

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA DE SANGUE E MEDULA ÓSSEA E
BIOQUÍMICA SÉRICA DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE POR
HEMOPARASITAS.**

MARIANA DE PÁDUA COSTA

Belo Horizonte – MG

2014

MARIANA DE PÁDUA COSTA

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA DE SANGUE E MEDULA ÓSSEA E
BIOQUÍMICA SÉRICA DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE POR
HEMOPARASITAS.**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes.

Co-orientador: Prof. Marcos Bryan Heinemann.

Belo Horizonte – MG

2014

Dissertação defendida e aprovada em 29 de abril de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Presidente

Profa. Fabíola de Oliveira Paes Leme

Profa. Regina Kiomi Takahira

LISTA DE ABREVIACÕES

% - Porcentagem.
°C – Grau Celsius.
µL – Microlitro.
Alb – Albumina.
ALT – Alaninoaminotransferase.
AST – Aspartatoaminotransferase.
cél. – Célula.
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média.
DNA – Ácido desoxirribonucleico.
DNNER – Desvio nuclear de neutrófilos para a esquerda regenerativo.
DNND – Desvio nuclear de neutrófilos à direita.
dNTP – Trifosfato desoxirribonucleosídeos.
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético.
EMC – Erliquiose monocítica canina.
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*.
FA – Fosfatase alcalina.
g/dL – Gramas/decilitro.
GGT – Gama-glutamil transferase.
Glob – Globulina.
HCM – Hemoglobina corpuscular média.
IgA – Imunoglobulina da fase A.
IgG – Imunoglobulina da classe G.
LVC – Leishmaniose visceral canina.
LVH – Leishmaniose visceral humana.
Kg – Kilograma.
M:E – Mielóide:eritróide.
MgCl₂ – Cloreto de magnésio.
mL – Mililitro.
mg – Miligrama.
pb – pares de base.
PCR – Reação em cadeia da polimerase.
Ptna – Proteína.
RDW – Red cell distribution width.
RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta.
Rpm – Rotações por minuto.
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais.
U/L – Unidades/Litro.
VCM – Volume corpuscular médio.
VG – Volume globular.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
GENERAL ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	14
Principais hemoparasitas	14
Alterações laboratoriais	20
Métodos diagnósticos	23
MATERIAL E MÉTODOS	28
Seleção dos animais	28
Coleta	28
Procesamento das amostras	28

Capítulo 1 – Alterações hematológicas de sangue e medula óssea em animais infectados por *Ehrlichia sp*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp*.

RESUMO/ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES	48

Capítulo 2 – Alterações da bioquímica sérica em animais infectados por *Ehrlichia sp*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp*.

RESUMO/ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
CONCLUSÕES	54

Capítulo 3 – Comparação das alterações bioquímicas, hematológicas e de medula óssea em animais com suspeita clínica de hemoparasitose por *Ehrlichia sp*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis canis*.

RESUMO/ABSTRACT	55
INTRODUÇÃO	56
MATERIAL E MÉTODOS	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	80
Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).	80

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Alterações hematológicas de sangue e medula óssea em animais infectados por *Ehrlichia sp*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp*.

Tabela 1	Perfil infeccioso e número de animais e amostras obtidas em cada grupo.	35
Tabela 2	Média e desvio-padrão obtidos para os valores hematológicos, em cães, nos 13 grupos estudados, de acordo com o perfil infeccioso.	44
Tabela 3	Número e porcentagem de cães, que apresentaram alterações na avaliação morfológica das hemácias, nos 13 grupos estudados, conforme o perfil infeccioso.	45
Tabela 4	Número e porcentagem de cães, que apresentaram alterações nos parâmetros do plaquetograma e na avaliação morfológica das plaquetas, nos 13 grupos estudados, conforme o perfil infeccioso.	46
Tabela 5	Número e porcentagem de cães, que apresentaram alterações nos parâmetros do leucograma e na avaliação morfológica dos leucócitos, nos 13 grupos estudados, conforme o perfil infeccioso.	47

LISTA DE TABELAS

**Capítulo 2 – Alterações da bioquímica sérica em animais infectados por
Ehrlichia sp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e
*Leishmania sp.***

Tabela 1	Média e desvio-padrão obtidos para cada analito, em bioquímica sérica, de cães, nos 13 grupos estudados, de acordo com o perfil infeccioso.	52
-----------------	---	-----------

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3 – Comparação das alterações bioquímicas, hematológicas e de medula óssea em animais com suspeita clínica de hemoparasitose por *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis canis*

Tabela 1	Perfil infeccioso, contendo respectivo número de animais e amostras obtidas em cada grupo	57
Tabela 2	Média e desvio-padrão obtidos para os valores hematológicos, em cães, positivos e negativos para as hemoparasitoses estudadas.	58
Tabela 3	Número e porcentagem de cães, que apresentaram alterações nos parâmetros do hemograma e na avaliação morfológica dos tipos celulares, nos dois grupos estudados.	59
Tabela 4	Média e desvio-padrão obtidos para os valores de bioquímica sérica de cães com o diagnóstico molecular positivo ou negativo para <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i> e <i>Babesia canis canis</i> .	63
Tabela 5	Correlações de Spearman entre os parâmetros laboratoriais avaliados em cães infectados por hemoparasitas (grupo 1) e não infectados (grupo 2).	65

