



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINARIA

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E SOROLÓGICA DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR HEMOPARASITAS**

RECIFE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINARIA

LIDIANA CARVALHO DE HOLANDA

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E SOROLÓGICA DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR HEMOPARASITAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em ciência veterinária.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Andrea Alice da Fonseca Oliveira

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINARIA

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E SOROLÓGICA DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR HEMOPARASITAS**

Dissertação de Mestrado elaborada por:

LIDIANA CARVALHO DE HOLANDA

Aprovada em 25 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Andréa Alice da Fonseca Oliveira
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE

Profª Drª Eneida Willcox Rêgo
Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE

Dr. Josenaldo Silva Macêdo
Médico Veterinário

Ficha catalográfica

H722a Holanda, Lidiana Carvalho de

Avaliação hematológica e sorológica de cães naturalmente infectados por hemoparasitas / Lidiana Carvalho de Holanda.

– Recife, 2016.

62 f. : il.

Orientadora: Andrea Alice da Fonseca Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2016.

Inclui referências e anexo(s).

1. Anaplasma platys 2. Erlichia Canis 3. Hemograma
4. Mielograma 5. Snapp 4Dx Plus I. Oliveira, Andrea Alice da
Fonseca, orientador II. Título

CDD 636.089

Dedico esta dissertação aos meus pais, Carlos e Fernanda, ao meu irmão, Leo e ao meu futuro esposo Zuki.

AGRADECIMENTOS

É chegado o fim de mais um ciclo em minha vida. Ao longo desse ciclo acredito ter evoluído ao ponto de hoje reconhecer que a vida é assim... feita de ciclos, uns mais difíceis que outros. E é com essa maturidade, que venho agradecer aos que contribuíram para esse aprendizado.

Sou grata e temente a um Deus vivo que dia a dia me enche de alegria e me mostra o quanto é fiel, que vive em mim e que me faz viver pela fé, que faz em mim o seu querer, ou seja, me faz feliz.

Aos meus amados pais, agradeço todo amor, o carinho, apoio e incentivo em todas as decisões que tenho tomado em minha vida.

Ao Léo, meu irmão, agradeço por ser um lindo ser humano que me encanta e orgulha sempre.

Quero mais uma vez agradecer a minha doce Shena, por ter me incentivado a escolher essa profissão encantadora e por só ter partido ao perceber que eu estava realizada com essa carreira. E também às lindas: Darinha e Abajur e a todos os queridos animais que me dão a honra de trocar energias e que me ajudam a cumprir minha missão nesta vida.

E o que seria de uma mestranda sem o apoio de amigos/colegas de profissão? Serei eternamente grata por todo suporte que tive das minhas amigas Luana, que foi o lado suavizador de problemas sempre me acalmando nos momentos de desespero, Rebeca, que me acolheu e me ajudou em todas as etapas da pesquisa, ao Joca, que me incentiva e inspira profissionalmente ao longo de toda minha vida acadêmica. E principalmente a Telga por ter dedicado a mim muito tempo de sua vida, por ter acreditado na viabilização desse projeto, por ter corrigido um monte de coisa, por me receber sempre com um almoço em sua casa, por esclarecer muitas dúvidas e principalmente por sempre ter um sorriso engraçado enquanto fazia tudo isso.

Aos irmãos da vida que chamo de amigos agradeço pela compreensão de vocês nos momentos em que me fiz ausente em prol da minha pesquisa, e agradeço ainda mais por ainda assim estarem presentes nos dias mais simbólicos que tive durante esses dois anos.

As minhas amigas da graduação que apesar da distância física estão sempre presentes e dispostas a me ajudar, Camila, Déa, Prys, Livinha e Carol... vocês são lindas!

Meus queridos irmãos do Ciclo Rosa e a todos que constituem a Igreja Episcopal Carismática obrigada pelas orações e apoio que revigoram dia a dia a minha fé em Cristo.

Ao meu querido Mazurki, que me mostrou que eu estava errada ao pensar que não iria mais me apaixonar. Com você eu fico muito mais feliz. Branquinho você chegou para transbordar minha alegria. Muito obrigada por sua paciência, apoio, cuidado, cumplicidade, lealdade, por me ensinar a ser ainda mais disciplinada, obrigada por me instruir o Krav Maga, pois ele me faz muito bem. Te amo Vida!

Obrigada a Sueli, que com um dom especial me ajuda a superar todos os medos, traumas e possíveis dificuldades que possa me deparar, obrigada por torcer por mim, orar por mim, por me ouvir e por me aconselhar, você é muito especial em minha vida.

A minha profinha Andrea, obrigada por ter feito de todo esse ciclo um momento suave, por propiciar que eu me tornasse mais segura, pela confiança e amor que sempre mostrou por mim. Por me dizer um dia que "cada um dá o que tem" e a felicidade que tanto buscamos está dentro de nós.

Ao professor Júnior e ao Júnior Mario, agradeço por toda ajuda prestada na análise estatística e amizade.

A todos os professores que constituem a Universidade Federal Rural de Pernambuco, por seus ensinamentos ao longo de minha formação profissional.

Sou grata ao tempo que fez de mim Mestra!

“Por mais ingrato que sejamos, ainda assim nos perdoam e continuam a nos amar, deixando claro com seus exemplos, que, realmente, Somos Todos Irmãos”

Assim são os sábios animais

São Francisco

RESUMO

As hemoparasitoses são doenças de elevada prevalência e importância na clínica de pequenos animais, sendo responsáveis por várias alterações clínicas e laboratoriais. Desta forma, objetivou-se com este trabalho estudar os aspectos citomorfológicos de medula óssea (MO) e de sangue periférico de cães naturalmente infectados por *Anaplasma phagocytophilum*/*Anaplasma platys*, e *Erlichia canis*/*E. ewingii*, diagnosticados pela técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) através do Kit SNAP 4Dx Plus®, e caracterizar tais achados para ambas infecções. Foram estudados 44 cães com suspeita clínica de Erlichiose Monocítica Canina (EMC) e/ou Anaplasmosse Trombocítica Canina (ATC), de diferentes raças, idades e ambos os sexos. Os animais foram submetidos à análise hematológica e punção de MO para realização do Mielograma. Dos 44 cães avaliados 16 (36,4%) foram negativos ao kit 4DxPlus® e 28 (63,6%) foram reagentes, sendo 16 (57,14%) positivos apenas para erlichiose, 6 (21,43%) para anaplasmosse e 6 (21,43%) coinfectados, ou seja, positivos para ambos os agentes. A trombocitopenia foi a alteração hematológica mais evidenciada em cães com EMC (65,2%), enquanto que a anemia normocítica e hipocrômica foi a alteração hematológica mais frequentes (80%) em animais com ATC. Não foram evidenciadas alterações associadas à coinfeção. Na avaliação da MO observou-se aumento da série eritroide no grupo de animais positivos para *Anaplasma* spp (75%), enquanto os animais do grupo *E. canis* e os coinfectados mostraram aumento da série linfóide, 29,78% e 29,67% respectivamente, quando comparados aos demais grupos. Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que o somatório de métodos laboratoriais é essencial na caracterização das hemoparasitoses em cães, embora não exista teste-ouro, agregando valor e permitindo uma efetiva consolidação do diagnóstico relacionado a essas doenças.

Palavras Chaves: *Anaplasma platys*, *Erlichia canis*, Hemograma, Mielograma, Snapp 4Dx Plus.

ABSTRACT

Hemoparasitosis are highly prevalent and very important diseases in small animal practice, as they are responsible for many clinical and laboratorial alterations. The aim of this work was to study the cytomorphological aspects of bone marrow and haematological findings in dogs naturally infected by *Ehrlichia* spp. and / or *Anaplasma* spp. diagnosed by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) using the SNAP 4Dx Plus® kit. We evaluated 44 dogs of different breeds and ages that were suspected positive for canine monocytic ehrlichiosis (CME) and/or canine thrombocytic anaplasmosis (CTA). Out of the 44 dogs, 16 (36,4%) were negative for the SNAP 4Dx Plus® kit and 28 (63,6%) were reactive. Out of these 28, 16 (57,14%) were positive only for erlichiosis, 6 (21,43%) were positive for anaplasmosis and 6 (21,43%) were coinfecting (positive for both agents). Thrombocytopenia was the most frequent hematological alteration (80%) in animals with CTA. No alterations were associated with coinfection. An increase in the erythroid series in the group positive for *Anaplasma sp.* was noticed in the bone marrow evaluation, whereas animals positive for *E. canis* and coinfecting animals showed an increase in the lymphoid series when compared to the other groups. The results of this study allow us to infer that the sum of laboratory methods is essential in characterizing the hemoparasitoses in dogs , although there is no test gold , adding value and allowing an effective consolidation of the diagnosis related to these diseases

Key words: : *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, complete blood count, hemoparasitosis, myelogram, Snapp 4dx Plus.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Artigo	
Tabela 1. Caracterização de cães diagnosticados com erliquiose e seus achados obtidos no eritrograma, contagem plaquetária, mielograma e pesquisa de hemoparasitas.	53
Tabela 2. Caracterização dos achados obtidos no leucograma de cães diagnosticados com EMC.	55
Tabela 3. Caracterização de cães diagnosticados com ATC e seus achados obtidos no eritrograma, contagem plaquetária, mielograma e pesquisa de hemoparasitas.	56
Tabela 4. Caracterização dos achados obtidos no leucograma de cães diagnosticados com ATC.	58
Tabela 5. Caracterização de cães coinfectados e seus achados obtidos no eritrograma, plaquetograma, mielograma e pesquisa de hemoparasitas.	59
Tabela 6. Caracterização dos achados obtidos no leucograma de cães diagnosticados com coinfeção	61
Tabela 7. Comparação entre os resultados obtidos no eritrograma e contagem plaquetária por grupos	62
Tabela 8. Comparação entre os <i>ranks</i> médios dos resultados obtidos no leucograma por grupos.	62
Tabela 9. Comparação entre os <i>ranks</i> médios dos resultados obtidos no mielograma por grupos.	62

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Figura 1.	SANP 4Dx [®] Plus. Fonte: IDEXXLAB	21
Figura 2.	Esquema representativo para confecção de lâminas para mielograma. Técnica de “Squash”	24

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. platys</i>	Anaplasma platys
ATC	Aplasmose Trombocítica Canina
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuslar Média
CTL	Contagem total de leucócitos
DNNE	Desvio Nuclear Neutrófilico à Esquerda
<i>E. canis</i>	Erlichia canis
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMC	Erliquiose Monocítica Canina
HCT	Hematócrito
HEM	Hemácias
HGB	Hemoglobina
M:E	Relação Mieloide-Eritroide
MO	Medula Óssea
PLT	Plaquetas
®	Marca Registrada
RIFI	Imunofluorescência indireta
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Hemoparasitoses Canina	16
2.1.1. Erlichiose Monocítica Canina (EMC)	16
Sinais Clínicos	16
Achados Hematológicos	17
Diagnóstico Citológico	18
Diagnóstico Sorológico	18
2.1.2. Anaplasrose Trombocítica Canina (ATC)	19
Sinais Clínicos	19
Achados hematológicos	19
Diagnóstico Citológico	19
Diagnóstico Sorológico	20
2.1.3. Coinfecção entre <i>E. canis</i> e <i>Anaplasma spp.</i>	20
2.2. Diagnóstico das hemoparasitoses	21
2.2.1. Tecnologia SNAP para diagnóstico das hemoparasitoses	21
2.2.2. Mielograma	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
4. ARTIGO	38
Achados hematológicos de sangue e medula óssea em cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma spp.</i>	40
5. APÊNDICES	54
5. ANEXO	64

1. INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses constituem um crescente problema na rotina clínica de pequenos animais no Brasil, expressando sinais clínicos inespecíficos, que em muitos casos não permite a confirmação hábil para instituição do melhor protocolo terapêutico, minimizando assim as possibilidades de recuperação do paciente (MANOEL, 2010).

A erliquiose e a anaplasmose canina representam duas das mais frequentes hemoparasitoses em cães. Havendo uma maior ocorrência de *Anaplasma platys* em relação à *Ehrlichia canis* e cerca de 5,47% de coinfeção considerando esses agentes infecciosos (SILVA et al., 2010).

Os achados clínicos e hematológicos são inespecíficos em ambas infecções, e consistem em: depressão, inapetência, anemia normocítica normocrômica, leucopenia e trombocitopenia (MANOEL, 2010; NAKAGHI et al., 2008; SHIPOV et al., 2008), sendo essas últimas informações essenciais ao profissional para solicitação de exames mais específicos, como a avaliação de medula óssea.

