

Ehrlichiose Granulocítica Humana
Conceitos actuais*

A. Santos[1], F. Bacellar[1], J. David de Morais[2]

1 Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Águas de Moura.
2 Departamento de Ecologia, Universidade de Évora, Évora.
* O primeiro autor foi apoiado por uma bolsa atribuída pela "Fundação para a Ciência e Tecnologia" (ref.ª BD/8610/2002).

EHRLICHIOSE HUMANA

A ehrlichiose é uma doença infecciosa tradicionalmente associada aos animais, que afecta diversos mamíferos domésticos e silváticos. É conhecida há mais de meio século, desde a descrição da ehrlichiose canina em 1935[1,2] e da ehrlichiose bovina e ovina em 1936[3,4]. Nas últimas décadas, esta doença tem merecido um interesse crescente em medicina humana, o que veio conduzir a intensas investigações nesta área até então considerada exclusivamente do âmbito veterinário.

Em termos etiológicos, a ehrlichiose é causada por bactérias Gram negativas intracelulares obrigatórias, que se desenvolvem no interior dos vacúolos fagossómicos de células eucariotas[5]. O ciclo de transmissão destes microrganismos inclui a infecção tanto de artrópodes vectores (essencialmente carraças) como de hospedeiros vertebrados. Nestes últimos, são infectadas predominantemente as células de origem hematopoiética, com excepção dos eritrocitos. Em termos taxonómicos, estes microrganismos foram reunidos num único grupo: o género *Ehrlichia* (pertencente à tribo Ehrlichiaeae, família Rickettsiaceae, ordem Rickettsiales). Estudos filogenéticos, com base em técnicas de biologia molecular, têm vindo a demonstrar a sua heterogeneidade e a proximidade de alguns dos seus membros com outros microrganismos. Assim, foi proposta a reclassificação de algumas ehrlichias no género *Neorickettsia* e no género *Anaplasma*, mantendo-se no género *Ehrlichia* apenas algumas das espécies originalmente descritas[6] (vide Quadro I). Compreender-se-á, pois, que quando hoje em dia falamos de "ehrlichioses" estamos, na verdade, do ponto de vista etiológico, a utilizar um termo que inclui afinal ehrlichioses propriamente ditas mas também anaplasmoses humanas, designativo este que, em rigor, deveríamos utilizar, e que por certo terá tendência a impor-se no futuro.

Embora, o primeiro caso de ehrlichiose humana (febre de Sennetsu) tenha sido documentado no Japão, em 1954,[7] a doença foi considerada de reduzida importância médica. Na verdade, esta ehrlichiose causada por *Neorickettsia* (*Ehrlichia*) *sennetsu* é pouco frequente e de gravidade moderada, não havendo registos de mortalidade associados, ocorrendo apenas em áreas limitadas do Extremo Oriente, raramente fora do Japão. Só nas últimas décadas do século XX, com a descoberta de outras ehrlichias associadas a patologias humanas de gravidade variável no Ocidente, é que foi radicalmente alterada a forma como a comunidade científica encarava a problemática da ehrlichiose humana.

Em 1986, foi diagnosticada pela primeira vez a ehrlichiose monocítica (ou monocitotrópica) humana (EMH), nos E.U.A..[8] Esta doença foi associada a uma nova espécie, designada por *Ehrlichia chaffeensis*.[9,10] Mais tarde, em 1994, foram descritos os primeiros casos de ehrlichiose granulocítica (ou granulocitotrópica) humana (EGH).[11] Como a identidade exacta do agente envolvido nesta doença era desconhecida, foi adoptada a designação de "agente da EGH". Em 1996, foram descritos na Venezuela casos de infecção humana por um agente semelhante a *Ehrlichia canis* (agente etiológico da ehrlichiose monocítica canina).[12] Mais recentemente, em 1999, também *Ehrlichia ewingii* (conhecido agente da ehrlichiose granulocítica canina) foi implicada em casos de ehrlichiose humana nos E.U.A..[13]

Actualmente, a EMH e a EGH são consideradas as ehrlichioses humanas mais importantes em Saúde Pública, não só pela sua alargada distribuição geográfica, mas também pela casuística que lhes está associada. Estas ehrlichioses ocorrem essencialmente nos Estados Unidos, havendo também registos da sua presença noutros pontos do globo. Na Europa, existem referências de infecção humana por um agente imunologicamente semelhante a *E. chaffeensis* em Portugal,[14] Espanha[15] e Bélgica.[16] Porém, estudos recentes apontam para que seja a EGH a ter um papel de relevo nos países europeus.