RESUMO GERAL

Hemoparasitoses são doenças de elevada prevalência e importância na clínica de pequenos animais, resultando em uma grande variedade de alterações hematológicas. Esse estudo teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas de sangue periférico, medula óssea e bioquímica sérica em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp.*, diagnosticados pela técnica da PCR e comparar com aqueles não infectados, apesar da suspeita clínica. Coinfecções por hemoparasitas são comuns em cães, ocorrendo em 42,9% (27/63) dos animais estudados. As alterações na patologia clínica, agravadas nas coinfecções, incluíram anemia (85,7%), trombocitopenia (57,1%) e resposta variável de leucócitos. A avaliação da medula óssea demonstrou variações nos animais infectados de acordo com a fase da infecção e perfil infeccioso. Alterações nos analitos bioquímicos foram frequentes em animais com hemoparasitose, com destaque para os valores de albumina, fosfatase alcalina e alanina aminotransferase, nos animais infectados por *Ehrlichia canis*. A infecção por *Leishmania sp.* mostrou-se associada à redução dos valores de albumina e aumento das globulinas. Observou-se maior ocorrência de anemia (77,8% versus 33,3%), trombocitopenia (55,6% versus 28,6%), leucocitose (18,5% versus 14,3%), leucopenia (14,8% versus 4,8%), hipergamaglobulinemia (40,7% versus 14,3%) e hipocelularidade medular (53,8% versus 0%) nos animais infectados por hemoparasitas. Exames hematológicos de sangue e medula óssea e de bioquímica sérica podem auxiliar no diagnóstico de hemoparasitoses em cães, embora não exista teste ouro.

Palavras-chave: Cães, hemoparasitoses, anemia, trombocitopenia, bioquímica sérica, medula óssea.

GENERAL ABSTRACT

Hemoparasitoses presents high prevalence and importance in small animal clinical, resulting in a variety of haematological disorders. This study has the objective to evaluate the hematological changes in blood, bone marrow and serum biochemistry in dogs naturally infected by *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* and *Leishmania sp.*, diagnosed by PCR and to compare to non infected dogs, despite clinical suspect. Hemoparasites co-infections are relatively common in dogs, occurring in 42.9% (27/63) of the studied animals. Clinical pathological alterations were exacerbated in co-infections, and included anemia (85.7%), thrombocytopenia (57.1%) and variable response of leukocytes. Bone marrow evaluation demonstrated variations in infected animals according to the stage of infection and infectious profile. Changes in biochemical analytes were frequent in animals with hemoparasitoses, highlighting the values of albumin, alkaline phosphatase and alanine aminotransferase in animals infected with *Ehrlichia canis*. Infection by *Leishmania sp.* was associated with decreased levels of albumin and increased levels of globulins. It was observed higher incidence of anemia (77,8% versus 33,3%), thrombocytopenia (55,6% versus 28,6%), leukocytosis (18,5% versus 14,3%), leukopenia (14,8% versus 4,8%), hypergammaglobulinemia (40,7% versus 14,3%) and bone marrow hypocellularity (53,8% versus 0%) in animals infected by hemoparasites. Haematological blood tests and bone marrow and serum biochemistry can help to diagnose hemoparasitoses in dogs, although there is no golden test.

Key-words: Dogs, hemoparasitoses, anemia, thrombocytopenia, serum biochemistry, bone marrow.

INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses são doenças de extrema importância na clínica de pequenos animais, por serem infecções de elevada prevalência, fácil transmissão e difícil controle (Urquhart et al., 1998). Os sinais clínicos são inespecíficos e extremamente variáveis, associados a diferentes taxas de morbidade e mortalidade. Algumas das principais hemoparasitoses que ocorrem no Brasil são causadas pelos agentes *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis* e *Leishmania spp.* (Almosny e Massard, 2002).

A erliquiose monocítica canina (EMC) e a trombocitopenia cíclica canina são denominações para afecções causadas pelas bactérias *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, respectivamente. Dumler et al. (2001) renomearam e reclassificaram a família da qual esses microrganismos pertencem, sendo que, na classificação atual fazem parte da ordem Rickettsiales e da família Anaplasmataceae. Em função de suas características genéticas, essas bactérias foram classificadas em gêneros diferentes, sendo que antigamente ambas pertenciam ao gênero *Ehrlichia*.

A erliquiose monocítica canina, é uma das doenças mais graves e comuns nessa espécie, ocorrendo principalmente nos cães que habitam áreas urbanas (Ueno et al., 2009). Foi primeiramente relatada no Brasil em 1973 por Costa e Batista Junior (Cesar, 2008) em Belo Horizonte, Minas Gerais. Desde então foi relatada em todas as regiões brasileiras

(Labruna e Pereira, 2001). Apresenta distribuição mundial, mas a maioria dos casos concentra-se em regiões tropicais e subtropicais, conforme a presença do vetor (Wen et al., 1997). Nas infecções por *Ehrlichia canis*, a morbidade é extremamente variável, dependendo da cepa, da raça acometida e da imunocompetência do hospedeiro (Cohn, 2003).

A trombocitopenia cíclica canina é uma doença de grande importância na clínica médica de pequenos animais. O primeiro relato experimental de um microrganismo do gênero *Ehrlichia sp.* causador de trombocitopenia cíclica foi realizado por Harvey et al. em 1978 (Almosny e Massard, 2002). No Brasil, a incidência de infecções por essa bactéria aumenta a cada dia (Machado et al., 2010).

A Babesiose canina é uma hemoparasitose causada pelos protozoários *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*, sendo que a última é mais prevalente na Ásia, com poucos relatos na América do Sul (Shaw et al., 2001). É uma doença de distribuição mundial, com relatos de casos em todos os continentes. Existem subespécies da *Babesia canis* que se diferenciam entre si pela patogenicidade, sendo que a *Babesia canis rossi* é a mais patogênica, seguida pela *Babesia canis canis* e finalmente pela *Babesia canis vogeli*, que provoca doença branda nos animais (Uilenberg et al., 1989).

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é o principal vetor desses agentes. As principais

medidas de profilaxia estão, portanto, relacionadas ao controle desse ectoparasita, de forma a reduzir as taxas de transmissão (Dagnone et al., 2001).

