, P. & TRINQUIER, E. 1950. Études sur les Rickettsioses humaines et animales in Afrique Équatoriale Française. III. Rickettsiose Générale du bouef différent de la heart water. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 43:168-176.
- PHILIP, C.B. 1953. Nomenclature of the rickettsiae pathogenic to vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 56(3):484-494.
- PHILIP, C.B. 1957. Class III. Microtato biotes In.; BREED; MURRAY & SMITH, Berghey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 933 p.
- PHILIP, C.B. 1974. The Rickettsias In.; BREED; MURRAY &

- SMITH, Berghey's Manual of Determinative Bacteriology, 8 th ed. The Willians & Wilkins Co. Baltimore, p. 893-897.
- PIERRE; F. 1983. L'ehrlichiose bovine en Côte d'Ivoire. Epidémiologie - Traitment - Prophyhaxie. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays. Trop.*, 36(4):337-341.
- PINTO, C. 1933. Profilaxia das Doenças infecciosas e Parasitárias dos animais domésticos no Brasil. *Tip. Ministério Agricultura*, RJ, 308 p.
- QUINLAN, J.; DE KOCK, G. & MARAIS, I.P. 1935. The operation of splenectomy in horses, cattle, sheep, goats, dogs, and some South African antilopes: A summary of the results of 98 splenectomies. *Onderst. J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, 5(1): 273-303.
- RIOCHE, M. 1966. La rickettsiose générale bovine au Sénégal. *Rev. Elev. Vét. Pays. Trop.* 19:485-494.
- RIOCHE, M. 1967. Lésions microscopiques de la rickettsiose générale bovine à *Rickettsia (Ehrlichia) bovis* (Donatien et Lestoquard, 1936). *Rev. Elev. Méd. Pays Trop.*, 20(3):415-427.
- RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M.; HILDEBRANDT, P.K. & NYINDO, M.B.A. 1972. Serological Diagnosis of Tropical Canine Pancytopenia by indirect Immunofluorescence. *Infect Immunity* 6(3):226-231.
- RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M. & LEWIS Jr., G.E.,



1973. Indirect fluorescent antibody test for detection of infections with *Ehrlichia equi* in horses, monkeys, dogs and cats. 54 th Annu. Meet. Conf. Res. Work. Anim. Dis., 47 (Abstract).
- RODRIGUES, L.C. 1980. Peste Suína Africana Estudo da resistência do vírus a ação do cristal violeta. Tese Mestrado, Univ. Fed. Rio Janeiro, 171 p.
- ROUSSELOT, R. 1943. Sur quelques hémocytozooses, connues on inconnues du Soudan Français. (Deuxième note). Bull. Serv. Zootech., A.O.F., 6:75-83. (Citado por GIRARD & ROUSSELOT, 1945).
- SANTOS, J.A. 1967. Contribuição ao estudo da anatomia patológica da anaplasnose bovina. Pesq. Agrop. Bras. 2:391-410.
- SENEVIRATNA, P. & DHANAPALA, S.B. 1963. *Ehrlichia bovis* like organisms in cattle in Ceylon. Ceylon Vet. J., 11:101.
- SENEVIRATNA, P. & JAINUDEEN, M.R. 1967. The presence of *Ehrlichia ovina* - like organisms in the mononuclear cells of sheep in Ceylon. Ceylon Vet. J., 15(4):141.
- SERRA FREIRE, N.M. 1979. Toxicidade de *Amblyomma cajennense* para ruminantes domésticos e sua significação como agente de uma nova forma de "Tick paralysis". Tese, Doutorado, Univ. Fed. Rur. Rio Janeiro, 119 p.
- SIMPSON, C.F. 1972. Structure of *Ehrlichia canis* - infected mononuclear cells to blood vessels of lung. Infect Immun.

10:590-596.

SMITH, R.D. & RISTIC, M. 1977. In Parasitic Protozoa. IV. *Ehrlichiae* (J.P. Kreier, ed.), 295-328.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M. & HUXSOLL, D.L. 1976. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. *Am. J. Vet. Res.*, 37:119-126.

STANNARD, A.A.; GRIBBLE, D.H. & SMITH, R.S. 1969. Equine ehrlichiosis: A disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *Vet. Rec.* 84:149-150.