Com a presente revisão da EGH pretendemos alertar os clínicos para os principais aspectos epidemiológicos e clínicos, bem como para o diagnóstico e tratamento desta ehrlichiose, à semelhança do que já havia sido feito, por um de nós, para a EMH.[17]

EHRLICHIOSE GRANULOCÍTICA HUMANA

ETIOLOGIA

Como já foi referido, a ehrlichiose granulocítica humana é causada por um agente que permaneceu, até há bem pouco tempo, sem nomenclatura oficial, tendo sido designado por agente da EGH. Nos anos seguintes ao seu isolamento, foram reunidos dados genéticos,[11,18] antigénicos[19,20] e biológicos que sugeriam a existência de uma estreita relação com *Ehrlichia phagocytophila* (agente da febre da carraça dos ruminantes) e *Ehrlichia equi* (agente da ehrlichiose granulocítica equina), defenden-



do-se que representariam diferentes estirpes de uma única espécie. Actualmente essa hipótese está confirmada, e além disso há evidências da proximidade genética entre estes microrganismos e os anaplasmas, o que levou a que fosse proposta a sua reclassificação no Género *Anaplasma*, como uma única espécie, com a designação de *Anaplasma phagocytophila*[6,21](vide Fig. I).

EPIDEMIOLOGIA

Desde que foi descrita pela primeira vez no Minnesota e Wisconsin, em 1994, a EGH têm vindo a ser sucessivamente identificada em diversos estados americanos, apresentando actualmente uma vasta distribuição geográfica nos Estados Unidos. Ao contrário da EMH, que está confinada à região Sul e Sudoeste, esta ehrlichiose ocorre predominantemente na região Nordeste e Noroeste do País, apresentando nas áreas endémicas uma frequência semelhante à verificada para a borreliose de Lyme.[22] O principal ixodídeo vector é *Ixodes scapularis*, também implicado na transmissão de *Borrelia burgdorferi* (agente etiológico da borreliose de Lyme) e de *Babesia microti* (associada a casos de babesiose humana). O ciclo epidemiológico do agente envolve pequenos roedores e ruminantes silváticos, principalmente veados, que servem de hospedeiros vertebrados aos artrópodes vectores.[23,24,25,26,27] Esta doença afecta um largo espectro de mamíferos, incluindo equídeos, ruminantes, canídeos e o Homem.[20,28,29,30,31] A infecção humana está associada ao contacto com o ixodídeo vector. No entanto, a descrição de um caso de infecção perinatal[32] e a associação da doença à manipulação de carne fresca de cervídeos[33] realça a existência de vias alternativas de infecção.

O crescente interesse por este tema e o desenvolvimento de linhas de investigação a nível mundial revelaram evidências significativas de que EGH não está confinada apenas aos Estados Unidos, ocorrendo também noutros países, principalmente da Europa. O contacto com *A. pahagocytophila* (estirpe agente da EGH) foi detectado em estudos serológicos realizados no Reino Unido,[34] Suíça,[35] Noruega,[36] Suécia[37] e Espanha.[38] Estudos moleculares também identificaram a presença de ADN específico do agente em carraças *Ixodes ricinus* capturadas na Itália,[39] Suécia,[40] França,[41] Eslovénia,[42] Alemanha,[43] Holanda,[44] Suíça,[45] Portugal[46] e Espanha[38]. Há também uma referência à detecção de ADN específico em ácaros *Neotrombicula autumnalis* em Espanha.[47] Estes dados sugerem que *A. phagocytophila* apresenta uma larga distribuição geográfica na Europa, partilhando o mesmo biótopo que o agente da borreliose de Lyme e sendo transmitido pelo mesmo ixodídeo vector (*I. ricinus*). Embora a sua associação a patologias humanas seja, até à data, reduzida,[48,49] julga-se provável que esta realidade possa estar subavaliada devido possivelmente à falta de sensibilização dos clínicos e à escassez de laboratórios com o diagnóstico específico.

CLÍNICA

O tempo médio de incubação da ehrlichiose humana cifra-se em cerca de oito dias.[50]

Comparativamente com a ehrlichiose monocítica, a ehrlichiose granulocítica costuma cursar com quadros clínicos mais moderados (vide Quadro II). A sintomatologia mais frequente da EGH inclui febre, arrepios, mal-estar geral, cefaleias e mialgias, podendo estas ser muito intensas. Cerca de metade dos doentes podem também apresentar anorexia, náuseas, vómitos, dores abdominais, diarreia, tosse e artralgias.[51] Em menos de 10% dos casos pode coexistir *rash* cutâneo.[52,53] Embora raramente, o quadro clínico pode evoluir para rabdomiólise, miocardite, falência respiratória aguda, *shock* séptico, polineuropatia desmielinizante, meningite asséptica e meningoencefalite.[52,53,54,55,56,57,58] Os casos mais graves e que requerem períodos mais prolongados de internamento hospitalar respeitam muitas vezes a indivíduos idosos, diabéticos, pacientes com doenças vasculares do colagénio, imunodeprimidos e casos de diagnóstico tardio de ehrlichiose.[51] Estão também referidas complicações importantes do quadro clínico em indivíduos a quem foi administrada terapêutica antibiótica prévia com co-trimoxazol, como aliás acontece nas ricketsioses em geral.[59]