A medula óssea (MO) é um tecido semissólido (FIGHERA, 2014), cuja principal função é a hematopoiese. Localizada em um espaço restrito nos ossos longos e chatos, ao longo do envelhecimento orgânico é substituída por tecido adiposo, permanecendo funcional apenas em áreas de tecido ósseo esponjoso (MÜLLER et al., 2009).

Por ser um tecido multifuncional, as amostras de medula óssea possibilitam a realização de exames diversos como mielograma, citometria de fluxo, a imunohistoquímica e, ainda, a citogenética convencional (FLEURY, 2007).

O mielograma consiste na avaliação citológica da medula óssea, e sua aplicabilidade é possível pela facilidade em se obter células por meio da punção aspirativa (FIGHERA, 2014).

Na Medicina Veterinária tem-se tornado um procedimento de alto valor investigativo, tendo em vista fomentar o diagnóstico da maioria das doenças hematológicas que comprometam a MO, desde desordens primárias a neoplásicas. Contribuindo para o estadiamento de neoplasias, síndromes paraneoplásicas, diagnóstico direto de agentes infecciosos como o *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, entre outros. Possibilitando ainda pontuar as alterações hematológicas decorrentes de infecções sistêmicas como nos casos das hemoparasitoses (FIGHERA, 2014 e GRINDEM, 2002).

A aquisição de conhecimentos sobre as alterações em MO nas infecções por hemoparasitas favorece a clínica médica e permite a condução de prognósticos e tratamentos mais adequados, contribuindo para melhor qualidade de vida, maior sobrevida e redução potencial de sofrimentos desnecessários dos animais acometidos.

Considerando a importante contribuição relacionada ao exame da MO no que se refere ao diagnóstico e prognóstico das hemoparasitoses, bem como a escassez de estudos realizados neste sentido, objetivou-se com esta pesquisa estudar os aspectos citomorfológicos de medula óssea e hematológicos de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp e/ou *Anaplasma* spp.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Estudar os aspectos citomorfológicos de medula óssea e hematológicos de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp e/ou *Anaplasma* spp.

Objetivos específicos:

- Caracterizar os achados hematológicos de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp diagnosticados ao exame sorológico;
- Caracterizar os achados obtidos no mielograma de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp;
- Avaliar às alterações de MO e de sangue periférico nos diferentes grupos, comparando-as de acordo com a resposta do teste serológico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. HEMOPARASITOSSES CANINA

As hemoparasitoses são doenças de elevada prevalência e importância na clínica de pequenos animais, com destaque para espécie canina, sendo responsáveis por várias alterações clínicas e laboratoriais. Dentre as diversas causas destacam-se a *Ehrlichia canis* (*E. canis*) e *Anaplasma spp.*, agentes etiológicos respectivamente da Erliquiose Monocítica Canina (EMC) e Anaplasmosse Trombocítica Canina (ATC), segundo Dumler et al. (2001).

3.1.1. Erliquiose Monocítica Canina (EMC)

A EMC é uma enfermidade riquetsial que, segundo Brito et al., (2001), tem por agente etiológico a *Erlichia canis* (*E. canis*), hospedeiro intracelular obrigatório das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (KELLY et al., 1994).

A *E. canis* trata-se da principal espécie de Ehrlichia descrita no Brasil, sendo a única espécie do gênero isolada em cães no país (AGUIAR et al., 2013). A doença é considerada endêmica principalmente nas áreas onde há superpopulação do *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato vetor, principal fator de risco para a infecção (MORAES-FILHO et al., 2011).

Por apresentar alta incidência na rotina clínica de cães e ainda por causar distúrbios hematológicos que podem evoluir ao óbito é considerada uma importante enfermidade na Medicina Veterinária. Com sinais clínicos inespecíficos, o diagnóstico presuntivo é frequentemente baseado no conjunto de alterações clínicas e hematológicas. A pesquisa de parasitos em esfregaço sanguíneos corados tem baixa sensibilidade, sendo negativa na maioria dos casos de EMC, uma vez que, apenas cerca de 1% das células apresentam-se infectadas (DAGNONE et al., 2003).

Os sinais clínicos da EMC incluem depressão: letargia, anorexia, perda de peso, febre, linfadenomegalia, esplenomegalia, e tendências ao aparecimento de hemorragias (HARRUS et al., 1997b, HARRUS et al., 1998a, HARRUS et al., 1999) são os mais comumente relatados. Tanto na fase aguda quanto na fase crônica os sinais de febre, diminuição do escore corporal, comprometimento neurológico, hemorragias espontâneas e edema podem ser observados (HARRUS et al., 1997b, HARRUS et al., 1999; MYLONAKIS et al., 2003).

Os achados hematológicos descritos em casos de infecção por *E. canis* consistem em: anemia normocítica normocrômica (NAKAGHI et al., 2008; SHIPOV et al., 2008;

MANOEL, 2010), leucopenia e trombocitopenia (SHIPOV et al., 2008; UENO et al., 2009; MANOEL, 2010), que quando surgem em conjunto caracterizam o quadro de pancitopenia, que consiste na diminuição de todas as linhagens de células sanguíneas, na fase crônica da infecção e esporadicamente ainda na fase aguda (COSTA, 2014).

A anemia ocorre pela redução da eritropoiese e ainda por reações imunomediadas que determinam lise e fagocitose dos eritrócitos. Enquanto que a leucopenia resulta tanto da lise leucocitária quanto por marginalização e migração dos leucócitos para sítios de inflamação vascular. A vasculite associada à infecção por *E. canis*, aumenta a liberação de interleucinas que induzem à marginalização e migração dos leucócitos para o local da inflamação (MOREIRA et al., 2003).

Na avaliação diferencial de leucócitos de cães infectados pela *E. canis* observa-se, linfopenia e eosinopenia em 50% dos animais (WADDLE e LITTMAN, 1988), monocitose em alguns casos de erliquiose monocítica canina (HARRUS et al., 1998a). Na fase aguda da infecção pode-se ainda observar leucocitose com desvio neutrofílico nuclear à esquerda (WADDLE e LITTMAN, 1988; MOREIRA et al., 2003).

A trombocitopenia originada pela *E. canis* é perceptível em cerca de 75% dos casos, e decorre principalmente pelo aumento do consumo, destruição imunomediada, sequestro esplênico e diminuição da meia vida. Na MO há uma diminuição na série megacariocítica em quadros crônicos, ao passo que nas infecções agudas é possível ocorrer uma hiperplasia da série megacariocítica, avigorando a destruição plaquetária e diminuição da meia vida (BOUDREAUX, 2000). Os casos de animais não trombocitopênicos decorre da cepa bacteriana, do estágio da doença e de características intrínsecas do hospedeiro (KUEHN E GAUNT, 1985).

Em estudo retrospectivo realizado por Castro et al. (2004) foram avaliados cães experimentalmente infectados por *E. canis*, e evidenciou-se como principais alterações hematológicas a diminuição eritrocitária bem como valores abaixo da normalidade para o teor de hemoglobina, hematócrito e leucócitos.

Ao avaliar cães naturalmente infectados Moreira et al. (2003) apontaram que as alterações hematológicas mais frequentes observadas na EMC foram anemia (70,3%), trombocitopenia (50%) e leucopenia (30%).

No Brasil tem se observado cepas de *E. canis* que nem sempre são capazes de determinar trombocitopenia, embora causem anemia (CASTRO et al., 2004). Essa informação embasa-se em estudos conduzidos por Bulla et al. (2004) e Dagnone et al. (2003) que

encontraram trombocitopenia em 30,9% e 19,7% dos casos positivos para *E. canis*, respectivamente.

Dentre as técnicas de diagnóstico descritas para o diagnóstico desta infecção a identificação de mórulas e inclusões de *Ehrlichia* spp. em leucócitos de esfregaços sanguíneos, aspirados de baço, medula óssea e linfonodos (MYLONAKIS et al., 2004; NEER e HARRUS, 2006; HARRUS e WANER, 1999) consiste em uma técnica de baixo custo, porém é altamente limitada devido à baixa parasitemia, o que a torna um teste de baixa sensibilidade. A presença de mórulas pode ser identificada cerca de 12 e 15 dias após a infecção no sangue periférico e na medula óssea, respectivamente (CASTRO et al., 2004; MOREIRA et al., 2005);

Quando possível, a visualização da mórula de *Ehrlichia* spp. confere diagnóstico preciso entretanto, faz-se importante ressaltar que na ausência de parasitismo o esfregaço sanguíneo não exclui a possibilidade de infecção (WOODY e HOSKINS, 1991).

Segundo Mylonakis et al. (2003) a técnica citológica mais eficaz para diagnosticar a erliquiose a partir da observação de mórulas intracelulares é a executada em órgãos linfoproliferativos, sendo os linfonodos os mais recomendados entre esses, permitindo o diagnóstico ainda na fase aguda da doença. Os autores ainda esclarecem que as mórulas do *E. canis* são mais numerosas em linfócitos que em monócitos, provavelmente pela diferença quantitativa entre essas duas células no organismo. Em geral, a citologia é mais eficaz na fase aguda do que na subclínica ou fase crônica da erliquiose (HARRUS et al., 1997b, HARRUS et al., 1998).

Vários métodos de detecção do agente estão disponíveis para obtenção do diagnóstico definitivo. Um dos métodos amplamente utilizado nos laboratórios veterinários consiste na detecção de anticorpos específicos contra *E. canis* (DAGNONE et al., 2003). O teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é capaz de detectar anticorpos anti-*E. canis* no sétimo dia pós-infecção, podendo ocorrer reação cruzada com outras espécies de *Ehrlichia* (DAGNONE et al., 2003).

Na erliquiose canina o diagnóstico é rotineiramente embasado na sorologia (imunofluorescência indireta anticorpo-IFA, ELISA, imunotransferência), conforme Waner et al. (2001), uma vez que suas características clínicas e clínico-patológicas são inespecíficas (COUTO, 1998). No entanto, a sorologia pode resultar em falsos diagnósticos, especialmente nas áreas endêmicas da doença (WANER et al., 2001; NEER et al., 2002).

3.1.2. Anaplasmosse Trombocítica Canina (ATC)

Hemoparasitose de etiologia atribuída ao *Anaplasma platys* (*A. platys*), bactéria gram negativa, capaz de infectar e se multiplicar nas plaquetas, que se apresenta na forma de mórula nestas células do hospedeiro (WOODY e HOSKINS, 1991) e pode ser confundida com inclusões plaquetárias não parasitárias (FERREIRA, 2006). Harrus et al., (1997c) observaram que de 11 animais que possuíam inclusões plaquetárias, apenas cinco apresentavam sorologia positiva para *A. platys*. Há ainda um outro agente pertencente a esta família denominado *Anaplasma phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001; FERREIRA et al., 2008) que pode parasitar os leucócitos polimorfonucleares dos cães, ainda não descrito em cães no Brasil (MACHADO et al., 2010).

A transmissão da *A. platys* ocorre pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (INOKUMA et al., 2000), bem como por meio de transfusões sanguíneas, assim como para *E. canis* (SOUZA et al., 2004).

A fase aguda da doença caracteriza-se pela presença de sinais clínicos inespecíficos, que inclui linfadenomegalia, depressão, perda de peso, vômito, diarreia (DAGNONE, 2003).

Na análise hematológica os animais podem apresentar: trombocitopenia, anemia normocítica normocrômica, sendo essa descrita como semelhante à anemia que ocorre em processos inflamatórios no geral, leucopenia, hiperplasia da linhagem megacariocítica na medula óssea e distúrbios hemostáticos. A trombocitopenia causada pelo *Anaplasma* spp. é cíclica e intermitente na fase aguda da infecção, podendo tornar-se persistente, na fase crônica (HARRUS et al., 1997; INOKUMA et al., 2000). Com a evolução do quadro para a fase crônica, a trombocitopenia tenderá ao agravamento e a tendência cíclica diminuirá, o número de eritrócitos e leucócitos sofrerá redução ligeira, não caracterizando anemia e/ou leucopenia (DAGNONE, 2003; GASPARNI et al., 2008; HARVEY, 2001).

Parasitemias e trombocitopenias aparecem ciclicamente com um período médio de dez dias. Nos dias em que ocorre trombocitopenia, as inclusões não são observadas. O número de plaquetas parasitadas decresce durante o ciclo, porém a trombocitopenia permanece acentuada para tornar-se branda posteriormente (DAGNONE, 2003; DUMLER et al., 2001; GASPARNI et al., 2008; HARVEY, 2001). A medula óssea de cães infectados pode estar normal ou hiperproliferativa, com hiperplasia megacariocítica na fase aguda da doença, a diminuição da relação mielóide-eritróide também foi descrita (BAKER et al., 1987; GAUNT et al., 1990).