A leishmaniose visceral canina (LVC), associada às espécies de *Leishmania* complexo *donovani*, é transmitida por mosquitos flebotomíneos, sendo encontrada na América desde os Estados Unidos até o norte da Argentina. Trata-se de uma zoonose de grande importância, com casos humanos (leishmaniose visceral humana, LVH) restritos à América Latina no continente americano (Monteiro et al., 1994). No Brasil, a leishmaniose visceral está presente nas cinco regiões, sendo a *L. chagasi* (ou *L. infantum*) a principal espécie envolvida e, juntamente com a região mediterrânea da China, é considerado o maior foco de LVH no mundo (Alvar et al., 2004; Brasil, 2006).

Essas hemoparasitoses podem causar diversas alterações hematológicas e bioquímicas nos animais infectados. Em linhas gerais, os animais infectados por *Ehrlichia canis* podem apresentar trombocitopenia, anemia e leucopenia (Moreira et al., 2003). No caso de infecções por *Anaplasma platys*, pode ocorrer anemia moderada e quedas temporárias no valor total de

leucócitos, além de variações cíclicas na contagem de plaquetas (Harvey, 1998). Os animais acometidos por *Babesia canis* podem desenvolver anemia discreta a grave, reticulocitose, policromasia, macrocitose, linfocitose discreta e hiperbilirrubinemia dependendo de sua forma aguda ou crônica (Stockham e Scott, 2011). As infecções por *Leishmania chagasi* podem resultar em anemia, resposta variável de leucócitos com linfopenia e trombocitopenia (Baneth, 2006).

Essa dissertação foi dividida em três capítulos, sendo que os dois primeiros compararam as alterações laboratoriais – avaliação hematológica de sangue e medula óssea primeiro e avaliação bioquímica no segundo – entre grupos com distinto perfil de infecção por hemoparasitos, enquanto o terceiro capítulo comparou as mesmas alterações em cães infectados e não infectados, mas com suspeita clínica de hemoparasitose.

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a importância das alterações laboratoriais (hemograma, provas bioquímicas e mielograma) no diagnóstico das hemoparasitoses em cães.

REVISÃO DE LITERATURA

Principais hemoparasitas

Ehrlichia canis

A *E. canis* parasita células mononucleares do hospedeiro, podendo ser encontrada em três formas: corpúsculos iniciais, corpos elementares e mórula. A mórula é a forma mais característica de todas as bactérias desse gênero, sendo formada a partir da união dos corpos elementares (McDade, 1990).

A transmissão da *E. canis* ocorre através do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* que ingere o sangue de um animal infectado durante o repasto sanguíneo. Os microrganismos se disseminam nos hemócitos presentes no intestino dos carrapatos até atingirem a glândula salivar dos mesmos. Ocorre transmissão transtadiária no carrapato (Dagnone et al., 2001), mas não ocorre transmissão transovariana, por isso os estádios de ninfa e adulto são os mais importantes para a transmissão da doença e as larvas iniciam a transmissão após a ingestão do sangue de um animal infectado (Rikihisa, 1991). Os carrapatos inoculam os hemoparasitas no hospedeiro vertebrado, os corpos elementares são fagocitados pelas células mononucleares, onde se dividem e evoluem para corpúsculos iniciais. Os corpúsculos iniciais se multiplicam por divisão binária originando novos corpúsculos elementares que formam a mórula. A célula parasitada se rompe ou ocorre a exocitose da mórula, liberando os corpos elementares na

circulação sanguínea, que são, por sua vez, fagocitados por outras células, mantendo o ciclo (Ristic e Holland, 1993). A transmissão também pode ocorrer através da transfusão sanguínea de um animal cronicamente infectado para um animal sadio (Swango et al., 1989).

Após a inoculação, a *E. canis* apresenta tropismo por células da microvascularização de pulmões, rins e meninges (Harrus et al., 1997a). O período de incubação é de uma a três semanas (Rikihisa, 1991; Dagnone et al., 2001). As células infectadas interagem com as células reticuloendoteliais do fígado, baço e linfonodos, causando hiperplasia linfocítica e consequente aumento desses órgãos (Davoust, 1993). Ocorre interação entre as células mononucleares infectadas com as células endoteliais da microcirculação do animal, provocando vasculite e lesões endoteliais que podem resultar em coagulação intravascular disseminada (Harvey, 1998).

A erliquiose monocítica canina pode ser dividida em três fases: aguda, subclínica e crônica. A fase aguda corresponde à fase inicial da infecção. Inicia-se após o período de incubação (uma a três semanas) e tem duração de duas a quatro semanas (Harrus et al., 1999). Os sinais clínicos tendem a ser leves e inespecíficos, mas podem ser graves e até fatais. O animal que se encontra nessa fase pode apresentar letargia, depressão, anorexia, febre, perda de peso, desidratação, vômito, diarreia, uveíte e poliartrite. Outros achados clínicos

incluem esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenomegalia, mas pode ocorrer também, predisposição a hemorragias que variam desde a formação de petéquias até epistaxe (Harrus et al., 1999; Dagnone et al., 2001). Após essa fase o animal pode evoluir para a cura, caso apresente um sistema imune competente, ou para a fase subclínica (Waner e Harrus, 2000). Almosny (1998) observou mortalidade em 22,2% dos animais nessa fase, com progressão, dos demais pacientes, para a fase subclínica da infecção.

Durante a fase subclínica, há elevada titulação de anticorpos para *E. canis* e, embora os animais não apresentem sinais clínicos evidentes, infecções secundárias podem resultar no óbito do paciente (Codner e Farris-Smith, 1986). Harrus et al (1998) realizaram um estudo no qual foi observado que na fase subclínica da doença os parasitas se localizam no baço, destacando a importância deste órgão, uma vez que cães infectados não esplenectomizados apresentaram doença branda em comparação àqueles esplenectomizados. Essa fase pode durar vários anos, mas, de uma forma geral, animais imunocompetentes conseguem debelar a infecção (Waner et al., 1997). Animais que não eliminam a infecção evoluem para a fase crônica da doença (Hoskins, 1991).