A mortalidade na EGH cifra-se entre 0,5 e 1%, enquanto na EMH costuma ser mais elevada: 2,7%.[51]

DIAGNÓSTICO

A hipótese de ehrlichiose deverá ser posta face a quadros febris de origem incerta com:

- história de picada de ixodídeo e/ou exposição a ixodídeos em área endémica nas duas semanas prévias;
- existência de trombocitopenia e leucopenia;
- aumento dos valores das transaminases séricas.

Nestes casos os testes laboratoriais são imprescindíveis, visto ser virtualmente

impossível o diagnóstico definitivo da EGH apenas com base em aspectos epidemiológicos e clínicos.[60] Os testes laboratoriais disponíveis são de dois tipos: directos, que visam a detecção do agente (exame microscópico, análise molecular e isolamento) ou indirectos, que detectam anticorpos produzidos na sequência da infecção (análises sero-imunológicas).[61]

Como *A. phagocytophila* infecta células de origem mielocítica, apresentando um marcado tropismo por neutrófilos, sangue total com anti-coagulante (preferencialmente sem heparina) e aspirado medular (se clinicamente apropriado) são as amostras mais adequadas para a realização dos testes directos. Este material biológico deve ser obtido durante a fase aguda da doença, antes da instituição da terapêutica antibiótica. As amostras devem ser refrigeradas a 4ºC, mantidas no recipiente de colheita para garantir condições de esterilidade (situação indispensável caso se pretenda fazer o isolamento do agente) e enviadas no frio para o laboratório (idealmente nas 24h subsequentes à colheita). As amostras de soro ou plasma dos doentes destinam-se apenas aos testes imunológicos. É importante salientar que 60% dos doentes com suspeita de ehrlichiose apresentam resultados serológicos negativos na fase aguda da doença, verificando-se que mais de 80% destes casos desenvolvem posteriormente níveis de anticorpos detectáveis.[60] O estudo da cinética dos anticorpos da EGH tem mostrado que o aparecimento de imunoglobulinas específicas ocorre durante a segunda semana de doença, verificando-se uma elevação dos títulos até às quatro a seis semanas, permanecendo elevados durante vários meses.[61,62] É pois recomendável para os testes indirectos o envio de duas amostras de soro/plasma do doente: a primeira, o mais precocemente possível, seguida de uma segunda amostra colhida 4 a 8 semanas depois.[60]

O exame microscópico é realizado por observação dos esfregaços de sangue periférico corados por Giemsa ou *Diff Quick* para pesquisa de agregados bacterianos intra-leucocitários (mórulas). No entanto, devido à leucopenia que frequentemente é observada durante a fase aguda da EGH e ao baixo nível de infecção celular é recomendável a realização de uma concentração leucocitária e a observação de 800-1000 granulocitos por esfregaço.[61] Todavia, importará referir que, nos EUA, a detecção de mórulas na primeira semana, só ocorreu em cerca de 62% dos casos de EGH[63] e que na Europa ela tem sido bastante mais rara.[64] Acrescenta-se ainda a possibilidade de ocorrerem falso positivos. A presença de granulações intra-leucocitárias (como granulações tóxicas ou corpos de Döhle) e a sobreposição de plaquetas ou partículas contaminantes poderão ser confundidas com mórulas de ehrlichia.[60] Assim, o exame microscópico não deverá por si só ser suficiente para confirmar o diagnóstico de EGH.

A análise molecular é uma alternativa. A reacção de polimerase em cadeia (PCR) é a técnica molecular de eleição para o diagnóstico da EGH. A sensibilidade desta técnica varia entre 67-87% e a especificidade é próxima dos 100%.[65] Existem diversos pares de oligonucleotidos que podem ser usados na detecção das estirpes de *A. phagocytophila* por PCR. Na sua grande maioria amplificam segmentos do gene que codifica a sub-unidade 16S do ARN ribossomal ou a região do operão *gro*ESL.[11,18]

O isolamento do agente é ainda outra técnica directa para confirmar o diagnóstico de EGH. A cultura de ehrlichias é correntemente realizada em células HL-60,[66] mas esta técnica só está disponível em laboratórios especializados. Demais, o crescimento das ehrlichias poderá levar vários dias ou até mais de duas semanas, tornando moroso o resultado da confirmação laboratorial.