Assim como na EMC, o diagnóstico da ATC é possível ser obtido através da técnica de pesquisa de mórulas que permite diagnosticar o *A. platys* a partir em esfregaço sanguíneo

corado pelo método de Diff-Quik. Consiste em um diagnóstico direto, porém difícil, devido à natureza cíclica da infecção (MARTIN et al., 2005), além de requerer experiência do profissional para diferenciar as mórulas de anaplasma das granulações plaquetárias inespecíficas (FERREIRA et al., 2007). Tendo em vista que as inclusões intracelulares do parasita no esfregaço sanguíneo corado apresentam semelhanças com granulações intracitoplasmáticas de plaquetas normais, podendo levar a erros no diagnóstico clínico-laboratorial (MACHADO, 2010).

Muitos testes sorológicos estão disponíveis para a detecção de agentes da família *Anaplasmataceae*, tais como fixação do complemento, hemaglutinação indireta, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunenzimático (ELISA), Dot-blot ELISA e Western blot. A RIFI foi desenvolvida para a detecção de anticorpos séricos, porém a maior desvantagem deste teste é o grande número de reações inespecíficas originadas por antígenos comuns a outros agentes do mesmo grupo. A detecção de anticorpo para agentes desta Família, também pode ser feita através do teste de Dot-blot ELISA. Este método não requer equipamento sofisticado, mostrando-se tão sensível e específico como a RIFI, sendo realizado de uma maneira mais rápida (INOKUMA et al., 2000). No entanto já foi descrita a ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum* (FERREIRA et al., 2008).

3.1.3. Coinfecção entre *E. canis* e *Anaplasma* spp.

Casos de infecção simultânea entre *E. canis* e *Anaplasma* spp. são frequentemente relatados (COSTA, 2014; SUKSAWAT et al., 2001). Estudos epidemiológicos sobre EMC e ATC no Brasil vêm evidenciando que ambos os agentes apresentam alta prevalência variando de acordo com a região e população canina estudada. Com relatos de coinfecção entre 4,8%, no extremo sul do Brasil, e 70,9%, na região Centro-Oeste (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; MELO et al., 2011, SAITO et al., 2008; SANTOS et al., 2009; SILVA et al., 2012; RAMOS et al., 2009; UENO et al., 2009). Em estudo realizado no Mato Grosso em 2009, Witter et al. (2013) relataram alta prevalência de EMC ao passo de uma baixa ocorrência de ATC.

Em animais coinfectados com *E. canis* e *Anaplasma* spp. tanto hiperplasia quanto hipoplasia da celularidade medular podem ser evidenciadas em diferentes fases de infecção (COSTA, 2014; WOODY e HOSKINS, 1991). Sendo comumente descrito aumento na

concentração de linfócitos na medula óssea em infecções isoladas por esses agentes (COSTA, 2014; MENDONÇA et al., 2005) bem como em processos inflamatórios inespecíficos (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

3.2. DIAGNÓSTICO DAS HEMOPARASITOSE

De modo geral, o diagnóstico das hemoparasitoses deve ser embasado na combinação dos achados clínicos, hematológicos e citológicos e ainda sorológicos (WANER et al., 2001; NEER e HARRUS, 2006; HARRUS e WANER, 2011).

3.2.1. Tecnologia SNAP para diagnóstico das hemoparasitoses

A tecnologia SNAP[®] da IDEXX foi desenvolvida para uso em clínicas veterinárias, com base no teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detecção de antígenos/anticorpos em sangue ou fezes de animais (IDEXLAB, 2015).

O Canine Snap 4Dx[®] Plus (Figura 1) é um kit de diagnóstico rápido baseado na metodologia ELISA que detecta anticorpos contra *E. canis*, *Anaplasma* spp., *Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi* e que para Bowman et al. (2009) e Diniz et al., (2009) apresenta bons resultados quando comparado à Reação em cadeia polimerase (PCR) e a RIFI. Estudo realizado por Diniz et al. (2009) que utilizaram o 4Dx[®] Plus e a PCR como técnicas de diagnóstico para *E. canis* obteve acurácia de 81,5% para o 4Dx[®] Plus.



Figura 1. Tecnologia SNAP 4Dx[®] Plus.

Fonte: IDEXXLAB

Harrus et al. (2002) ao compararem três kits de ELISA com a técnica de RIFI, não encontraram diferenças significativas entre os testes, o que possibilitou a conclusão que os primeiros são específicos e sensíveis, principalmente para títulos maiores que 1:320. O SNAP Test apresentou sensibilidade e especificidade de 71% e 100%, respectivamente, quando comparado à RIFI.

Os resultados obtidos pelo 4Dx[®] Plus devem ser interpretados considerando-se os achados clínicos e laboratoriais, tendo em vista que resultados falso negativos podem ser relatados em infecções agudas, o que avigora a necessidade de testes pareados com intervalo de 21 dias entre eles (IDEXLAB, 2015).

Também se deve considerar que a sorologia não diferencia exposição prévia de infecção ativa (PANTCHEV et al., 2009), títulos aumentados podem ser observados por até 11 meses após tratamento (HARRUS et al., 1998a) e existe a ocorrência de reação cruzada entre as diferentes espécies de erliquias (NAKAGUI et al., 2008; HARRUS e WANER, 2001).

3.2.2. Mielograma

A medula óssea é um tecido semissólido (FIGHERA, 2014), cuja principal função é a hematopoiese de células eritroides, granulocíticas, megacariocíticas e linfocitárias. Localizada em um espaço restrito intraósseo, ao longo do envelhecimento orgânico, nos ossos longos e chatos, é substituída por tecido adiposo, permanecendo-se funcional apenas em áreas de tecido ósseo esponjoso, ou seja, metáfises e epífises ósseas (SCHALM, 2002, MÜLLER et al., 2009). A medula ativa, também designada de medula vermelha, tem ainda como função a fagocitose de debris celulares, o armazenamento e a reciclagem do ferro (SCHALM, 2002).

O mielograma consiste na avaliação citológica da medula óssea (MO), e sua aplicação é possível pela obtenção de células por meio da punção aspirativa por agulha. O método é considerado a avaliação mais fidedigna para o diagnóstico das afecções de MO (FIGHERA, 2014) por possibilitar e identificar anormalidades na síntese das células sanguíneas, a presença de células neoplásicas e ainda agentes infecciosos (MÜLLER et al., 2009).

A avaliação do tecido medular ósseo é indicada quando a análise do sangue periférico não permite identificar a causa de uma alteração hematológica (RASKIN e MESSICK, 2002). Ou seja, é útil avaliar citologicamente a MO em animais com anormalidades hematológicas inexplicáveis, objetivando identificar irregularidades não passíveis de serem esclarecidas por análises sanguíneas (TRAVLOS, 2006; ALENCAR et al., 2002).

As principais alterações de hemograma que justificam a avaliação da MO consistem em suma em alterações de hipo ou hiper celularidade sem justificativa clínica para tais, e ainda alterações qualitativas, tais como anemia arregenerativa, neutropenias persistentes sem presença de desvio a esquerda, trombocitopenia, plaquetas ativadas, leucocitoses sem suspeitas de inflamação e/ou infecção, eritrocitose, morfologia anormal de células sanguíneas como neutrófilos hipersegmentados, presença inexplicável de células imaturas no sangue, ou ainda uma combinação dessas alterações (GALE, 1981; RASKIN e MESSICK, 2002).

Segundo Raskin & Messick (2002) outras situações que fazem jus à solicitação dessa técnica diagnóstica ocorrem ao se verificar aumento na concentração séricas de proteína total. A hiperproteinemia pode ocorrer pelo aumento na produção de anticorpos em nível medular frente à infiltração de agentes infecciosos como, os do gênero *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.

Segundo Alencar et al. (2002), na maioria dos casos a tomada de material medular requer apenas uma boa contenção do animal, considerando o fato do bloqueio anestésico local incomodar mais que a introdução da agulha para punção. Animais agressivos ou de difícil contenção podem ser tranquilizados previamente, sendo a anestesia geral raramente necessária. Entretanto Müller et al. (2009) recomendam que tal procedimento deva ser realizado em plano anestésico geral. Enquanto, Grindem (2002) considera indispensável apenas à anestesia local infiltrativa, analgésico e sedação e, caso persista a sensibilidade do paciente para realização do exame, utiliza-se procedimento anestésico geral.

A escolha do local para punção medular óssea, em animais *in vivo*, deve ser tomada considerando aspectos como a idade do animal, escore corporal e ainda a preferência do Médico Veterinário, tendo como opções em cães a crista dorsal ilíaca, a região crânio-lateral do tubérculo maior do úmero, a área medial ao trocanter maior e paralelo ao eixo do fêmur e no esterno (RASKIN e MESSICK, 2002). Neste caso, agulhas curtas devem ser utilizadas e cuidados devem ser tomados para mantê-las na região central do esterno, minimizando o risco de pneumotórax, hemorragias e laceração cardíaca (HARVEY, 2001).

O material necessário para obtenção do conteúdo medular consiste basicamente de agulhas específicas para tal manobra (ALENCAR et al., 2002; RASKIN e MESSICK, 2002), ou ainda agulhas descartáveis medindo 40 x 16 mm que segundo Cirio et al. (2007) mostraram-se eficientes para tal finalidade.

Outros materiais incluem: EDTA 2 - 3% (ácido etilenodiamino tetra-acético), seringa plástica (10 a 20 mL), lâminas de vidro com superfície fosca, corante (método de Romanowsky), placa de petri, tubos de microhematócrito, lidocaína 2%, tricótomo e lâmina de bisturi (ALENCAR et al., 2002).

A punção aspirativa por agulha pode ser iniciada com uma incisão na pele que recobre o local escolhido para coleta, em seguida a agulha é inserida no osso. A agulha é depois rotacionada para penetrar o córtex por vários milímetros de modo que fique firmemente inserida e uma vez incorporada, acopla-se à agulha uma seringa plástica contendo EDTA. Sucessivas aplicações de pressão negativa sobre o êmbolo da seringa devem ser realizadas até que se obtenha cerca de 0,5 mL de MO, e assim que o material for obtido, a pressão negativa deve ser desfeita e a seringa removida junto com a agulha (RASKIN e MESSICK, 2002).

Após a tomada de MO por punção aspirativa a agulha deve ser desacoplada da seringa e o material obtido depositado sobre a superfície de uma placa de petri, objetivando a observação e separação das espículas medulares, que é de fato o material de interesse que vem geralmente em meio ao sangue contaminante (ALENCAR, 2002), ou pode-se depositar o material diretamente sobre a placa de vidro para a realização do “squash” (COWELL et al., 2009).

De acordo com Raskin & Messick (2002) a contaminação por sangue periférico deve ser evitada, porém Figuera (2014) considera a presença de sangue como ponto positivo para a citologia de MO, pois essa “contaminação” facilita a preparação da lâmina, por promover a diluição do tecido medular, sendo esse aspecto um dos que a difere das avaliações citopatológicas de outros tecidos.

As lâminas devem ser preparadas no máximo uma hora após a coleta, considerando o uso de anticoagulante. Para confecção das mesmas, as espículas medulares são coletadas por capilaridade com o auxílio de um tubo capilar de microhematócrito. Em seguida transfere-se o conteúdo do tubo capilar para uma lâmina de vidro e coloca-se sobre ela outra lâmina no mesmo sentido da primeira, de modo a promover a distribuição do material pela técnica de “Squash” (Figura 2). Posteriormente o material disposto na lâmina deve ser imediatamente secado ao ar para logo após ser fixado durante cinco minutos em álcool metanol (ALENCAR et al., 2002).