A fase crônica pode variar de discreta a grave. Na forma grave ocorre exacerbação da sintomatologia clínica observada na fase aguda da infecção. Pode haver pancitopenia com anemia intensa por comprometimento da

medula óssea e maior destruição das hemácias na circulação, infecções associadas e hemorragias, além de hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia devido à estimulação antigênica causada pela *E. canis*, com formação de imunocomplexos que se acumulam podendo provocar glomerulonefrite. Quando observada em sua forma leve, a fase crônica da infecção por *E. canis* apresenta sinais inespecíficos como apatia, anorexia e perda de peso, mas com trombocitopenia evidente (Jain, 1993; Breitschwerdt, 2000). O óbito nessa fase da infecção ocorre devido a hemorragias ou infecções secundárias (Waner et al., 1997).

As alterações na coagulação sanguínea secundárias às infecções por *E. canis* são frequentes e estão associadas à coagulação intravascular disseminada ou trombocitopenia, com conseqüente predisposição à hemorragias (Almosny, 1998).

Shipov et al. (2008) avaliaram 40 animais positivos para *E. canis* e os principais sinais clínicos apresentados foram fraqueza, palidez das mucosas, febre, petéquias, taquipnéia, linfadenomegalia e esplenomegalia. Esse mesmo trabalho avaliou fatores prognósticos para cães infectados e concluiu que os pacientes com citopenias intensas e aumento no tempo de tromboplastina parcial ativada apresentaram maiores taxas de mortalidade.

As tetraciclina são consideradas as drogas mais eficazes para o tratamento da *Ehrlichia canis*. O tratamento para a erliquiose monocítica canina, mais utilizado no Brasil, consiste na

administração de doxiciclina, na dose de 10mg/kg, uma vez ao dia por 28 dias (Neer et al., 2002). As pesquisas com esse fármaco demonstraram melhora da sintomatologia clínica e dos aspectos hematológicos relacionados à infecção, no entanto, a eliminação do agente foi controversa (Wen et al., 1997; Breitschwerdt et al. 1998; Harrus et al., 1998b). Neer et al. (2002) relatou a permanência dessas bactérias em macrófagos do baço a partir da detecção do DNA, o que explica a resistência da infecção após o tratamento. Da mesma forma, o uso do cloranfenicol, resultou em melhora clínica, mas não foi capaz de eliminar a bactéria (Cohn, 2003). Outras drogas como o dipropionato de imidocarb e oxitetraciclina também são utilizados no tratamento (Almosny e Massard, 2002).

Anaplasma platys

A *A. platys* é encontrada na forma de mórula nas plaquetas do hospedeiro (Hoskins, 1991) e podem ser confundidas 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*. A transmissão da *A. platys* é feita pelo carrapato *R. sanguineus* (Inokuma et al., 2000). A transmissão através de transfusões sanguíneas, assim como para *E. canis*, também pode ocorrer (Souza et al., 2004). Sabe-se que esse microrganismo é capaz de infectar e se multiplicar nas plaquetas (Hoskins, 1991).

O período de incubação da infecção por *Anaplasma platys* e de oito a 15 dias. Após esse período, observa-se elevado número de plaquetas infectadas no sangue. Passados alguns dias, por razões ainda não elucidadas, ocorre trombocitopenia, que dura cerca de três a quatro dias, e esse ciclo ocorre a cada uma ou duas semanas (Inokuma et al., 2000). Durante a trombocitopenia observa-se redução da parasitemia e a contagem plaquetária retorna aos valores de normalidade após aproximadamente quatro dias (Harvey, 2006).

A fase aguda da doença apresenta sintomatologia inespecífica, que inclui linfadenomegalia, depressão, perda de peso, vômito, diarreia. Os animais podem apresentar, ainda, anemia, leucopenia, hiperplasia da linhagem megacariocítica na medula óssea e distúrbios hemostáticos (Dawson et al., 1991). Quando o quadro evolui para a fase crônica, a trombocitopenia intermitente torna-se constante e mais grave, podendo ser acompanhada por leucopenia e anemia (Dawson et al., 1991; Gasparini et al., 2008). Ocorre também diminuição do volume globular e da contagem de leucócitos, podendo haver ainda hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (Woody e Hoskins, 1991).

Em um estudo realizado no Paraná observou-se maior ocorrência de *A. platys* em relação a *E. canis* em amostras coletadas de animais, independente da sintomatologia clínica, sendo que em 5,47% dos casos ocorreu a coinfeção dessas duas bactérias (Silva et al., 2010). Witter

et al. (2013) encontraram resultados divergentes, 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.

O tratamento é realizado de forma semelhante ao realizado para as infecções por *E. canis*, com destaque para o uso de tetraciclinas (Dawson et al., 1991; Dagnone et al., 2002). No entanto, a localização intraplaquetária da *A. platys* pode comprometer a eficácia do tratamento (Dawson et al., 1991).

Babesia sp.

A *Babesia canis*, agente da babesiose canina, pertence ao filo Apicomplexa, classe Piroplasma, ordem Piroplasmida e família Babesiidae, sendo classificado morfológicamente como uma “grande babesia” (O’Dwyer, 1996). Microrganismos do gênero *Babesia* são protozoários intraeritrocitários. Os trofozoítos são observados no interior das hemácias, com diferentes formas (arredondada, piriforme ou elíptica), geralmente aos pares, no entanto podem ser encontrados quatro, oito ou mais na mesma hemácia (O’Dwyer, 1996).