Em termos práticos, é pois nas análises sero-imunológicas que muitas vezes assenta o diagnóstico definitivo de ehrli-

Quadro I - Classifica;ão actual e principais aspectos epidemiológicos dos agentes tradicionalmente associados a ehrlichioses

Agente etiológico	Doença	Vectores/Hospedeiros	Tropismo celular
Género *Ehrlichia*			
E. canis	Ehrlichiose monocítica canina	Ixodídeos/Canídeos	Leucocitos mononucleares
E. chaffeensis	Ehrlichiose monocítica humana	Ixodídeos/Cervídeos, canídeos e homem	Leucocitos mononucleares
E. ewingii	Ehrlichiose granulocítica canina	Ixodídeos/Canídeos e homem	Leucocitos polimorfonucleares
E. muris	Provoca esplenomegalia	Ixodídeos/Roedores	Leucocitos mononucleares
Género *Anaplasma*			
A. phagocytophila (*Ehrlichia phagocytophila*)	Febre da carraça dos ruminantes	Ixodídeos/Ruminantes	Leucocitos polimorfonucleares
A. phagocytophila (*Ehrlichia equi*)	Ehrlichiose granulocítica equina	Ixodídeos/Equídeos	Leucocitos polimorfonucleares
A. phagocytophila (agente da EGH)	Ehrlichiose granulocítica humana	Ixodídeos/Ruminantes, equídeos, canídeos e homem	Leucocitos polimorfonucleares
A. bovis (*Ehrlichia bovis*)	Ehrlichiose bovina	Ixodídeos/Ruminantes	Leucocitos mononucleares
A. platys (Ehrlichia platys)	Trombocitopenia cíclica infecciosa dos canídeos	Ixodídeos/Canídeos	Plaquetas
Género *Neorickettsia*			
N. sennetsu (*Ehrlichia sennetsu*)	Febre de Sennetsu	Trematódos/Homem	Leucocitos mononucleares
N. risticii (*Ehrlichia risticii*)	Síndroma diarreíco agudo dos equídeos	Trematódos/Equídeos	Leucocitos mononucleares

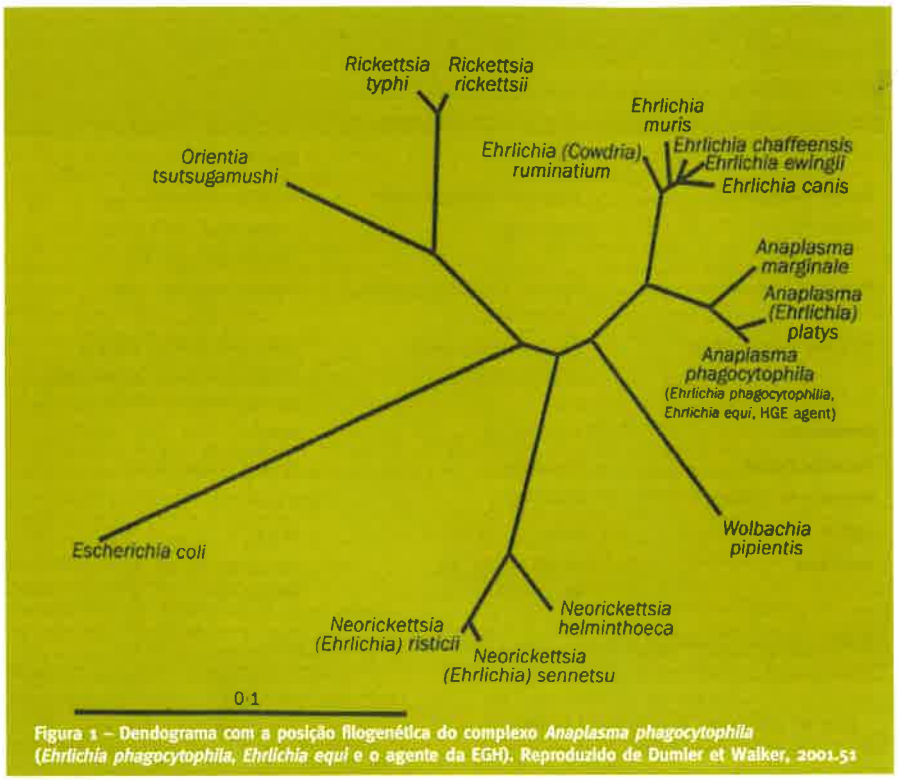


Figura 1 – Dendograma com a posição filogenética do complexo *Anaplasma phagocytophila* (*Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da EGH). Reproduzido de Dumler et Walker, 2001.[51]

chiose. A pesquisa de imunoglobulinas das classes M e G por imunofluorescência indirecta (IFA) é a técnica aconselhada.[60] Devem ser usados como antigénio isolados de *A. phagocytophila* (estirpes *E. phagocytophila*, *E. equi* ou agente da EGH) e o limiar de positividade (diluição a partir da qual um soro deve ser considerado positivo) deve ser determinado por cada laboratório.[60] A sensibilidade da IFA nos casos de EGH confirmados por exame cultural é superior a 95%.[61] Outros testes serológicos como ELISA e Imunoblot, com microrganismos purificados ou com proteínas recombinantes, estão a ser desenvolvidos e tudo indica que a curto prazo possam vir a ser aplicados correntemente no diagnóstico da EGH.[67,68,69,70]