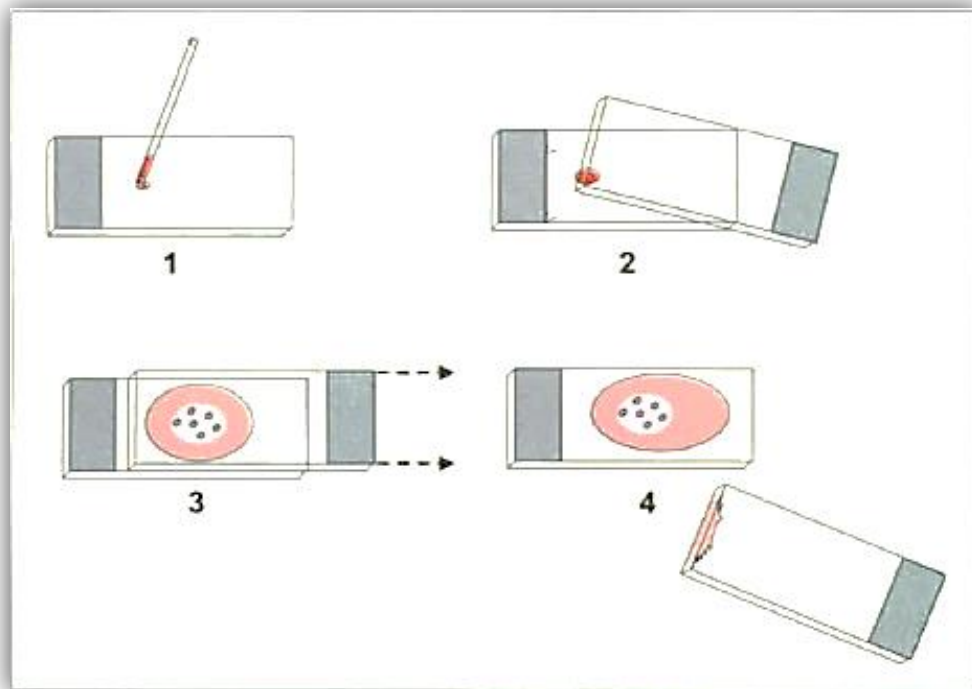


Figura 2: Esquema representativo para confecção de lâminas para mielograma. Técnica de “Squash”.

Fonte: Alencar et al. (2002).

As colorações empregadas para avaliação de tecido medular são as do tipo Romanowsky (Giemsa, *May-Grünwald* Giemsa, Leishman, Panótico rápido) devido às suas características tintoriais e pela rapidez na coloração das lâminas, considerando que o material obtido apresenta alta densidade no esfregaço o tempo de coloração é, geralmente, aumentado em duas ou mais vezes para se obter uma boa identificação das estruturas celulares (COWELL et al., 2009).

Para uma interpretação acurada dos resultados obtidos a partir da citologia de MO é indispensável que as informações do histórico do paciente, bem como os sinais clínicos e achados hematológicos de sangue periférico sejam correlacionadas (COWELL et al., 2009).

O exame da medula se inicia desde a tomada de material por aspiração, tendo em vista que o grau de dificuldade da coleta sugere uma medula com produção celular normal ou alterada. Medula normal ou com hiper celularidade são obtidas facilmente ao passo que medulas hipocelular ou fibrótica resultam em aspirados com poucas ou nenhuma espícula ósseas (COWELL et al., 2009).

As células encontradas na MO são divididas em grandes grupos, que incluem: compartimento mieloide ou granulocítico, compartimento ou série eritroide, série

megacariocítica, série monocítica, série linfoide e “outras células” da medula óssea (JAIN, 1993; GRINDEM et al., 2002; GRANDI et al., 2014).

O compartimento mieloide é formado por neutrófilos, eosinófilos e basófilos e seus precursores: mieloblasto, pró-mielócito, mielócito, metamielócito e bastonetes, essa linhagem celular predomina a MO normal em indivíduos de todas as idades, constituindo 50 a 70% das células nucleadas. O compartimento eritroide é constituído por eritrócitos e seus precursores: rubroblasto, pró-rubricito, rubricito basofílico, rubricito policromático, metarrubricito e reticulócito, essa linhagem representa em torno de 25 a 30% do total celular (AZEVEDO, 2008). A série megacariocítica é constituída por plaquetas e seus precursores. A série monocítica representa uma pequena porcentagem do total de células medulares e é representada pelos monócitos e seus precursores. A série linfoide corresponde ao tecido linfoide da MO e é composta basicamente por linfócitos tipo B, que variam de tamanho de acordo com a espécie, e seus precursores prolinfocitos e linfoblastos e uma população ainda menor de plasmócitos (COWELL et al., 2009; GRANDI et al., 2014; HONSE, 2014). As demais células medulares, chamadas de “outras células” da MO constituem vários tipos celulares que podem ser ocasionalmente visualizados no esfregaço feito a partir da coleta de MO, como: macrófagos, mastócitos, lipócitos, osteoclastos, osteoblastos e células fusiforme (GRANDI et al., 2014).

Microscopicamente, o mielograma é realizado a partir da avaliação das espículas medulares coradas e observadas em microscopia óptica. Inicialmente o esfregaço é observado em menor aumento (Figura 3) a fim de certificar a qualidade da amostra e da coloração, em seguida o processo inclui: avaliação da celularidade medular, análise qualitativa e quantitativa dos compartimentos celulares e a avaliação da relação mieloide-eritroide (M:E), que exprime a proporção entre as células mieloides com as células eritroides nucleadas (COWELL et al., 2009; HONSE, 2014). A relação M:E diminuída pode ser causada por hipoplasia mieloide ou hiperplasia eritroide. Se a celularidade hematopoiética estiver aumentada, a hiperplasia eritroide está contribuindo para a diminuição; e se a celularidade medular estiver diminuída, a hipoplasia granulocítica é responsável pela baixa relação M:E (COWELL et al., 2009).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. M.; ZHANG, X.; MELO, A. L. T.; PACHECO, T. A.; MENESES, A. M. C.; ZANUTTO, M. S.; HORTA, M. C.; SANTARÉM, V. A.; CAMARGO, L. M. A.; MCBRIDE, J. W.; LABRUNA, M. B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 315-321, 2013

ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K. C. H.; TAKAHIRA, R. K. Mielograma: Indicações e colheita do material. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, V. 5, n. 2, p. 157 - 16J, 2002.

APPEL J.G. Lyme disease in dogs and cats. **Compendium**, n.12, v.5, p.617. 1990.

AZUMA Y., ISOGAI E., ISOGAI H. & KAWAMURA K. Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. **Veterinary Record**. n.134, p.369-372, 1994.

BAKER, D.C.; SIMPSON, H.; GAUNT, S.D.; CORSTVET, R. E. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. **Veterinary Pathology** v.24 p.449-453. 1987.

BÉLANGER, M.; SORENSON, H.L.; FRANCE, M.K.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R. Comparison of Serological Detection Methods for Diagnosis of *Ehrlichia canis* Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3506–3508, 2002.

BENNETT C.E. Ticks and Lyme disease. **Advances in Parasitology**. n.36, p.343-405, 1995.

BOUDREAUX, M. K. Acquired platelet dysfunction. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G. E JAIN, N. C. **Scham's Veterinary Hematology**. 5 ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, p.496-500, 2000.

BOWMAN, D.; LITTLE, S.E.; LORENTZEN, L.; SHIELDS, J. SULLIVAN, M.P.; CARLIN, E.P. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States:

Results of a national clinic-based serologic survey. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.138–148, 2009.

BREITSCHWERDT, E.B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (Ed.): **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 5^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2v., v.1, cap. 86, p.400-407. 2000.

BRITO, F.L.C. DAGNONE, A. S. Principais hematozários de importância em pequenos animais – Resenha Científica. **Veterinária & Zootecnia**, n. 5, p.11, 2001.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO Jr., J.P.; TRINCA, LA; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**. v.35, p.141–146, 2004.

BUTLER J.F. e DENMARK H.A. Tick (Acari: Ixodidae) vectors of Lyme disease organisms (*Borrelia burgdorferi*) in Florida. **Florida Department of Agriculture & Consumer Services. Entomology**, n.326. 1990.

CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.C.T.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v.119, p.73-86, 2004.

CIRIO, S.M.; ROCHA, M. G.; LEITE, L.C.; CARVALHO, M.; LEITE, S. C.; LUNELLI, D.; KISPERGUE, L. B. Avaliação Citológica De Medula Óssea De Cadelas Da Região Metropolitana De Curitiba, PR. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v.5, n.3, p. 249-253, 2007.

COSTA, M. P. **Avaliação Hematológica De Sangue E Medula Óssea E Bioquímica Sérica De Cães Infectados Naturalmente Por Hemoparasitas**. 2014. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte – MG. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SMOC-9MVGFN>. Acesso em 23 de dezembro de 2015.

COUTO, C.G. It's a coagulopathy. But couldn't it be ehrlichiosis? In: **Proceedings of the Fourth European FECAVA-SCIVAC Congress**, p. 135–136. 1998.

COWELL, R. L., TYLER, R. D., MEINKOTH, J. H., DENICOLA, D. B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e gatos**. Editora MedVet, 3ª edição, p. 423-450. 2009.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTO, M.C. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DAWSON, J. E.; ANDERSON, B. E.; FISBEIN, D. B. Isolation and Characterization of an Ehrlichia sp. from a patient diagnosed with human Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29, n. 12, p.2741-2745, 1991

DINIZ, P.P.V.P.; BEALL, M.J.; KOMARK, K.; CHANDRASHEKAR, R.; DANILUK, D.A.; CYR, K.E.; KOTERSKI, J.F.; ROBBINS, R.J.; LALO, P.G.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. High Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Dogs from an Indian Reservation in Northeastern Arizona. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. 2009.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and HGE agent as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 51, n. 6, p. 2145-2165. 2001.

FERREIRA, F. R. **Validação do diagnóstico morfológico de Anaplasma platys em cães (Canis familiaris) por meio da reação da polimerase em cadeia**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração: Clínica médica). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2006.

FERREIRA, R.F., CERQUEIRA, A.M.F., PEREIRA, A.M., GUIMARÃES, C.M., SÁ, A.G., ABREU, F.S., MASSARD, C.L., ALMOSNY, N.R.P. Anaplasma platys Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**. n. 5, p.113-119. 2007.

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; PEREIRA, A. M. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 17, supl. 1, 2008

FIGHERA, R. A. **Mielograma. Citologia Veterinária Diagnóstica**. Editora MedVet, 1ª edição, p. 120-145. 2014.

FLEURY, S.A. **Biópsia de medula óssea (BMO) e sua relação com o aspirado de medula óssea (AMO)**. 2007. Acesso em 29 jul. 2014. Online. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/Publico/LaboratorioReferencia/ManualHematologia/pages/Bi%C3%B3psia%20de%20medula%20%C3%B3ssea%20e%20sua%20rela%C3%A7%C3%A3o.aspx>.FUJJI, 2009.

GALE, R.P. Aplastic anemia: biology and treatment. **Annals of Internal Medicine, Philadelphia**, n.95, v.4, p.477-94, 1981.

GASPARNI, M.R. ; COELHO, A. L. M. ; JOJIMA, F. S. ; VIDOTTO, M. C. ; VIDOTTO, O. Ocorrência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de uma população hospitalar em Londrina, Paraná. In: **Program & Resumos do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul, Curitiba. XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Curitiba, 2008. v. 15. 2008

GAUNT, S.D.; BAKER, D.C.; BABIN, S.S. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* Infection. **American Journal Veterinary Research**. v.51, p.290-293, 1990.

GRANDI, F.; BESERRA, H. E. O.; COSTA, L. D. **Citopatologia Veterinária Diagnóstica**. Editora MedVet, 1ª edição. 2014.

GREENE R.T. An update on the serodiagnosis of canine Lyme borreliosis. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**. n.4, p.167-171, 1990.

GRINDEM, C.B. Cytology of Bone Marrow. **The Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v.32, n.6, p.1313-1374, 2002.

HARVEY, J.W. **Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals. Philadelphia: Saunders**, 228 p., 2001.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. **Canine monocytic ehrlichiosis update. Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 19, p.431-444, 1997b.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v.14, p.247-250, 1997c

HARRUS, S., WANER, T., AIZENBERG, I., FOLEY, J.E., POLAND, A.M., BARK, H. Amplification Of Ehrlichial DNA From Dogs 34 Months After Infection With Ehrlichia Canis. **Journal of Clinical Microbiology**. n.36, p.73–76, 1998.

HARRUS S.; WANER T.; KEYSARY A. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 62, p. 15-27, 1998a.

HARRUS, S., WANER, T., BARK. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.9, p.2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H.; MAHAN, S.M.; WANER T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.361-368, 2002.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): an overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 187, n. 3, p. 292-296, 2011.

HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**. n.16, v.3, p.13-21, 1991.

HONSE, C. O. Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil hematológico de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi. 81f. Tese [Doutorado em

Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Rio de Janeiro; 2014.

IDEXX LABORATORIES. Licenciado no Ministério da Agricultura sob o nº9.981/2014. REPRESENTANTE EXCLUSIVO NO BRASIL IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA. São Paulo-SP. 2015.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island. **Japan. Journal of Clinical Microbiology**. n. 38, v. 11, p. 4219-4221, 2000.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia. Lea & Febiger, 417p. 1993.