A transmissão da *Babesia canis* ocorre através de carrapatos ixodídeos (Taboada, 1998). O vetor infectado inocula esporozoítos que se aderem às hemácias do hospedeiro e as invadem formando trofozoítos. Os trofozoítos sofrem

endogenia formando novos trofozoítos ou merogonia, formando os merozoítos. A multiplicação dos merozoítos, por divisão binária, pode resultar na lise das hemácias com infecção de novas células na circulação (Uilenberg, 2006). Os merozoítos podem se diferenciar em gametócitos femininos e masculinos que são ingeridos pelo carrapato durante o repasto sanguíneo. No vetor, apenas os gametócitos sobrevivem, ocorre esporogonia e formação de esporocinetos que podem, tanto se encaminhar para o ovário da fêmea, ou para as glândulas salivares do vetor. No ovário os esporocinetos invadem os ovos, ocorrendo transmissão transovariana, de forma que as larvas nascem infectadas. A transmissão transtadial no vetor também ocorre. Os esporocinetos que se encontram nas glândulas salivares evoluem para esporozoítos retornando ao início do ciclo (Urquhart et al., 1998).

A gravidade da infecção pode variar de leve até quadros de elevada morbidade e mortalidade associados à síndrome da resposta inflamatória sistêmica, distúrbios no sistema de coagulação e síndrome da disfunção múltipla dos órgãos (Rafaj et al., 2013). Fatores como idade, imunocompetência, doenças concomitantes e a espécie do patógeno envolvida estão diretamente relacionados com a evolução dessa doença (Irwin e Hutchinson, 1991). A patogenia da *Babesia* está relacionada principalmente à hemólise intra e extravascular. Existem diferenças na patologia das diferentes subespécies de *Babesia canis*, principalmente em relação à ocorrência de anemia hemolítica

imunomediada, com destruição de hemácias não parasitadas devido ao contato com antígenos do parasita (Uilenberg et al., 1989). A hemólise devido à multiplicação do hemoparasita dentro das hemácias ocorre em todas as espécies e essa lise provoca a liberação de mediadores inflamatórios que podem causar vasodilatação e diminuição da pressão arterial (O'Dwyer e Massard, 2002). Essa lise também provoca a liberação de hemoglobina na circulação com consequente hemoglobinemia associada com hemoglobinúria e bilirrubinemia. A sobrecarga hepática e o aumento da formação de bilirrubina conjugada podem resultar em aumento da produção de bile, distensão da vesícula biliar e icterícia (O'Dwyer e Massard, 2002). Ocorre hepatoesplenomegalia devido à hiperplasia do sistema mononuclear fagocítico, congestão hepática e esplênica (Nelson, 2001). A maioria dos sinais clínicos é resultante da resposta inflamatória do hospedeiro, mas podem ser secundárias a ações diretas do parasita no corpo do animal (Rafaj et al., 2013).

A manifestação clínica da babesiose canina depende de inúmeros fatores, que incluem a patogenicidade da cepa infectante, intensidade da parasitemia, idade e resposta imune do hospedeiro (Irwin e Hutchinson, 1991). Existe uma grande variedade de sinais clínicos que os cães infectados podem desenvolver e a doença pode se apresentar na forma hiperaguda, aguda, crônica ou subclínica (Lobetti, 1998). A forma hiperaguda da babesiose geralmente ocorre em filhotes e causa doença grave com reposta inflamatória intensa, podendo cursar com

choque endotóxico, coagulação intravascular disseminada, icterícia e até sinais neurológicos (Dacey et al., 2001). Na forma aguda da babesiose os sinais clínicos incluem palidez de mucosas, icterícia, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, febre, perda de apetite e depressão (Abdullahi et al., 1990). A forma crônica (ou subclínica) geralmente ocorre em cães que conseguiram debelar a infecção aguda, mas que continuam como portadores do hemoparasita. Esses animais podem apresentar episódios de reagudização da doença devido à ocorrência de doenças concomitantes ou situações de estresse e imunossupressão, com quadros de apatia, prostração, perda de apetite, febre intermitente, anemia e fraqueza (Breitschwerdt et al., 1983).

Poucas drogas se mostraram eficazes na eliminação do parasita e os animais que sobrevivem à crise aguda de hemólise desenvolvem imunidade criando um equilíbrio com a presença do parasita, mas podem ter a infecção reagudizada em episódios de imunodeficiência (Taboada e Lobetti, 2006). O tratamento mais eficaz para infecções pelo patógeno *Babesia canis* é realizado com a administração, por via subcutânea, de dipropionato de imidocarb, na dose de 5 mg/kg, repetido após 14 dias (Taboada, 1998). Em filhotes, no qual não é recomendado o uso desse medicamento pode ser utilizado o aceturato de diaminazeno, na dose de 3,5 mg/kg, administrado por via subcutânea, em dose única (Taboada 1998).

Leishmania sp.

O principal agente da LVC no Brasil é o protozoário *Leishmania chagasi* (ou *L. infantum* no Velho Mundo), mas existem várias outras espécies que infectam homens e animais em todo o mundo (Grimaldi e Tesh, 1993).

A LVC é transmitida por mosquitos hematófagos denominados flebotomíneos. No Brasil, o principal vetor é o *Lutzomia longipalpis*, conhecido como mosquito palha. Ao realizarem o repasto sanguíneo em animais infectados, as fêmeas ingerem a forma amastigota do parasita, presente no interior dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Grimaldi e Tesh, 1993). No hospedeiro invertebrado a *Leishmania sp.* assume a forma promastigota metacíclica, que é inoculada durante o repasto em outro animal, completando assim o ciclo (Killick-Kendrick, 2002). A transfusão sanguínea de animais infectados para não infectados é outra forma de transmissão do agente (Owens et al., 2001). Foi encontrado DNA de *Leishmania sp.* em sêmen de cães infectados, sugerindo transmissão venérea do protozoário (Diniz et al., 2005).