A confirmação laboratorial de um caso de EGH, com diagnóstico clínico compatível, é definida por: (i) seroconversão; (ii) alteração do título de anticorpos de pelo menos quatro vezes, relativamente ao título do soro inicial; (iii) detecção de mórulas no exame microscópico, associado a PCR positivo; (iv) isolamento do agente em cultura celular. Considera-se ainda como caso provável a detecção de mórulas intra-leucocitárias ou a presença de uma única amostra de soro com título superior ao limiar de positividade.[60,62,71]

O Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI) dispõe actualmente do teste de IFA para a detecção de infecções pelo agente EGH. Nesta análise é utilizado antigénio comercial (# IF 1402, Focus Technologies), bem como antigénio fornecido Prof. Stephen Dumler, da Divisão de Microbiologia Médica do Departamento de Patologia, Johns Hopkins Medical Institutions, EUA.

TRATAMENTO

Para além da terapêutica sintomática eventualmente necessária, o tratamento de escolha da ehrlichiose assenta na prescrição da doxiciclina. A dose habitualmente recomendada é de 100 mg, 2 vezes/dia, durante uma semana, ou mais três a cinco dias após a defervescência da febre. Todavia, em áreas endémicas de borreliose de Lyme, o tratamento deverá ser mantido, em princípio, durante duas a três semanas, dada a possibilidade de existência de infecção simultânea pelas duas zoonoses.[43,72] Uma vez que o diagnóstico laboratorial poderá demorar algum tempo, frente a um caso de suspeita de ehrlichiose a terapêutica antibiótica apropriada deverá ser logo instituída.[73]

In vitro, as ehrlichias mostraram-se também sensíveis à rifamicina e à rifampicina, sendo este último antibiótico habitualmente preferido em grávidas infectadas.[74]

As ehrlichias não evidenciaram sensibilidade às cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrólidos e cloranfenicol,[51,52] pelo que são questionáveis alguns pretensos bons resultados obtidos com tais antibióticos. Recorde-se que nos casos mais frustres de ehrlichiose a sintomatologia pode regredir espontaneamente sem qualquer terapêutica, além de poderem existir casos assintomáticos, como o atestam os inquéritos sero-epidemiológicos.

Como já antes dito, face a um diagnóstico presuntivo de ehrlichiose a terapêutica com co-trimoxazol deverá ser completamente banida.

COMENTÁRIO FINAL

No caso concreto de Portugal, a descoberta do agente da EGH em território nacional e a sua associação ao ixodídeo vector implicado na transmissão da *B. burgdorferi*[6] poderá ter amplas implicações em Saúde Pública.

A borreliose de Lyme só agora começou a merecer mais atenção por parte das entidades oficiais, sendo desde 1999 uma doença de declaração obrigatória.[75] Contudo, do universo de episódios febris supostamente relacionados com a borreliose de Lyme, apenas numa parte dos casos este diagnóstico é confirmado laboratorialmente.[76,76] Assim, e à luz desta nova descoberta, é possível que algumas dessas situações "não conclusivas" sejam de facto resultantes da infecção humana por este novo agente. Deverá também ser considerada a possibilidade de infecções conjuntas do agente EGH e de *B. burgdorferi*, à semelhança do que se verifica noutros países onde estes dois agentes coexistem. [37,78,79,80]

CORRESPONDÊNCIA

Ana Sofia Santos. Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 2965 Águas de Moura, Portugal.
Telef. 265 912 222; Fax. 265 912 155;
e-mail: ana.santos@insa.min-saude.pt

SUMÁRIO

A ehrlichiose humana representa um dos melhores exemplos de doenças infecciosas emergentes, com a ehrlichiose granulocítica humana (EGH) a merecer o papel de maior destaque na Europa. Esta doença é causada por um conhe-

cido agente de interesse veterinário *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*. Estudos recentes demonstraram que este agente ocorre em vários países europeus, designadamente Portugal, partilhando a mesma área geográfica do agente da borreliose de Lyme, e sendo transmitido pelo mesmo ixodídeo vector (*Ixodes ricinus*). Embora o número de casos de infecção humana por este agente seja até à data reduzido, os autores discutem o facto desta zoonose poder estar subavaliada devido possivelmente à falta de sensibilização dos clínicos e à escassez de laboratórios equipados para o diagnóstico específico. Este artigo aborda os principais aspectos epidemiológicos, clínicos, de diagnóstico e tratamento da EGH. Os autores pretendem também divulgar que o CEVDI tem à disposição técnicas serológicas para o diagnóstico laboratorial de EGH.