KELLY, P.I. Serological evidence for antigenic relationship between Ehrlichia canis and Cowdria rumminantium. **Research of Veterinary Science**. v.56, p.170–174, 1994.

KUEHN, N.F.; GAUNT, S.D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, n. 4, p.355-358, 1985.

LEWIS, H. B.; REBAR, A. H. **Bone marrow evaluation in veterinary practice**. Estados Unidos da América: Ralston Purina, 71p. 1979.

MACHADO, G. P.; DAGNONE, A. S.; SILVA, B. F. Anaplasmosse Trombocítica Canina - Uma Breve Revisão. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária** – ISSN: 1679-7353. Ano VIII – Número 15, 2010.

MANOEL, C.S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por Ehrlichia canis**. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

MARTIN A.R., BROWN, G.K., DUNSTAN, R.H., ROBERTS, T.K., 2005. Anaplasma platys: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**. 109, 176-180.

MELO, A. T. L.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and Rickettsia spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick borne Disease**, Berlin, v. 2, n. 4, p. 213-218, 2011.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & Diagnosis**. Philadelphia, W.D. Saunders, 349p, 2004.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F.A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the Rhipicephalus sanguineus group in Latin America. **Acta Tropica**, Canada, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011

MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAUJO, R.B. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, p. 141-147, 2003.

MOREIRA, S.M.; MACHADO, R.; PASSOS, L.F. Detecção de Ehrlichia canis em aspirados de medula óssea de cães experimentalmente infectados. **Ciência Rural**. v. 35, n. 4, p.958-960, 2005.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; L.S. LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation Of Cytology In The Diagnosis Of Acute Canine Monocytic Ehrlichiosis (Ehrlichia Canis): A Comparison Between Five Methods. **Veterinary Microbiology**. n.91, p.197–204, 2003.

MÜLLER, D. C.M.; PIPPI, N. L.; BASSO, P. C.; OLSSON, D. C.; EDUARDO DE BASTOS SANTOS JUNIOR, E. B. S.; GUERRA, A. C. O. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural, Santa Maria**. n.39, v.7, p.2243-2251, 2009.

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

NEER, T.M., BREITSCHWERDT, E.B., GREENE, R.T., LAPPIN, M.R. Consensus Statement On Ehrlichial Diseases Of Small Animals From The Infectious Disease Study Group Of The ACVIM, **Journal of Veterinary Internal Medicine**. n. 16, p.309–315, 2002.

NEER, T.M.; HARRUS, S. **Canine monocytotropic ehrlichiosis and Neorickettsiosis (E. canis, E. chaffeensis, E. ruminatum, N. sennetsu and N. risticii infections)**. In: GREENE, C.E. 3 ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier. P.203-216, 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Editora Guanabara Koogan, 2ª edição. Rio de Janeiro, 2001.

PANTCHEV, N.; SCHAPER, R.; LIMOUSIN, S.; NORDEN, N.; WEISE, M.; LORENTZEN, L. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections Caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in Domestic Dogs in France: Results of a Countrywide Serologic Survey. **Parasitology Research**, Aug;105 Suppl 1:S101-14. 2009.

RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; GUEDES, D. S.; SOUZA JUNIOR, I. I.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, p. 58-62, 2009. Suplemento 1

RASKIN, R. E.; MESSICK, J. B. Bone Marrow Cytologic and Histologic Biopsies: Indications, Technique, and Evaluation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. n.42, p.23–42, 2002.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. Obtenção e Manuseio das Amostras para Exame Citológico. **Atlas de Citologia de Cães e Gatos**. p. 1-14, Editora ROCA, São Paulo, 2003.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine Infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in Southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys and Babesia spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SCHALM O.W. **Bone Marrow Cytology as an Aid to Diagnosis**. Symposium on Clinical Hematology, p.383-404. 2002.

SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER, L.; WANER, T.; HARRUS, S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 1-2, p. 131-138, 2008.

SILVA, G. C.; BENITEZ ADO, N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C.; ARLINGTON, S. H.; VIDOTTO, O. Occurrence of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in household dogs from northern Parana. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SOUZA, A. I.; DAGNONE, A. S.; MACHADO, R. Z. Infecção por Anaplasma platys em cães de Campo Grande-MS, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. n. 13, p. 352, 2004.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 729p. 2008.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S. I.; BREITSCHWERDT, E. B. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **The Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 39, n. 1, p. 90-93, 2001.

TRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed., Ed Roca, p.141-169. 2007.

TRAVLOS, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. **Toxicological Pathology**, n. 34, v. 5, p. 548- 565, 2006.

UENO, T.E.H.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; MEGID, J.; LABRUNA, M.B. Ehrlichia canis em cães atendidos no hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal. n. 18, v. 3, p. 57-61, 2009.

WADDLE, J.R.; LITTMAN, M.P.; A Retrospective Study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. **Journal of American Animal Hospital Association**. n. 24, p. 615–620, 1988.

WANER, T., JONGEJAN, F., BARK, H., KEYSARY, A., CORNELLISSEN, A.W.C.A. Significance Of Serological Testing For Ehrlichial Diseases With Special Emphasis On The Diagnosis Of Canine Monocytic Ehrlichiosis Caused By Ehrlichia Canis. **Veterinary Parasitology**. n.95, p.1–15. 2001.

WITTER, R.; VECCHI, S.N.; PACHECO, T.A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A.; SINKOC, A. L.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasnose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. n.34, v. 6, supl. 2, p. 3811-3822, 2013.

WOODY, B. J.; HOSKINS, D. J. Ehrlichia diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. n.21, v. 1, p. 75-98, 1991.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Achados hematológicos em sangue e medula óssea de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma spp.*

Achados hematológicos em sangue e medula óssea de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma spp.*

Lidiana Carvalho de Holanda

RESUMO

As hemoparasitoses são doenças de elevada prevalência e importância na clínica de pequenos animais, sendo responsáveis por várias alterações clínicas e laboratoriais. Desta forma, objetivou-se com este trabalho estudar os aspectos citomorfológicos de medula óssea (MO) e de sangue periférico de cães naturalmente infectados por *Anaplasma phagocytophilum*/*Anaplasma platys*, e *Erlichia canis*/*E. ewingii*, diagnosticados pela técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) através do Kit SNAP 4Dx Plus®, e caracterizar tais achados para ambas infecções. Foram estudados 44 cães com suspeita clínica de Erlichiose Monocítica Canina (EMC) e/ou Anaplasmosse Trombocítica Canina (ATC), de diferentes raças, idades e ambos os sexos. Os animais foram submetidos à análise hematológica e punção de MO para realização do Mielograma. Dos 44 cães avaliados 16 (36,4%) foram negativos ao kit 4DxPlus® e 28 (63,6%) foram reagentes, sendo 16 (57,14%) positivos apenas para erlichiose, 6 (21,43%) para anaplasmosse e 6 (21,43%) coinfectados, ou seja, positivos para ambos os agentes. A trombocitopenia foi a alteração hematológica mais evidenciada em cães com EMC (65,2%), enquanto que a anemia normocítica e hipocrômica foi a alteração hematológica mais frequentes (80%) em animais com ATC. Não foram evidenciadas alterações associadas à coinfeção. Na avaliação da MO observou-se aumento da série eritroide no grupo de animais positivos para *Anaplasma spp* (75%), enquanto os animais do grupo *E. canis* e os coinfectados mostraram aumento da série linfóide, 29,78% e 29,67% respectivamente, quando comparados aos demais grupos. Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que o somatório de métodos laboratoriais é essencial na caracterização das hemoparasitoses em cães, embora não exista teste-ouro, agregando valor e permitindo uma efetiva consolidação do diagnóstico relacionado a essas doenças.

Palavras Chaves: Hemograma, Mielograma, Snapp 4Dx Plus.

ABSTRACT

Hemoparasitosis are highly prevalent and very important diseases in small animal practice, as they are responsible for many clinical and laboratorial alterations. The aim of this work was to study the cytomorphological aspects of bone marrow and haematological findings in dogs naturally infected by *Ehrlichia* spp. and / or *Anaplasma* spp. diagnosed by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) using the SNAP 4Dx Plus® kit. We evaluated 44 dogs of different breeds and ages that were suspected positive for canine monocytic ehrlichiosis (CME) and/or canine thrombocytic anaplasmosis (CTA). Out of the 44 dogs, 16 (36,4%) were negative for the SNAP 4Dx Plus® kit and 28 (63,6%) were reactive. Out of these 28, 16 (57,14%) were positive only for ehrlichiosis, 6 (21,43%) were positive for anaplasmosis and 6 (21,43%) were coinfecting (positive for both agents). Thrombocytopenia was the most frequent hematological alteration (80%) in animals with CTA. No alterations were associated with coinfection. An increase in the erythroid series in the group positive for *Anaplasma* sp. was noticed in the bone marrow evaluation, whereas animals positive for *E. canis* and coinfecting animals showed an increase in the lymphoid series when compared to the other groups. The results of this study allow us to infer that the sum of laboratory methods is essential in characterizing the hemoparasitoses in dogs , although there is no test gold , adding value and allowing an effective consolidation of the diagnosis related to these diseases

Key words: complete blood count, hemoparasitosis, myelogram, Snapp 4dx Plus.

INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses são doenças causadas por agentes etiológicos que atingem a corrente sanguínea sendo capazes de destruir ou alterar a função das células sanguíneas, podendo esses ser intra ou extracelular. Tais doenças constituem um crescente problema na rotina da clínica médica de pequenos animais no Brasil, expressando sinais clínicos inespecíficos que limitam o diagnóstico preciso, minimizando assim as possibilidades de recuperação do paciente (MANOEL, 2010).

A erliquiose e a anaplasmose canina representam duas das mais frequentes hemoparasitoses em cães. Havendo uma maior ocorrência de *Anaplasma platys* em relação à *Ehrlichia canis* e cerca de 5,47% de coinfeção dos dois agentes infecciosos (SILVA et al., 2010).

Os achados clínicos e hematológicos são inespecíficos em ambas infecções, e consistem em: depressão, inapetência, anemia normocítica normocrômica, leucopenia e trombocitopenia (MANOEL, 2010; NAKAGHI et al., 2008; SHIPOV et al., 2008), sendo essas últimas informações essenciais ao profissional para solicitação de exames mais específicos, como a avaliação de medula óssea.

A medula óssea (MO) é um tecido semissólido (FIGHERA, 2014), cuja principal função é a hematopoiese. Localizada em um espaço restrito nos ossos longos e chatos (MÜLLER et al., 2009). Por ser um tecido multifuncional, as amostras de medula óssea possibilitam a realização de exames diversos como mielograma, citometria de fluxo, a imunohistoquímica e, ainda, a citogenética convencional (FLEURY, 2007).

O mielograma consiste na avaliação citológica da medula óssea, e sua aplicabilidade é possível pela facilidade em se obter células por meio da punção aspirativa (FIGHERA, 2014).

Na Medicina Veterinária tem-se tornado um procedimento de alto valor investigativo, tendo em vista fomentar o diagnóstico da maioria das doenças hematológicas que comprometam a MO, desde desordens primárias a neoplásicas (FIGHERA, 2014; GRINDEM, 2002).

A aquisição de conhecimentos sobre as alterações em MO nas infecções por hemoparasitas favorece a clínica médica e permite a condução de prognósticos e tratamentos mais adequados, assegurando uma melhor qualidade de vida, maior sobrevida e redução potencial de sofrimentos desnecessários dos animais acometidos.

Considerando a importante contribuição relacionada ao exame da MO no que refere-se ao diagnóstico e prognóstico das hemoparasitoses, bem como a escassez de estudos realizados

neste sentido, esta pesquisa fundamenta-se na caracterização citomorfológica de material medular obtido por punção aspirativa e de sangue periférico de cães portadores de hemoparasitas.

MATERIAL E MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi executada respeitando-se as medidas de proteção e minimização de desconfortos e riscos previsíveis aos animais, assim como os dados e materiais obtidos dos animais foram preservados e apenas os tutores, após esclarecimentos sobre o projeto, que assinaram o **termo de autorização de uso de imagem e dados (Anexo)** participaram da pesquisa (Processo CEUA n^o número do processo: 001501/2016-11).

AMOSTRAGEM

Foi utilizada a amostragem não probabilística por conveniência totalizando 44 animais analisados.

ANIMAIS

A população alvo da pesquisa foi constituída por cães adultos, machos e fêmeas de raças e portes variados, procedentes do município de Recife e Região Metropolitana no estado de Pernambuco, atendidos na Clínica Veterinária Fauna (Recife – PE) e com suspeita clínica de hemoparasitose. Os animais suspeitos analisados foram submetidos ao exame sorológico.