SUTHERST, R.W.; WARTHON, R.H.; COOK, I.M.; SUTHERLAND, I.D. & BOURNE, A.S. 1979. Long-term population studies on the cattle tick (*B. microplus*) on untreated cattle selected for different levels of tick resistance. *Aust. J. Agric. Res.*, 30:353-368.

THRUSFIELD, M.V.; SYNGE, B.A. & SCOTT, G.R. 1978. Attempts to cultivate *Ehrlichia phagocytophila* in vitro. *Vet. Microbiol.*, 2:257-260.

TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. 1962. A importância da anaplasose em nossos bezerros e as medidas de seu controle. *Veterinária.*, 15(3-4):11-19.

TUOMI, J. 1967. Experimental studies on bovine tick-borne fever (1) Clinical and haematological data, some properties

- of the causative agent and homologous immunity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 70:429-445.
- TUOMI, J. & VON BONSDORFF, C.H. 1966. Electron microscopy of tick-borne fever agent in bovine and ovine phagocytizing leukocytes. *J. Bacteriol.*, 92:1478-1492.
- TYZZER, E.E. 1938. *Cytoecetes microti* N.G. (n.sp.) a parasite developing in granulocytes and infective for small rodents. *Parasitol.*, 30:242-257.
- UILENBERG, G. 1970. Notes sur le babesioses et l'anaplasmose des bovines à Madagascar. IV. Note additionnelle sur la transmission. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 23:309-312.
- WENYON, C.M. 1926. Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists. London, Baillière, Tindall & Cox. Vol. I e II.
- WOLDEHIWET, Z. & SCOTT, G.R. 1982. In vitro propagation of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. *Vet. Microbiol.*, 7:127-133.

NOTA DE PESQUISA

*Ehrlichia bovis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em Gado de Leite no Brasil

CLAUDETE DE A. MASSARD<sup>1</sup> e CARLOS LUIZ MASSARD<sup>2</sup>

1 Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e aluna de Pós-Graduação; 2 Professor Adjunto, bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 23460 Seropédica, RJ, Brasil.

(Aceito para publicação em 28.12.1982)

ABSTRACT.- Massard, Claudete de A., and Massard, C. L. 1982. *Ehrlichia bovis* (Rickettsiales : Rickettsiaceae) in dairy cattle in Brazil. Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J. 5(2): 237-239.

Attempts to identify haemoparasites occurring in dairy cattle from the States of Rio de Janeiro and Minas Gerais, Brazil, by using Giemsa stained blood smears, disclosed the presence of *Ehrlichia bovis* in the cytoplasm of mononuclear cells. The organism was frequently associated with *Babesia bigemina*, *B. bovis* or *Anaplasma marginale*, the etiological agents of the so called "tristeza parasitária bovina" (bovine parasitic sadness). *Ehrlichia bovis* was initially found in 11 bovines, less than one year old, showing organic debility and anaemia, and later in apparently healthy animals, probably bearing chronic infection. This is the first report of *E. bovis* in Brazil.

ADDITIONAL KEY WORDS: bovine, rickettsia, haemoparasite.

**RESUMO.-** Tentativas de identificar hemoparasitos em bovinos de diversas raças leiteiras e mestiços, provenientes dos Estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais, revelaram, através de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, a presença de *Ehrlichia bovis* no citoplasma de células mononucleares, freqüentemente associada a *Babesia bigemina*, *B. bovis* ou *Anaplasma marginale*, agentes etiológicos da "tristeza parasitária bovina". *Ehrlichia bovis* foi encontrada, inicialmente, em 11 bovinos com menos de um ano de idade, demonstrando sinais de debilidade orgânica e anemia, bem como, mais tarde, em animais aparentemente sadios, provavelmente com infecção de natureza crônica. Este é o primeiro registro de *E. bovis* no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAIS: bovinos, rickettsia, hemoparasito.

O género *Ehrlichia* compreende um grupo de rickettsias morfológicamente idênticas, parasitas de leucócitos de uma grande variedade de animais domésticos e silvestres (Buehanan & Gibbons, 1974).

A diferenciação entre as espécies parasitas de ruminantes baseia-se no tipo de célula parasitada, isto é, leucócitos mononucleares ou polimorfonucleares, na distribuição geográfica e na severidade da doença produzida.

*Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936) foi descrita em monócitos circulantes de bovinos parasitados por carrapatos do género *Hyalomma*, transferidos do Irã para a Argélia, determinando uma doença de severidade mediana. Posteriormente, os mesmos autores isolaram *E. bovis* de bovinos argelianos naturalmente infectados e transmitiram experimentalmente o parasito a ovinos e macacos. Subseqüentemente,

Girard & Rousselot (1945), Finelle (1958) e Rioche (1966) estudaram a doença em bovinos africanos naturalmente infectados e registraram a aparente existência de diferenças quanto à patogenicidade das cepas.

A doença pode ocorrer nas formas hiperaguda, aguda, subaguda ou crônica, variando os sintomas de acordo com essas formas. Na hiperaguda, os animais podem exibir sintomas nervosos e a morte sobrevém em cerca de 12 h. Nas demais formas, os principais sinais constam de hipertrofia dos linfonodos, anorexia, incoordenação, constipação e febre. As alterações patológicas produzidas por *E. bovis* foram descritas por Girard & Rousselot (1945) e Rioche (1966, 1967), bem como o quadro hematológico, com monocitose e eosinopenia intensas.

Durante estudos hematológicos de bovinos das raças leiteiras Guernsey e Holandesa, e de mestiços com as raças Gir, Indu-Brasil e Normando, foi diagnosticada a presença de *E. bovis* (Fig. 1) em animais, com diversos graus de morbidade. Nos rebanhos pesquisados era também elevada a taxa de mortalidade. Em um total de 39 animais examinados, de quatro propriedades rurais situadas no sudeste brasileiro (Estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais), o percentual de infecção foi de 28,2% e *E. bovis* estava associada a *Babesia bigemina* (Smith e Kilborne, 1893), *B. bovis* (Babés, 1888) ou *Anaplasma marginale*, Theiler, 1910, agentes causais da "tristeza parasitária bovina", em 15,3% dos casos. Assim, é possível que *E. bovis* venha a favorecer ou agravar as infecções por *Babesia* spp. e *A. marginale*. Pesquisas estão em andamento visando a elucidar esse aspecto do problema. Este é o primeiro registro de *E. bovis* no Brasil.

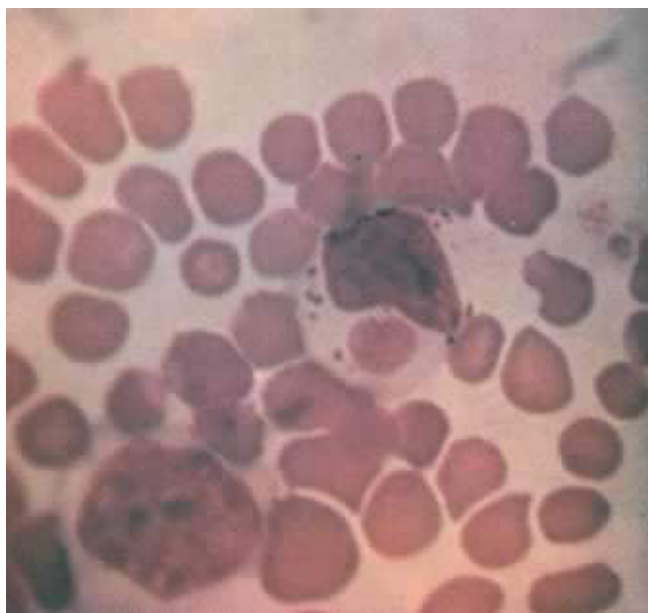


FIG. 1. Mórula de *Ehrlichia bovis* em linfócito de bovino. Esfregaço de sangue periférico de animal com infecção natural. (Giemsa, 1000 x)

#### LITERATURA CITADA

- Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E. (eds.) 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8<sup>a</sup> ed., Williams & Wilkins, Baltimore, Md. 1268 p.
- Donatien, A. & Lestoquard, F. 1936. *Rickettsia bovis* n. sp. pathogene pour le boeuf. Bull. Soc. Pathol. Exot. 29:1057-1061.
- Finelle, P. 1958. Rickettsiose à *Rickettsia bovis* en Oubangui-Chari. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 11:291-292.
- Girard, H. & Rousselot, R. 1945. La rickettsiose bovine à *Rickettsia bovis* au Soudan Français. Bull. Soc. Pathol. Exot. 38:64-76.
- Rioche, M. 1966. La rickettsiose générale bovine au Sénégal. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 19:485-494.
- Rioche, M. 1967. Lésions microscopiques de la rickettsiose générale bovine à *Rickettsia (Ehrlichia) bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936). Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 20:415-427.