Quadro II
Principais aspectos epidemiológicos, clínico e laboratoriais distintivos das duas principais ehrlichioses humanas

	EGH	EMH
Agente etiológico	*Anaplasma phagocytophila*	*Ehrlichia chaffeensis*
Vector	*Ixodes* spp.	*Amblyomma americanum* *Dermacentor variabilis*
Principais hospedeiros	Homem, cervídeos, roedores, cavalos, cães	Homem, cervídeos, cães
Principal sintomatologia	Febre, mal-estar geral, cefaleias, mialgias	Idem, rash cutâneo, falência respiratória aguda, falência renal aguda, meningoencefalite
Mortalidade	0,5 a 1%	2,7%
Tropismo celular	Neutrófilos	Monocitos/macrófagos
Presença de mórulas	10 a 73%	0 a 1%
Cultura de células	HL60	DH82
Imunoblot	25, **40**, 42, **44**, 46, **65**, 110 kD	22, 25, **27**, **29**, **44**, 55, 66, 120 kD

Quadro adaptado de Bakken et Dumler, 2000 e Dumler et Walker, 2001.51,63

ABSTRACT

Human ehrlichiosis represent one of the best examples of newly emergent infectious diseases with human granulocytic ehrlichiosis (HGE) standing out as the most relevant in Europe. This disease is caused by a well-known veterinary pathogen *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*. Recent studies suggest that this agent may occur broadly across several European countries, including Portugal, within the same geographic range as the Lyme borreliosis agent and sharing the same vector tick (*Ixodes ricinus*). Although the number of human infection is few, the authors discuss the possibility that this zoonotic disease could be underestimated due to a lack of physician awareness and unavailability of current laboratory diagnosis. This article focuses on the epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment of HGE. The authors also point out that CEVDI has already available serologic tests for the diagnosis of HGE.

BIBLIOGRAFIA

1 - Donatien A, Lestoquard F. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. *Bull Soc Path Exot* 1935; 27: 418-9.
2 - Donatien A, Lestoquard F. État Actuel des Connaissances sur les Rickettsioses Animales. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie* 1937; 15(2): 162-77.
3 - Donatien A, Lestoquard F. *Rickettsia bovis*, novelle espèce pathogène pour le bœuf. *Bull Soc Path Exot* 1936 ; 29 : 1057-61.
4 - Donatien A, Lestoquard F. Sur une nouvelle rickettsia du mouton. *Bull Soc Path Exot* 1936; 29 : 105-8.
5 - Ristic M, Huxsoll DL. Tribe II. *Ehrlichiae* Philip 1957. In: Krieg NR, Holt JG (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984; p, 704-11.
6 - Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51(6): 2145-65.
7 - Misao T, Kobayashi Y. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). I. Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. *Kyushu J Med Sci* 1955; 6:145-52.
8 - Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N Eng J Med* 1987; 316: 853-6.
9 - Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sanchez JL, Goldsmith CS, Wilson KH, et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia sp.* from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(12): 2741-5.
10 - Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(12): 2838-42.
11 - Chen S-M, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic ehrlichia species as the etiologic agent of human diseases. *J Clin Microbiol* 1994; 32(3): 589-95.
12 - Perez M, Rikihisa Y, Wen B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin* Microbiol 1996; 34(9): 2133-9.
13 - Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikihisa Y, et al. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1999; 341(3): 148-55.
14 - David de Morais JA, Dawson JE, Greene C, Filipe AR, Galhardas LC, Bacellar F. First european case of ehrlichiosis. *Lancet* 1991; 338: 633-4.
15 - Saz JV, Dawson JE, Bacellar F, Merino FJ, Filipe A. A propósito de la ehrlichiosis humana en España. *Enfermedades Infecciosas e Microbiologia Clinica* 1994; 7(7): 357-8.
16 - Pierard D, Levtchenko L, Dawson JE, Lauwers S. Ehrlichiosis in Belgium. *Lancet* 1995; 346: 1233-4.
17 - David de Morais JA. Epidemiologia e clínica da ehrlichiose humana. A propósito do primeiro caso diagnosticado na Europa. *Rev Port Doenças Infec* 1992; 15(1): 7-18.
18 - Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol* 1997; 35(8): 2087-92.
19 - Dumler JS, Asanovich KM, Bakken JS, Richter P, Kimsey R, Madigan JE. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* and human Granulocytic Ehrlichia. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5): 1098-103.
20 - Barlough JE, Madigan JE, DeRock E, Dumler JS, Bakken JS. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic ehrlichia (HGE agent). *J Clin Microbiol* 1995; 33(12): 3333-34.
21 - Yu X-J, Zhang X-F, McBride JW, Zhang Y, Walker D. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and "*Ehrlichia platys*" to other *Ehrlichia* species determined by GroEL amino acid sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1143-6.
22 - Dumler JS. The ehrlichioses: an overview. *Infect Dis Review* 1999; 1(2):110-2.
23 - Telford SR, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6209-14.
24 - Belongia EA, Reed KD, Mitchell PD, Kolbert CP, Persing DH, Gill JS, et al. Prevalence of granulocytic *Ehrlichia* infection among white-tailed deer in Wisconsin. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1465-68.
25 - Walls JJ, Greig B, Neitzel DF, Dumler JS. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4): 853-5.