EXAMES LABORATORIAIS

Análise Sorológica: O teste sorológico foi realizado empregando-se o Kit SNAP 4Dx Plus[®] (IDEXLAB, 2015) conforme recomendações do fabricante. O teste foi realizado a partir do sangue total fresco, obtido para realização do hemograma, após chegar à temperatura ambiente (18-25°C). Considerou-se como resultado positivo qualquer surgimento de cor nos poços indicando a presença de anticorpo anti- *A. phagocytophilum* e/ou *A. platys* e/ou do anticorpo anti- *E. canis* e/ou *E. ewingii* na amostra. Resultados negativos são observados quando a cor surge apenas no ponto de controle positivo.

Análise Hematológica: As amostras sanguíneas de todos os pacientes foram obtidas a partir de venopunção da jugular, onde 2mL de sangue total foram envasados em frascos contendo solução anticoagulante ácido etilenodiaminotetra-acético tripotássico- K3 (tubos de coleta a vácuo – EDTA/K3 Vacuette®).¹

As amostras foram refrigeradas e processadas em até vinte e quatro horas após a coleta, a fim de assegurar a qualidade do exame.

Os parâmetros considerados na pesquisa foram obtidos em contador automático de células (Analisador Hematológico Veterinário Sysmex pocH- 100iV Diff 12® Sismex Corporation, Kobe, Japão), são eles: CTL (contagem total de leucócitos), HEM (hemácias), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) e PLT (plaquetas), sendo este último conferido por meio de esfregaços sanguíneos. Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados em lâminas de microscopia (tamanho 26x76mm e espessura 1,2mm) e corados pela técnica de panótico rápido, para realização da contagem diferencial de leucócitos em contador manual de células (JAIN, 1993; MEYER e HARVEY, 2004). A leitura das lâminas foi realizada por um único observador em microscopia óptica convencional.

Mielograma: A obtenção do material da medula óssea foi realizada pela punção aspirativa utilizando-se agulha hipodérmica descartável 40 x 16. A colheita das amostras foi realizada a partir da punção esternal segundo Lewis & Rebar (1979) e Cowell *et al.* (2009). As amostras obtidas foram processadas segundo Raskin & Messick (2012) e coradas pelo método de Panótico rápido.

A avaliação citomorfológica da MO foi realizada a partir do esfregaço de espículas medulares obtidos pela técnica de compressão. Sendo avaliada em microscopia óptica de luz por um único observador.

Inicialmente os esfregaços foram avaliados quanto à qualidade em menor aumento (10x, 20x e 40x). A celularidade da medula óssea foi estimada examinando a proporção de células versus gordura presentes nas espículas, considerando a idade do animal. Para cães jovens (até três anos) a MO foi considerada normal quando apresentou 75% de celularidade, para cães adultos (3,1 anos até 8 anos) a MO foi considerada normal quando encontrou-se 50 % de celularidade, e para cães idosos a celularidade considerada normal foi de 25%. A

¹ Vacuette do Brasil, Americana/SP

²SNAP da IDEXX Laboratories, EUA/outros países

medula foi considerada aplásica quando composta por menos de 10% de células (COWELL et al., 2009).

Megacariócitos foram avaliados quanto à frequência, maturidade e morfologia. A frequência foi estimada avaliando-se cinco campos em objetiva de 10x. A série megacariocítica foi considerada normal quando 5 a 9 megacariócitos foram encontrados por campo. Quando 10 ou mais megacariócitos foram observados por campo, a série megacariocítica foi considerada aumentada. Quando menos de cinco megacariócitos foram observados por campo, a série megacariocítica foi considerada diminuída (COWELL et al., 2009; HONSE, 2014).

Em maior aumento utilizando as objetivas de 50x ou 100x (para aumento de 500 e 1000 vezes, respectivamente) fez-se a estimativa da proporção mielóide-eritróide (COWELL et al., 2009). A relação M:E foi considerada normal quando esteve entre 0,92 - 1,68 (MORAILLON et al., 2013).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, primeiramente, realizou-se uma análise de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. A partir disso, as variáveis que apresentaram distribuição normal e que tinham seus valores expressos em porcentagem, empregou-se uma transformação numérica utilizando-se a metodologia do Arcoseno. Em seguida, foi realizada a comparação entre os resultados das variáveis através dos testes de Tukey e Kruskal-Wallis para as variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente (SAMPAIO, 1998). O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

Em seguida, realizou-se uma análise univariada através do teste de Qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher, quando o primeiro não exequível, utilizando-se os resultados obtidos na sorologia para erliquiose (reagente ou não reagente) (THRUSFIELD, 2004). O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

RESULTADOS

Do total de 44 animais analisados, observou-se que em relação ao sexo, 11 (25%) eram fêmeas e 33 (75%) machos. Quanto à idade, 15 (34,1%) animais tinham até três anos, 16 (36,4%) pacientes tinham entre 3,1 e 8 anos e 13 (29,5%) estavam acima dos oito anos.

Dos 44 cães com suspeita de hemoparasitose 16 (36,4%) foram negativos ao kit 4DxPlus[®] enquanto 28 (63,6%) confirmaram a suspeita com o diagnóstico sorológico, ou seja, foram reagentes. Do total de animais reagentes 16 (57,14%) foram considerados positivos apenas para erliquiose, 6 (21,43%) apenas para anaplasmose e 6 (21,43%) para ambas as doenças.

Os dados obtidos a partir da avaliação do eritrograma, contagem plaquetária, mielograma e pesquisa de hemoparasitas, bem como do leucograma, que caracterizam os animais positivos para EMC encontram-se dispostos nas tabelas 1 e 2, respectivamente (Apêndice). Onde é possível observar que houve associação entre a infecção por *E. canis* e o número de plaquetas circulantes, tendo em vista que foi encontrado maior frequência (65,2%) de trombocitopenia. Quanto ao mielograma, pode-se evidenciar aumento na celularidade da MO em 80% dos casos, devido a maior frequência de casos de hiper celularidade, bem como diminuição do índice M:E, 70,6% (12/17) dos animais apresentaram M:E abaixo dos valores esperados. Em relação ao leucograma nenhuma variável apresentou associação significativa com a infecção por *E. canis*.

Os dados obtidos a partir da avaliação do eritrograma, contagem plaquetária, mielograma e pesquisa de hematozoários, bem como do leucograma, que caracterizam os animais positivos para ATC encontram-se dispostos nas tabelas 3 e 4, respectivamente (Apêndice). Aqui nota-se que a avaliação do eritrograma para os animais positivos para *Anaplasma* spp. apresentou associação significativa com a infecção por este agente. Pode-se observar uma maior frequência de casos de anemia macrocítica e hipocrômica. Quanto ao mielograma, observou-se que a série eritróide apresentou associação significativa com a infecção por *Anaplasma* spp. Pode-se observar uma maior frequência de casos de Aplasia e Hiper celularidade dessa série. No leucograma nenhuma variável apresentou associação significativa com a infecção por *Anaplasma* spp.

Os dados obtidos a partir da avaliação do eritrograma, contagem plaquetária, mielograma e pesquisa de hematozoários, bem como do leucograma, que caracterizam os animais com coinfeção estão dispostos nas tabelas 5 e 6, respectivamente (Apêndice). Onde evidenciou-se que nenhuma das variáveis analisadas no eritrograma, plaquetograma,

mielograma e pesquisa de hematozoários, bem como do leucograma, apresentou associação significativa com a coinfeção.

A comparação entre as variáveis analisadas nos diferentes grupos estudados encontra-se disposta nas tabelas 7, 8 e 9 (Apêndice), onde é possível avaliar os parâmetros obtidos no eritrograma, contagem plaquetária, leucograma e mielograma, respectivamente.

Animais positivos para *Anaplasma* spp. apresentam diminuição no parâmetro CHCM, quando comparado aos demais grupos.

O grupo controle foi o que mostrou índices plaquetários normais quanto ao padrão para a espécie, sendo estes maiores que os índices do grupo de animais com EMC.

Na avaliação leucocitária não foi evidenciado, estatisticamente, diferença entre os grupos estudados.

Ao se comparar os resultados do mielograma por grupos observou-se que o grupo controle apresenta maior porcentagem da série mieloide, bem como maiores resultados na relação M:E que os demais grupos avaliados. A série linfóide mostrou-se elevada nos grupos de animais com EMC e nos coinfectados, quando comparados aos demais grupos.

DISCUSSÃO

A maior ocorrência de *E. canis* (57,16%) em relação a *Anaplasma* spp. (21,43%) notada neste estudo, bem como a ocorrência de coinfeção em 21,43% dos casos, diverge dos achados de Silva et al. (2010) que encontrou maior ocorrência de *A. platys* em relação a *E. canis* em amostras coletadas de animais, independente dos sinais clínicos, sendo que em 5,47% dos casos ocorreu a coinfeção dos dois agentes infecciosos. Entretanto Witter et al. (2013) encontraram resultados semelhantes, em animais com suspeita clínica de hemoparasitoses, sendo que 23,3% dos animais analisados demonstraram infecção por *E. canis*, 9,1% por *A. platys* e 5,2% apresentaram coinfeção com esses parasitas. Em ambos os trabalhos foi realizada a confirmação através de metodologia molecular.

Ramos et al. (2009) encontraram coinfeção entre *E. canis* e *A. platys* pelo método de PCR em 32% dos animais, esses animais foram coletados em rotina hospitalar, sendo todos suspeitos de ter alguma hemoparasitose. Em outro estudo a coinfeção entre esses agentes foi de 5,5%, em uma população não suspeita (SILVA et al., 2012). A elevada ocorrência de coinfeção por esses dois patógenos, pode estar relacionada à forma e vetor de transmissão (HUANG et al., 2005).

A elevada ocorrência de coinfeção por esses dois patógenos, pode estar relacionada à forma e vetor de transmissão (HUANG et al., 2005). A divergência encontrada entre este estudo e os realizados por Silva et al. (2010) pode se dar pela variação de clima devido à localização dos animais estudados, visto que, os autores pesquisaram alterações por hemoparasitas no Paraná, sul do Brasil, onde a temperatura média anual varia de 15° a 24°C (IPAR, 2016). Sabe-se que ambas as infecções concentram-se em regiões tropicais e subtropicais, conforme a presença do vetor (WEN et al., 1997), logo, acredita-se que as elevadas condições de clima do Recife e da Região Metropolitana do Recife, com temperaturas médias entre 24° e 36°C (APAC, 2016), favoreçam a proliferação do vetor. Além disso, a diferença na técnica utilizada para diagnóstico pode ser um segundo fator que influenciou na diferença encontrada entre os estudos.

Alterações laboratoriais nas infecções por hemoparasitas são frequentes, no entanto, mostram-se extremamente inconstantes e inespecíficas (HARVEY, 1998; MOREIRA et al., 2003).

Os animais com infecção por *E. canis* apresentaram trombocitopenia (65,2%). Acetta (2008) detectou trombocitopenia em 100% dos animais que apresentaram infecção por *Ehrlichia* sp., enquanto Albernaz et al. (2007) descreveram a ocorrência de trombocitopenia em 76,7% dos animais. Achado de trombocitopenia em cães infectados por *E. canis* está em concordância com outros estudos no Brasil (DAGNONE et al., 2003; BULLA et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008; UENO et al., 2009). Os resultados confirmam a trombocitopenia como a alteração hematológica mais comum nas infecções por *E. canis*.

A hipercelularidade encontrada na MO dos cães com EMC pode ser justificada pela fase da infecção em que o paciente se encontrava, visto que, o aumento da celularidade ocorre frequentemente em casos agudos da infecção (WADDLE e LITTMAN, 1988). Costa (2014) relata que a hipercelularidade foi identificada em 38,5% dos casos de animais infectados em sua pesquisa.

A menor proporção M:E pode indicar aumento da população de hemácias (hiperplasia eritroide) e/ou diminuição nos precursores granulocíticos (hipoplasia mieloide). Apesar de não haver associação estatística na série mielocítica com a infecção por *E. canis*, acredita-se que a diminuição da relação M:E encontrada nesse estudo decorra de uma hipoplasia do compartimento mieloide, tendo em vista que os casos de depleção, depressão e aplasia dessa série são alterações mais graves de hipoplasia, ou seja, ao somar as diferentes alterações que indicam diminuição da série mielocítica da MO tem-se mais casos de redução mieloide. Esses

achados diferem de Moreira et al. (2005) que observaram aumento na relação mielóide/eritroide (M:E) em cães infectados.