A patogenia da LVC inicia-se quando um macrófago realiza a fagocitose do agente após a inoculação pelo vetor. O protozoário se multiplica, na forma amastigota, no interior do macrófago, que se rompe, liberando o parasita que é então capaz de infectar outras células. O parasita migra para o sistema linfático do hospedeiro e estabelece uma infecção generalizada, mas uma proporção significativa

dos cães pode permanecer assintomática, de acordo com a resposta imune contra o parasita (Baneth, 2006). Durante a infecção, ocorre estímulo humoral, com conseqüente aumento da população de linfócitos B, mas com diminuição dos linfócitos T. Ocorre então, um excesso de produção de imunoglobulinas, que se ligam ao agente, mas não são capazes de neutralizá-lo, resultando em acúmulo dessas proteínas em vários órgãos, relevante na patogenia da doença e desenvolvimento dos sinais clínicos associados à LVC (Koutinas et al., 1999). A redução dos linfócitos T compromete a capacidade do sistema imunológico de eliminar o parasita, que se multiplica no hospedeiro provocando maiores prejuízos à saúde do animal (Taboada e Merchant, 1995).

Os achados clínicos da LVC são variáveis, como conseqüência dos numerosos mecanismos patogênicos e de resposta imune envolvidos na enfermidade (Solbach e Laskay, 2000). Os relatos científicos das alterações clínicas costumam dividir os pacientes em sintomáticos, oligosintomáticos e assintomáticos. Neste formato são incluídos, no primeiro grupo, os animais com mais de três sinais clínicos característicos da leishmaniose e no segundo grupo aqueles que apresentam de um a três sinais, que incluem linfadenomegalia, perda de peso, alterações dermatológicas, onicogribose, blefarite, conjuntivite, epistaxe, esplenomegalia, estomatite ulcerativa e poliartrite (Mylonakis et al., 2005). Mylonakis et al. (2005) relataram que os sinais clínicos mais comuns em cães sintomáticos são linfadenomegalia (91%),

atrofia da musculatura da mastigação (81%), condição corporal ruim (69%), hiperqueratose nasodigital (69%), dermatite esfoliativa (59%) e blefarite (56%), enquanto Gomes et al. (2007) relataram, como sinais mais comuns, a dermatite esfoliativa, linfadenomegalia, perda de peso, claudicação, anorexia, febre e palidez de mucosas. Segundo Francino et al. (2006), o diagnóstico da leishmaniose nas áreas endêmicas é um grande desafio, não só pelas manifestações clínicas não específicas, mas também devido à alta prevalência de soropositividade em cães sub-clínicos ou assintomáticos.

Alterações laboratoriais nas henoparasitoses

Na infecção por *E. canis*, observa-se anemia, principalmente normocítica normocrômica (Siarkou et al., 2007; César, 2008; Nakaghi et al., 2008; Shipov et al., 2008; Manoel, 2010), leucopenia (Swango et al., 1989; Almosny, 1998; Shipov et al., 2008) e trombocitopenia (Almosny, 1998; Swango et al., 1989; Siarkou et al., 2007; César, 2008; Nakaghi et al., 2008; Shipov et al., 2008; Ueno et al., 2009; Manoel, 2010). Quando associados, caracterizando pancitopenia, decorrem da hipoplasia medular na fase crônica da infecção, no entanto, pode ocorrer também na fase aguda. Nessa fase, a anemia pode estar relacionada à redução da eritropoiese ou reações de hipersensibilidade do tipo II, que podem provocar destruição e fagocitose das hemácias por monócitos/macrófagos. A leucopenia também é

resultado de mecanismos imunológicos, sendo que 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 contagem diferencial dos leucócitos de cães infectados pela *E. canis* observa-se, linfopenia e eosinopenia em 50% dos animais (Waddle e Littman, 1988). A monocitose é um achado inconstante na erliquiose monocítica canina (Harrus et al., 1998b), mas pode ocorrer, também, monocitopenia, conforme relatado por Siarkou et al. (2007), em cães com diagnóstico molecular de *E. canis*. No entanto, monócitos ativados e linfócitos atípicos podem ser observados devido à intensa atividade imune desses animais (Harrus et al., 1998b). Desvio nuclear de neutrófilos para a esquerda pode ser observado em animais infectados (Waddle e Littman, 1988; Moreira et al., 2003; Waldemarin et al., 2003). A trombocitopenia causada pela *E. canis* pode decorrer também de diversos mecanismos, não necessariamente relacionados à hipoplasia medular, com destaque para aumento do consumo, destruição imunomediada, diminuição da meia vida ou sequestro esplênico (Smith et al., 1974; Harrus et al., 1999; Bulla et al., 2004). Na fase aguda da erliquiose monocítica canina pode ocorrer, inclusive hiperplasia megacariocítica na medula óssea evidenciando o aumento da destruição e redução da meia vida plaquetária (Boudreaux, 2000). No entanto, aproximadamente um terço dos animais infectados não apresentam trombocitopenia, isso pode ser explicado por

diferenças na destruição das plaquetas, virulência da cepa da bactéria e estágio da doença (Kuehn e Gaunt, 1985) Almosny (1998) não observou trombocitopenia em cães inoculados experimentalmente nas primeiras 14 semanas de infecção. Na fase subclínica, 50% dos pacientes não apresentam alterações nos valores hematológicos, no entanto, pode ocorrer trombocitopenia, anemia discreta arregenerativa e respostas leucocitárias variáveis, que incluem leucopenia, monocitose e linfocitose (Codner e Farris-Smith, 1986; Wadle e Littman, 1988; Troy e Forester, 1990).