26 - Nicholson WL, Muir S, Sumner JW, Childs JE. Serologic evidence of infection with *Ehrlichia spp.* in wild rodents (Muridae: Sigmodontinae) in the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3): 695-700.
27 - Nicholson WL, Castro MB, Kramer VL, Sumner JW, Childs JE. Dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) as reservoirs of granulocytic ehrlichiae (Rickettsiales: Ehrlichieae) in Northern California. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3323-7.
28 - Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler, JS. Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of Granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 1996; 34(1): 44-8.
29 - Madigan JE, Barlough JE, Dumler JS, Schankman NS, DeRock E. Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. *J Clin Microbiol* 1996; 32(2): 434-5
30 - Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Litschi B, Parvis A, Lutz H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(9): 2307-9.
31 - Pusterla N, Pusterla JB, Deplazes P, Wolfensberger C, Muller W, Horauf A, et al. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and Canine granulocytic ehrlichia infection in Dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3460-2.
32 - Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Aguero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, et al. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1998; 339: 375-8.
33 - Bakken JS, Krueth J, Lund T, Malkovitch D, Asanovich K, Dumler JS. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 198.
34 - Sumption KJ, Wright DJ, Cutler SJ, Dale BA. Human ehrlichiosis in the UK. *Lancet* 1995; 346(2): 1487-88.
35 - Brouqui PH, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* 1995; 346(16):782-3.
36 - Bakken JS, Krueth J, Tilden RL, Dumler JS, Kristiansen BE. Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Norway. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 829-32.
37 - Dumler JS, Dotevall L, Gustafson R. A Population–based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. *J Infect Diseases* 1997; 175: 720-2.
38 - Oteo JA, Gil H, Barral M, Pérez A, Jimenez S, Blanco JR, et al. Presence of granulocitic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect* 2001; 127: 353-8.
39 - Cinco M, Padovan D, Murgia R, Maroli M, Frusteri L, Heldtander M, et al. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3365-66.
40 - Von Stedingk LV, Gurtelschmid M, Hanson HS, Gustafson R, Dotevall L, Engvall EO, et al. The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3:573-4.
41 - Parola P, Beati L, Cambon M, Brouqui P, Raoult D. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *J Med Entomol* 1998; 35: 180-3.
42 - Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Strle F, Barlic J, et al. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *J Clin Microbiol* 1999; 37(1): 209-10.
43 - Baumgarten BU, Rollinghoff M, Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3448-51.
44 - Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SGT, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2215-22.
45 - Pusterla N, Leutenegger CM, Huder JB, Weber R, Braun U, Lutz H. Evidence of human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5):1332-4.
46 - Núncio MS, Schouls LM, Van De Pol I, Bacellar F, Filipe A. The role of *Ixodes ricinus* as a vector of zoonotic agents in Madeira Island. Oxford: Seventh Bienal Meeting of European Tick Study Group; 28 de Abril 2000.
47 - Fernández-Soto P, Manzano R, García-Varas S, Madrazo C, Pérez-Sánchez R, Encinas A. Las larvas de *Neotrombicula autumnalis* son probables vectores de *Ehrlicia phagocytophila*. *Acta Parasitológica Portuguesa* 2001; 8: 325.
48 - Petrovec M, Furlan SL, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, et al. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1556-9.
49 - Lotric-Furlan S, Petrovec M, Zupanac TA, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE, et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 424-8.
50 - Walker DH, Dumler JS. Emergence of the ehrlichiose as human health problems. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 18-28.
51 - Dumler JS, Walker DH. Tick-borne ehrlichioses. *Lancet Infectious Diseases*, April 2001: 21-8.
52 - Aguero-Rosenfeld ME, Horowitz HW, Wormser GP, Mckenna DF, Nowakowski J, Muñoz J. Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. *Ann Intern Med* 1996; 125: 904-8.
53 - Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, Tilden RL, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA* 1996; 275: 199-205.
54 - Horowitz HW, Marks SJ, Weintraub M, Dumler JS. Brachial plexopathy associated with human granulocytic ehrlichiosis. *Neurology* 1996; 46: 1026-9.
55 - Shea KW, Calio AJ, Klein NC, Cunha BA. *Ehrlichia equi* infection associated with rhabdomyolysis. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 605.