A anemia macrocítica e hipocrômica indica uma resposta regenerativa. Costa (2014) classificou a anemia de 42,85% dos cães infectados por *A. platys* como macrocítica hipocrômica, resultado diferente do encontrado por Silva (2010) que não observou correlação entre essa infecção e ocorrência de anemia.

A alta frequência de hiperplasticidade na série eritroide da MO dos animais positivos para *Anaplasma* spp. avigora a resposta a regenerativa da anemia classificada pelos índices hematimétricos. Enquanto que o relato de aplasia dessa mesma série evidencia que a anemia pode variar de discreta a intensa, em pacientes infectados.

O fato de não haver associação significativa da trombocitopenia com os casos positivados de ATC demonstra que a trombocitopenia é um parâmetro inconstante, que pode estar ausente em pacientes infectados (COSTA, 2015).

A resposta dos leucócitos, diante dessas infecções, é extremamente variável, pois está relacionada à fase da infecção, imunidade do hospedeiro e patogenicidade do hemoparasita envolvido (ALMOSNY e MASSARD, 2002; STOCKHAM e SCOTT, 2011).

A coinfeção não demonstrou interferir nos parâmetros averiguados, considerando que os agentes etiológicos alteram os índices de forma antagônica de acordo com a fase da infecção, sugerindo que houve um balanceamento entre diminuição e aumento dos mesmos parâmetros. No estudo realizado por Costa (2015) o grupo que apresentava coinfeção não demonstrou agravamento nas alterações do eritrograma, mas apresentou valores médios superiores aos daqueles animais infectados somente por *E. canis*, ou somente por *A. platys*, concordando com as informações descritas na literatura (HARVEY, 1998).

O aumento da série linfóide nos grupos coinfectados e positivos para *E. canis* denotam o caráter de resposta imunológica que ocorre nos casos de EMC. Tal achado corrobora com o estudo realizado por Costa (2015) que relata aumento na concentração de linfócitos na medula óssea em 30% dos animais coinfectados. Esse fato já foi relatado por outros autores em infecções isoladas por esses agentes (MYLONASKIS et al., 2010).

A série mielóide, bem como a relação M:E do grupo controle mostram-se com maiores proporções quando comparadas aos demais grupos avaliados. Isso não significa que esses parâmetros estão elevados, porém indica a normalidade esperada para a condição de negatividade, apesar da suspeita clínica, enquanto que os grupos positivados demonstram ter os mesmos valores diminuídos.

O Kit 4DxPlus[®] mostrou-se crucial para a confirmação da infecção/coinfecção por *E. canis* e *Anaplasma* spp. Bélanger et al. (2002) ao analisarem testes rápidos de ELISA e RIFI observaram resultados semelhantes a pesquisa realizada por Harrus et al. (2002), onde o SNAP Test apresentou sensibilidade e especificidade de 79,2% e 100%, respectivamente, e concluíram que além dos kits serem realmente sensíveis e específicos, os testes rápidos de ELISA ainda apresentam a vantagem de resultados rápidos, podendo ser utilizados para diagnóstico nas clínicas veterinárias e são de fácil interpretação para a detecção de anticorpos no soro, ao contrário da pesquisa pela técnica de RIFI, que apesar de ser considerada “Padrão Ouro”, tem por limitações a subjetividade do observador, laboratório equipado e mão-de-obra especializada (BÉLANGER et al., 2002; HARRUS et al., 2002).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que o somatório de métodos laboratoriais é essencial na caracterização das hemoparasitoses em cães, embora não existe teste-ouro, agregando valor e permitindo uma efetiva consolidação do diagnóstico relacionados a essas doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACETTA, E.M.T. Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães (Canis familiares, Linnaeus 1758) trombocitopênicos na região dos lagos do Rio de Janeiro. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Patologia e Ciências Clínicas) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ALBERNAZ, A.P.; MIRANDA, F.J.B.; MELO, O.A et al. Erliquiose canina em Campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p 799-806, 2007.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L.; LABARTHE, N.V. et al. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. 1 Edição. Rio de Janeiro: L.F. Livros, V.1 p. 13-56. 2002.

BÉLANGER, M.; SORENSON, H.L.; FRANCE, M.K.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R. Comparison of Serological Detection Methods for Diagnosis of Ehrlichia canis Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3506–3508, 2002.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO Jr., J.P.; TRINCA, LA; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v.35, p.141–146, 2004.

COSTA, M. P. **Avaliação Hematológica De Sangue E Medula Óssea E Bioquímica Sérica De Cães Infectados Naturalmente Por Hemoparasitas**. 2014. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte – MG. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SMOC-9MVGFN>. Acesso em 23 de dezembro de 2015.

COWELL, R. L., TYLER, R. D., MEINKOTH, J. H., DENICOLA, D. B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e gatos**. Editora MedVet, 3ª edição, p. 423-450.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTO, M.C. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

FIGHERA, R. A. **Mielograma. Citologia Veterinária Diagnóstica**. Editora MedVet, 1ª edição, p. 120-145. 2014.

FLEURY, S.A. **Biópsia de medula óssea (BMO) e sua relação com o aspirado de medula óssea (AMO)**. 2007. Acesso em 29 jul. 2014. Online. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/Publico/LaboratorioReferencia/ManualHematologia/pages/Bi%C3%B3psiademedula%C3%B3sseaBMOesurela%C3%A7%C3%A3o.aspx>.FUJJI, 2009

GRINDEM, C.B. Cytology of Bone Marrow. **The Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v.32, n.6, p.1313-1374, 2002.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H.; MAHAN, S.M.; WANER T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.361-368, 2002.

HARVEY, J. W.; Ehrlichiosis: canine thrombocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. (Ed.) **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 934 p., cap. 28, p. 139-154, 1998.

HONSE, C. O. Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil hematológico de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi. 81f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Rio de Janeiro; 2014.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M.J. et al. Prevalence and molecular analysis of Anaplasma platys in dogs in Lara, Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, p. 211-216, 2005.

IDEXX LABORATORIES. Licenciado no Ministério da Agricultura sob o nº 9.981/2014. REPRESENTANTE EXCLUSIVO NO BRASIL IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA. São Paulo-SP. 2015.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia. Lea & Febiger, 417p. 1993.

MANOEL, C.S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por Ehrlichia canis**. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & Diagnosis**. Philadelphia, W.D. Saunders, 349p, 2004.

MYLONASKIS, M.E.; SIARKOU, V.I.; KOUTINAS, A F. Mielosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). **Update of Pathogenesis, Diagnosis And Management**. v. 65, n. 4, 2010.

MOREIRA, S.M.; MACHADO, R.; PASSOS, L.F. Detecção de Ehrlichia canis em aspirados de medula óssea de cães experimentalmente infectados. **Ciência Rural**. v. 35, n. 4, p.958-960, 2005.

MÜLLER, D. C.M.; PIPPI, N. L.; BASSO, P. C.; OLSSON, D. C.; EDUARDO DE BASTOS SANTOS JUNIOR, E. B. S.; GUERRA, A. C. O. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural, Santa Maria**. n.39, v.7, p.2243-2251, 2009.

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

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R. et al. Comparação de nested-pCR com o diagnóstico direto na detecção de Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 8, supl. 1, p.58- 62, 2009.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. Obtenção e Manuseio das Amostras para Exame Citológico. **Atlas de Citologia de Cães e Gatos**. p. 1-14, Editora ROCA, São Paulo, 2003.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER, L.; WANER, T.; HARRUS, S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 1-2, p. 131-138, 2008.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BOA SORTE, E. C.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-Ehrlichia canis em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2. ed. Iowa: Blakwell Publishing, 729p. 2008.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.

UENO, T.E.H.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; MEGID, J.; LABRUNA, M.B. Ehrlichia canis em cães atendidos no hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal. n. 18, v. 3, p. 57-61, 2009.

WADDLE, J.R.; LITTMAN, M.P.; A Retrospective Study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. **Journal of American Animal Hospital Association**. n. 24, p. 615–620, 1988.

WITTER, R.; VECCHI, S.N.; PACHECO, T.A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A.; SINKOC, A. L.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. n.34, v. 6, supl. 2, p. 3811-3822, 2013.

6. APÊNDICE

Tabela 1. Caracterização de cães diagnosticados com EMC e seus achados obtidos no eritrograma, plaquetograma, mielograma e pesquisa de hemoparasitas.

Variáveis	N	SOROLOGIA	Valor P
		Reagente	
Sexo			
Fêmea	7	4 (57,1%)	1,000 ^(B)
Macho	25	12 (48,0%)	
Idade			
Até 3 anos	11	4 (36,3%)	0,322 ^(A)
Entre 3,1 e 8 anos	12	8 (66,7%)	
Acima de 8 anos	9	4 (44,4%)	
Eritrograma			
Anemia macrocítica e normocrômica	1	1 (100,0%)	0,671 ^(A)
Anemia macrocítica e hipocrômica	2	1 (50,0%)	
Anemia normocítica e normocrômica	21	11 (52,4%)	
Sem alteração	8	3 (37,5%)	
Hemoparasita em sangue periférico			
Sim	2	2 (100,0%)	0,483 ^(B)
Não	30	14 (46,7%)	
Plaquetograma			
Trombocitopenia	23	15 (65,2%)	0,015 ^{(B)*}
Sem alteração	9	1 (11,1%)	
Celularidade			
Hiperplasia	5	4 (80,0%)	0,005 ^{(A)*}
Hipoplasia	14	10 (71,4%)	
Sem alteração	13	2 (15,4%)	
Mielóide			
Aplasia	3	2 (66,7%)	0,141 ^(A)
Depleção	5	4 (80,0%)	
Depressão	1	1 (100,0%)	
Hiperplasia	7	3 (42,8%)	
Hipoplasia	8	5 (62,5%)	
Sem Alteração	8	1 (12,5%)	
Eritróide			
Aplasia	1	1 (100,0%)	0,504 ^(A)
Hiperplasia	4	3 (75,0%)	
Hipoplasia	7	3 (42,8%)	
Sem Alteração	20	9 (45,0%)	

^(A) Teste de Qui-quadrado; ^(B) Teste de Exato de Fisher; N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 1. Caracterização de cães diagnosticados com EMC e seus achados obtidos no eritrograma, plaquetograma, mielograma e pesquisa de hemoparasitas, continuação.

Variáveis	N	SOROLOGIA	Valor P
		Reagente	
<i>Índice M/E</i>			
Aumentado	3	1 (33,3%)	0,044^{(A)*}
Diminuído	17	12 (70,6%)	
Sem Alteração	12	3 (25,0%)	
<i>Linfoide</i>			
Aplasia	1	1 (100,0%)	0,344 ^(A)
Hiperplasia	2	2 (100,0%)	
Hipoplasia	22	10 (45,4%)	
Sem Alteração	7	3 (42,8%)	
<i>Monocítica</i>			
Aplasia	1	1 (100,0%)	0,367 ^(A)
Hiperplasia	1	0 (0,0%)	
Sem Alteração	30	15 (50,0%)	
<i>Outras Células</i>			
Aplasia	1	1 (100,0%)	0,367 ^(A)
Hiperplasia	1	0 (0,0%)	
Sem Alteração	30	15 (50,0%)	
<i>Megacariócitos</i>			
Aplasia	2	1 (50,0%)	0,071 ^(A)
Hiperplasia	1	1 (100,0%)	
Hipoplasia	16	11 (68,7%)	
Sem Alteração	13	3 (23,1%)	

^(A) Teste de Qui-quadrado; ^(B) Teste de Exato de Fisher; N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 2. Caracterização dos achados obtidos no leucograma de cães diagnosticados com EMC.

Variáveis	N	SOROLOGIA	Valor P ^(A)
		Reagente	
<i>Leucopenia</i>			
Sim	12	7 (58,3%)	0,715
Não	20	9 (45,0%)	
<i>Leucocitose</i>			
Sim	6	4 (66,7%)	0,653
Não	26	12 (46,1%)	
<i>DNNE Regenerativo</i>^{BD}			
Sim	6	4 (66,7%)	0,363
Não	23	9 (39,1%)	
<i>DNNE Degenerativo</i>^{BD}			
Sim	5	1 (20,0%)	0,343
Não	24	12 (50,0%)	
<i>Neutrofilia</i>^{BD}			
Sim	10	5 (50,0%)	0,714
Não	19	8 (42,1%)	
<i>Neutropenia</i>^{BD}			
Sim	1	1 (100,0%)	0,448
Não	28	12 (42,8%)	
<i>Eosinofilia</i>^{BD}			
Sim	4	2 (50,0%)	1,000
Não	25	11 (44,0%)	
<i>Aneosinofilia</i>^{BD}			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000
Não	23	13 (46,4%)	
<i>Linfocitose</i>^{BD}			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000
Não	28	13 (46,4%)	
<i>Linfopenia</i>^{BD}			
Sim	11	5 (45,4%)	1,000
Não	18	8 (44,4%)	
<i>Monocitose</i>^{BD}			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000
Não	28	13 (46,4%)	

^(A) Teste de Exato de Fisher; ^{BD} Base de dados diferentes (N=29); N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 3. Caracterização de cães diagnosticados com ATC e seus achados obtidos no eritrograma, plaquetograma, mielograma e pesquisa de hematozoários.