Em um estudo realizado em Uberlândia por Borin et al. (2009) foram analisados exames de sangue de 204 animais, com diagnóstico parasitológico de *Ehrlichia sp.*, e 58,2% apresentavam anemia normocrômica, 67% desvio nuclear de neutrófilos para a esquerda e 58,1% dos animais apresentaram eosinopenia.

Na infecção por *E. canis*, ocorrem também alterações nas proteínas plasmáticas. Na fase crônica da infecção ocorre hiperglobulinemia, principalmente monoclonal, e hipoalbuminemia. Esses achados se relacionam à problemas nutricionais (inapetência, perda de apetite), edema secundário à vasculite e doença renal ou hepática associadas (Woody e Dumbar Junior, 1982).

Em relação à bioquímica sérica pode ocorrer um aumento de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), decorrente das lesões hepáticas

provocadas pela infecção por *Ehrlichia canis* (Almosny, 1998). O aumento de FA, também pode ocorrer devido ao estresse sistêmico causado pelo parasita ou doenças concomitantes (Kaneko et al., 1997). Na fase aguda da doença pode ocorrer aumento nos valores de uréia, creatinina e fósforo devido a uma azotemia pré-renal (Hoskins, 1991), que pode se agravar na fase crônica (Almosny e Massard, 2002). Os animais podem ser positivos para o teste de Coombs, que detecta anticorpos para antígenos de hemácias aumentando sua destruição (Moreira et al., 2003).

Associando os achados hematológicos à mortalidade na erliquiose monocítica canina, Shipov et al. (2008) relataram, para os animais que resistiram ao tratamento com doxiciclina, contagens médias de leucócitos, hemácias e plaquetas de 9.880 céls/ μ L, 4.380.000 céls/ μ L e 110.500 céls/ μ L, respectivamente, enquanto as médias para os mesmos tipos celulares, foi 1.880 céls/ μ L, 2.580.000 céls/ μ L e 76.800 céls/ μ L, respectivamente, naqueles que vieram à óbito. Em estudo semelhante, César (2008) relatou, nos animais sobreviventes, médias de contagens de leucócitos, hemácias e plaquetas de 8.900 céls/ μ L, 5.100.000 céls/ μ L e 94.700 céls/ μ L, respectivamente, enquanto as médias dos mesmos tipos celulares nos animais que foram a óbito foram de 3.800céls/ μ L, 3.100.000céls/ μ L e 86.000céls/ μ L, respectivamente.

Bulla et al. (2004) relataram positividade em PCR para *E. canis* em 63,1% , 21,0% e 1,4%

dos cães com contagens plaquetárias inferiores a 100.000/ μ L, entre 100.000 e 200.000/ μ L e maior que 200.000/ μ L, respectivamente. Utilizando o critério de contagens plaquetárias inferiores a 200.000/ μ L para trombocitopênicos, a positividade em PCR foi de 45,2%. Através do diagnóstico molecular, Dagnone et al. (2003) relataram positividade de apenas 20% para cães trombocitopênicos de Londrina no Paraná. Em cães trombocitopênicos e não trombocitopênicos do Rio de Janeiro, Macieira et al. (2005) relataram 26,8% e 3,5% de positividade para *E. canis*, respectivamente. No entanto, Santos et al. (2009) observaram taxas mais elevadas de infecção (66,3% dos animais trombocitopênicos e 33,7% dos animais não trombocitopênicos) em cães da região de Ribeirão Preto, SP, enquanto César (2010) observou trombocitopenia em 76,9% dos cães diagnosticados com erliquiose monocítica canina, na cidade de São Paulo.

Acetta (2008) observou, através do diagnóstico molecular que os animais trombocitopênicos infectados por *E. canis* e/ou *A. platys*, apresentaram anemia arregenerativa, leucocitose em 33,3% dos casos e leucopenia em 9,5%. Na contagem diferencial dos leucócitos observou monocitose (60,7%), neutrofilia (27,4%), linfopenia (22,6%), linfocitose (17,9%) e neutropenia (4,8%).

A trombocitopenia causada pelo *A. platys* é cíclica e intermitente na fase aguda da infecção, podendo tornar-se persistente, na fase crônica (Harrus et al., 1997; Inokuma et al., 2000). O

estímulo à liberação de plaquetas jovens favorece o aparecimento de macroplaquetas na circulação (Harrus et al., 1997). A medula óssea de cães infectados pode estar normal ou hiperproliferativa, podendo ocorrer hiperplasia megacariocítica na fase aguda da doença. Pode ocorrer também diminuição da agregação plaquetária e plaquetas ativadas na circulação (Gaunt et al., 1990). Anemia normocítica normocrômica pode ser encontrada, sendo descrita como semelhante à anemia da doença inflamatória. Diminuição da relação mielóide/eritróide na medula óssea também foi descrita, além de hipoalbuminemia e hipocalcemia (Baker et al., 1987) Pode ocorrer hipergamaglobulinemia com aumento de IgA e IgG e diminuição da capacidade de fixação do ferro (Almosny e Massard 2002).

O animal infectado com *B. canis* pode apresentar anemia hemolítica predominantemente regenerativa com a presença de reticulócitos, metarrubricitos, policromasia e anisocitose (Breitschwerdt et al., 1983; Abdullahi et al., 1990). Também pode ocorrer trombocitopenia pela destruição imunomediada, pelo aumento do consumo devido à vasculite provocada pelo agente ou sequestro esplênico. A resposta leucocitária, assim como na maioria das hemoparasitoses, é extremamente variável, podendo ocorrer leucocitose e leucopenia (Taboada, 1998). Na babesiose hiperaguda, pode-se observar leucocitose com neutrofilia (Abdullahi et al., 1990), mas também leucopenia com neutropenia e linfopenia. Nos casos crônicos, normalmente

observa-se neutropenia discreta com linfocitose (Kagiwara e Holzchuh, 1987). Na babesiose canina, pode se observar alterações nas análises bioquímicas como a hiperbilirrubinemia, principalmente na forma aguda da infecção, hipoalbuminemia e aumento das enzimas hepáticas. Na urinálise pode se observar a ocorrência de bilirrubinúria e hemoglobinúria, secundárias à hemólise extra e intravascular (Brandão e Hagiwara, 2002).