56 - Wong S, Grady LJ. Ehrlichia infection as cause of severe respiratory distress. *N Eng J Med* 1996; 334: 273.
57 - Bakken JS, Erlemeyer AS, Kanoff RJ, Silvestrini TC, Goodwin DD, Dumler JS. Demyelinating polyneuropathy associated with human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1323-4.
58 - Jahangir A, Kolbert C, Edwards W, Mitchell P, Dumler JS, Persing DH. Fatal pancarditis associated with humam granulocytic ehrlichiosis in a 44-year-old man. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1424-7.
59 - Peters TR, Edwards KM, Standaert SM. Severe ehrlichiosis in an adolescent taking trimethroprim--sulfamethoxazole. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 170-1.
60 - Walker DH. Task Force on Consensus Approach for Ehrlichiosis. Diagnosing human ehrlichiosis: current status and recommendations. *ASM News* 2000; 66(5):287-90.
61 - Aguero-Rosenfeld ME, Kalantarpour F, Baluch M, Horowitz HW, Mckenna DF, Raffalli JT, et al. Serology of culture-confirmed case of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 635-8.
62 - Aguero-Rosenfeld ME. Diagnosis of HGE - state of art. Presentation summaries of the *IX International Conference on Lyme Borreliosis and Other Tick-borne Diseases*. New York; 18-22 Ago. 2002, p. 93-6.
63 - Bakken JS, Dumler JS. Ehrlichiosis. In: Cunha BA, edit. *Tick-borne Infectious Diseases*. New York: Marcel Dekker; 2000, p. 139-68.
64 - McQuiston JH, Paddock CD, Holman RC, Childs JE. The human ehrlichioses in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 635-42.
65 - Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE, et al. Human ehrlichiosis in central Europe. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110: 894-7.
66 - Olano JP, Walker DH. Human ehrlichiosis. *Medical Clinics of North America* 2002; 86(2): 375-91.
67 - Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Munderloh UG. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 209-215.
68 - Ravyn MD, Goodman JL, Kodner CB, Westad DK, Coleman LA, Engstrom SM, et al. Imunodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by using culture-derived human isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6): 1480-8.
69 - Zhi N, Ohashi N, Rikihisa Y, Horowitz HW, Wormser GP, Hechemy K. Cloning and expression of the 44 kilodanton major outer membrane protein gene of the human granulocytic ehrlichiosis agent and application of the recombinant protein to serodiagnosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 1666-73.
70 - Ijdo JW, Wu C, Magnarelli LA, Fikrig E. Serodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by a recombinant HGE-44-based enzyme-linked immunos orbent assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3540-4.
71 - Unver A, Felek S, Paddock CD, Zhi N, Horowitz HW, Wormser GP, et al. Western blot análisis of sera reactive to human monotytic ehrlichiosis and human granulocytic ehrlichiosis agents. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 3982-6.
72 - CDC – Centers for Diseases Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46: 46-7.
73 - Nadelman RB, Horowitz HW, Hsieh T-C, Wu JM, Aguero-Rosenfeld ME, Schwartz IS, et al. Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Eng J Med* 1997; 337: 27-30.
74 - Schaffner W, Standaert SM. Ehrlichiosis - in pursuit of an emerging infection. *N Eng J Med* 1996; 334: 262-3.
75 - Buitrago MI, Ijdo JW, Rinaudo P, Simon H, Copel J, Gadbaw J, et al. Human granulocytic ehrlichiosis during pregnancy treated successfully with rifampin. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 213-5.
76 - DGS. Doenças de declaração obrigatória 1995-1999. Lisboa: Direcção de Serviços de Informação e Análises, Divisão de Epidemiologia, Direcção-Geral de Saúde; 2000, p. 53.
77 - David de Morais JA, Leitão AL, Páscoa B, Filipe AR, Núncio MS. Doença de Lyme A nossa experiência clínica na região do Alentejo. *Rev Port Doenças Infec* 1992; 15(4): 227-45.
78 - Núncio-Soares MS. Contribuição para o estudo de borrélias e borreliose de Lyme em Portugal. Tese doutoral. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2002.
79 - Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi, Babesia microti* and Human Granulocytic Ehrlichia species in residents of Wisconsin and Minesota. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3): 724-7.
80 - Magnarelli LA, Ijdo JW, Anderson JF, Padula SJ, Flavell RA, Fikrig E. Human exposure to a granulocytic ehrlichia and other tick-borne agents in Connecticut. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10):2823-7.
81 - Bjoersdorff A, Brouqui P, Eliasson I, Massung RF, Wittesjo B, Berglund J. Serological evidence of ehrlichia infection in swedish Lyme borreliosis patients. *J Infect Dis* 1999; 31(1): 51-5.