Variáveis	N	SOROLOGIA		Valor P
		Reagente		
Sexo				
Fêmea	5	2 (40,0%)		0,585 ^(B)
Macho	17	4 (23,5%)		
Idade				
Até 3 anos	9	2 (22,2%)		0,518 ^(A)
Entre 3,1 e 8 anos	7	3 (42,8%)		
Acima de 8 anos	6	1 (16,6%)		
Eritrograma				
Anemia macrocítica e hipocrômica	5	4 (80,0%)		0,010^{(A)*}
Anemia normocítica e normocrômica	11	1 (9,1%)		
Sem alteração	6	1 (16,6%)		
Hemat em sangue periférico				
Sim	2	2 (100,0%)		0,064 ^(B)
Não	20	4 (20,0%)		
Plaquetograma				
Trombocitopenia	12	4 (33,3%)		0,646 ^(B)
Sem Alteração	10	2 (20,0%)		
Celularidade				
Hiperplasia	3	2 (66,7%)		0,184 ^(A)
Hipoplasia	6	2 (33,3%)		
Sem Alteração	13	2 (15,4%)		
Mielóide				
Aplasia	2	1 (50,0%)		0,681 ^(A)
Depleção	1	0 (0,0%)		
Hiperplasia	6	2 (33,3%)		
Hipoplasia	5	2 (40,0%)		
Sem Alteração	8	1 (12,5%)		
Eritróide				
Aplasia	1	1 (100,0%)		0,022^{(A)*}
Hiperplasia	4	3 (75,0%)		
Hipoplasia	5	1 (20,0%)		
Sem Alteração	12	1 (8,3%)		
Índice M/E				
Aumentado	3	1 (33,3%)		0,234 ^(A)
Diminuído	9	4 (44,4%)		
Sem Alteração	10	1 (10,0%)		
Linfóide				
Aplasia	1	1 (100,0%)		0,122 ^(A)
Hipoplasia	17	5 (29,4%)		
Sem alteração	4	0 (0,0%)		
Monocítica				
Aplasia	1	1 (100,0%)		

^(A) Teste de Qui-quadrado; ^(B) Teste de Exato de Fisher; N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 3. Caracterização de cães diagnosticados com ATC e seus achados obtidos no eritrograma, plaquetograma, mielograma e pesquisa de hematozoários, continuação.

Variáveis	N	SOROLOGIA Reagente	Valor P
<i>Outras Células</i>			
Aplasia	1	1 (100,0%)	0,212 ^(A)
Hiper	1	0 (0,0%)	
Sem alteração	20	5 (25,0%)	
<i>Megacariócitos</i>			
Aplasia	2	1 (50,0%)	0,076 ^(A)
Hiper	2	2 (100,0%)	
Hipo	6	1 (16,7%)	
Sem alteração	12	2 (16,6%)	

^(A) Teste de Qui-quadrado; ^(B) Teste de Exato de Fisher; N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 4. Caracterização dos achados obtidos no leucograma de cães diagnosticados com ATC.

Variáveis	N	SOROLOGIA	Valor P
		Reagente	
<i>Leucopenia</i>			
Sim	8	3 (37,5%)	0,624 ^(B)
Não	14	3(21,4%)	
<i>Leucocitose</i>			
Sim	3	1 (33,3%)	1,000 ^(B)
Não	19	5 (26,3%)	
<i>DNNE Regenerativo</i>^{BD}			
Sim	2	0 (0,0%)	1,000 ^(B)
Não	19	5 (26,3%)	
<i>DNNE Degenerativo</i>^{BD}			
Sim	4	0 (0,0%)	0,532 ^(B)
Não	17	5 (29,4%)	
<i>Neutrofilia</i>^{BD}			
Sim	5	0 (0,0%)	0,277 ^(B)
Não	16	5 (31,2%)	
<i>Neutropenia</i>^{BD}			
Sim	0	0 (0,0%)	1,000 ^(A)
Não	21	5 (23,8%)	
<i>Eosinofilia</i>^{BD}			
Sim	3	1 (33,3%)	1,000 ^(B)
Não	18	4 (22,2%)	
<i>Aneosinofilia</i>^{BD}			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000 ^(B)
Não	20	5 (25,0%)	
<i>Linfocitose</i>^{BD}			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000 ^(B)
Não	20	5 (25,0%)	
<i>Linfopenia</i>^{BD}			
Sim	8	2 (25,0%)	1,000 ^(B)
Não	13	3 (23,1%)	
<i>Monocitose</i>^{BD}			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000 ^(B)
Não	20	5 (25,0%)	

^(A) Teste de Qui-quadrado; ^(B) Teste de Exato de Fisher; ^{BD} Base de dados diferentes (N=21); N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 5. Caracterização de cães coinfectados e seus achados obtidos no eritrograma, plaquetograma, mielograma e pesquisa de hematozoários.

Variáveis	N	SOROLOGIA		Valor P
		Reagente		
Sexo				
Fêmea	5	2 (40,0%)		0,585 ^(B)
Macho	17	4 (23,5%)		
Idade				
Até 3 Anos	9	2 (22,2%)		0,715 ^(A)
Entre 3,1 E 8 Anos	5	1 (20,0%)		
Acima De 8 Anos	8	3 (37,5%)		
Eritrograma				
Anemia macrocítica e hipocrômica	1	0 (0,0%)		0,055 ^(A)
Anemia normocítica e normocrômica	14	4 (28,5%)		
Hemoconcentração	2	2 (100,0%)		
Sem Alteração	5	0 (0,0%)		
Hemoparasita Em Sangue Periférico				
Sim	0	0 (0,0%)		1,000 ^(B)
Não	22	6 (27,2%)		
Plaquetograma				
Trombocitopenia	12	4 (33,3%)		0,646 ^(B)
Sem Alteração	10	2 (20,0%)		
Celularidade				
Hiperplasia	2	1 (50,0%)		0,720 ^(A)
Hipoplasia	5	1 (20,0%)		
Sem Alteração	15	4 (26,6%)		
Mielóide				
Aplasia	1	0 (0,0%)		0,156 ^(A)
Depleção	1	0 (0,0%)		
Hiperplasia	6	2 (33,3%)		
Hipoplasia	7	4 (57,1%)		
Sem Alteração	7	0 (0,0%)		
Eritróide				
Hiperplasia	3	2 (66,7%)		0,184 ^(A)
Hipoplasia	6	2 (33,3%)		
Sem Alteração	13	2 (15,4%)		
Índice M/E				
Aumentado	2	0 (0,0%)		0,658 ^(A)
Diminuído	7	2 (28,5%)		
Sem Alteração	13	4 (30,7%)		
Linfóide				
Hipoplasia	16	4 (25,0%)		1,000 ^(B)
Sem Alteração	6	2 (33,3%)		

^(A) Teste de Qui-quadrado; ^(B) Teste de Exato de Fisher; N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 5. Caracterização de cães coinfectados e seus achados obtidos na eritrograma, plaquetograma, mielograma e pesquisa de hematozoários, continuação.

Variáveis	N	SOROLOGIA	Valor P
		Reagente	
<i>Monocítica</i>			
Hiper	1	0 (0,0%)	1,000 ^(B)
Sem Alteração	21	6 (28,5%)	
<i>Outras Células</i>			
Hiper	1	0 (0,0%)	1,000 ^(B)
Sem Alteração	21	6 (28,5%)	
<i>Megacariócitos</i>			
Aplasia	1	0 (0,0%)	0,101 ^(A)
Hiper	1	1 (100,0%)	
Hipo	9	4 (44,4%)	
Sem Alteração	11	1 (9,1%)	

^(A) Teste de Qui-quadrado; ^(B) Teste de Exato de Fisher; N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 6. Caracterização dos achados obtidos no leucograma de cães diagnosticados com coinfeção

Variáveis	N	SOROLOGIA	Valor P ^(A)
		Reagente	
<i>Leucopenia</i>			
Sim	7	2 (28,5%)	1,000
Não	15	4 (26,6%)	
<i>Leucocitose</i>			
Sim	3	1 (33,3%)	1,000
Não	19	5 (26,3%)	
<i>DNNE Regenerativo</i>			
Sim	3	1 (33,3%)	1,000
Não	19	5 (26,3%)	
<i>DNNE Degenerativo</i>			
Sim	4	0 (0,0%)	0,540
Não	18	6 (33,3%)	
<i>Neutrofilia</i>			
Sim	6	1 (16,6%)	0,634
Não	16	5 (31,2%)	
<i>Neutropenia</i>			
Sim	1	1 (100,0%)	0,272
Não	21	5 (23,8%)	
<i>Eosinofilia</i>			
Sim	3	1 (33,3%)	1,000
Não	19	5 (26,3%)	
<i>Aneosinofilia</i>			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000
Não	21	6 (28,5%)	
<i>Linfocitose</i>			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000
Não	21	6 (28,5%)	
<i>Linfopenia</i>			
Sim	8	2 (25,0%)	1,000 ^c
Não	14	4 (28,5%)	
<i>Monocitose</i>			
Sim	1	0 (0,0%)	1,000
Não	21	6 (28,5%)	

^(A) Teste de Exato de Fisher; N – Total de Amostras; *Associação significativa ao nível de 5%.

Tabela 7. Comparação entre os resultados obtidos no eritrograma e plaquetograma por grupos

Grupos	HE ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	HB (g/dL)	VCM (fi)	CHCM (g/dL)	HT%	PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
EMC	4,47 \pm 1,52	10,26 \pm 3,11	70,13 \pm 5,64	32,65 \pm 1,33a	33,18 \pm 5,55	92,31 \pm 73,05b
ATC	4,49 \pm 2,35	10,55 \pm 5,59	72,01 \pm 5,96	30,17 \pm 1,91b	33,81 \pm 10,98	112,40 \pm 85,73ab
Coinfecção	5,86 \pm 2,26	12,61 \pm 4,58	65,60 \pm 0,52	33,07 \pm 1,00a	38,03 \pm 8,62	171,91 \pm 71,51ab
Controle	5,14 \pm 1,86	11,60 \pm 4,08	69,19 \pm 3,26	32,52 \pm 1,44a	36,37 \pm 7,66	200,93 \pm 111,13a

Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 8. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados obtidos no leucograma por grupos.

Grupos	Leuco ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	MET (%)	MIEL (%)	BAST (%)	SEGM (%)	EOS (%)	BAS (%)	LINF (%)	MON (%)
EMC	21,44	23,38	21,94	23,47	23,41	20,25	22,50	18,13	20,03
ATC	20,50	22,00	20,50	18,50	19,08	29,17	22,50	21,42	26,83
Coinfecção	22,17	22,00	24,00	24,67	18,00	26,67	22,50	28,25	16,17
Controle	24,44	22,00	23,25	22,22	24,56	20,69	22,50	25,13	25,72
Valor P	0,891	0,626	0,739	0,818	0,647	0,362	1,000	0,286	0,283

* Diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 9. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados obtidos no mielograma por grupos.

Grupos	CEL (%)	MIEL (%)	ERT (%)	Índice M/E	LINF (%)	MON (%)	OTRs (%)	Megacariócitos
EMC	19,09	15,56	27,25	15,47	29,78	22,47	21,53	18,38
ATC	29,08	23,67	19,50	22,67	13,17	22,58	14,50	28,42
Coinfecção	21,42	24,08	20,17	25,67	29,67	20,83	24,25	18,00
Controle	23,84	28,41	19,75	28,28	16,03	23,13	25,81	26,09
Valor P	0,404	0,047*	0,327	0,038*	0,003*	0,984	0,230	0,175

* Diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

7. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, portador do Registro Geral _____, tutor do cão _____ da raça _____ autorizo o uso de dados registrados na Clínica Veterinária Fauna que contêm informações sobre exames laboratoriais e imagens, bem como o uso para publicações científicas.

Recife, ____/____/20__

TUTOR