Vasconcelos (2010) observou que os achados mais frequentes de animais infectados por *Babesia sp.* foram monocitose (86,0%), trombocitopenia (62,8%), anemia (60,5%), hiperproteinemia plasmática (32,6%), eosinofilia (32,55%), basofilia (18,6%), linfocitose (18,6%) e leucocitose (14,0%).

A LVC pode causar hipoplasia medular com diminuição principalmente de precursores da série mielóide (Tafari, 1995). A hipoplasia medular encontra-se associada ao aumento da sintomatologia clínica em animais infectados, conforme descrito por Amusatogui et al. (2003).

Como achados hematológicos em animais infectados podem-se observar, com frequência, anemia normocítica normocrômica (arregenerativa), associada à hipoplasia medular, inflamação crônica, doença renal crônica (deficiência de eritropoetina) ou mesmo possíveis sangramentos (Koutinas et al., 1999). A resposta de leucócitos é variável, podendo ocorrer leucopenia, com maior frequência, mas também leucocitose. Em cães sintomáticos e sorologicamente positivos para LVC, Medeiros

et al. (2008) observaram como principais alterações hematológicas: anemia (60% dos casos), trombocitopenia (59%), linfopenia (35%) e monocitose (19%).

Na bioquímica sérica de cães com LVC ocorre aumento das enzimas hepáticas em apenas 16% dos animais (Ciaramella 1997). Azotemia pode ser observada em até 45% dos animais, mas apenas 38% apresentam aumento no nível sérico de creatinina (Slappendel e Greene, 1990). A proteinúria é a alteração mais frequente na urinálise dos cães infectados (Koutinas et al., 1999). Além de anemia em 72% dos casos, Mylonakis et al. (2005), citaram ainda hiperglobulinemia (78%), hiperproteinemia (59%) e proteinúria (50%) como os achados na patologia clínica mais comuns na LVC.

Métodos diagnósticos

Para a realização do diagnóstico dessas hemoparasitoses, é necessária a associação dos sinais clínicos com os resultados de exames complementares hematológicos, parasitológicos, sorológicos, moleculares e bioquímicos.

Parasitológico

Esse método apresenta alta especificidade, no entanto, menor sensibilidade, uma vez que os microrganismos podem não ser visualizados, devido à reduzida parasitemia (Dagnone et al., 2001). Geralmente, quadros agudos ou hiperagudos com elevada parasitemia apresentam maior sensibilidade neste exame (Almosny e Massard, 2002).

Nos casos de infecção por *E. canis*, podemos observar, em esfregaço sanguíneo ou na capa leucocitária, estruturas basofílicas classificadas como mórulas em leucócitos. O esfregaço de sangue periférico deve ser confeccionado com a primeira gota, pois nesta existe maior concentração de leucócitos facilitando a visualização das mórulas (Almosny, 1998). Essa visualização ocorre mais comumente em linfócitos do que em monócitos, podendo raramente ser observada em eosinófilos e neutrófilos (Almosny, 1998). Em um estudo realizado por Moreira et al. (2005), dois cães foram inoculados experimentalmente com *E. canis* e acompanhados com observações de esfregaço sanguíneo e aspirados de medula óssea. Na fase aguda da infecção, apenas uma mórula foi encontrada, em cada animal, no exame de esfregaço sanguíneo, enquanto no aspirado de medula foram encontradas várias mórulas em monoblastos e em monócitos maduros. Isso demonstra que aspirados de medula podem ser utilizados na pesquisa direta de *Ehrlichia canis* na fase aguda.

A *A. platys* pode ser observada em plaquetas nas fases de alta parasitemia, no entanto, essa fase não coincide com os períodos de trombocitopenia característicos dessa infecção. Na fase aguda da doença, as mórulas são mais facilmente encontradas, mas devem ser diferenciadas de condensações plaquetárias (Harvey, 2006).

A *Babesia canis*, considerada uma grande babesia, pode ser visualizada na forma de

merozoítos (arredondados, piriformes ou elípticos) dentro das hemácias. Geralmente, são identificados aos pares, mas existem relatos de mais de oito trofozoítos na mesma hemácia (O'Dwyer, 1996). Durante a fase aguda da babesiose a alta parasitemia proporciona facilidade na visualização e diagnóstico do parasita, mas em animais que se encontram na fase crônica da infecção a sensibilidade desse teste diminui (Vercammen et al., 1996). Em um estudo realizado em Salvador, foram avaliados 7243 animais, dos quais, 33,95% foram positivos para *Babesia spp* a partir da pesquisa direta em esfregaço sanguíneo. Esse resultado dentre outros, determina a importância da realização do diagnóstico direto em casos de suspeita de babesiose (Ungar de Sá et. al., 2007).

No caso do diagnóstico da leishmaniose visceral canina a visualização direta das formas amastigotas no animal pode ser feita em sangue periférico, medula óssea, fragmentos de pele e linfonodos do animal infectado. Em cães assintomáticos esse método não é muito eficiente, sendo mais difícil a visualização do parasita (Alvar et al., 2004). O parasita, visualizado em material corado com Giemsa, apresenta citoplasma azulado, com núcleo relativamente grande em vermelho apresentando uma haste denominada cinetoplasto (Bravo et al., 1993). Utilizando o PCR como teste ouro, Saridomichelakis et al. (2005) pesquisaram a sensibilidade e especificidade de exames citológicos no diagnóstico da leishmaniose. Observaram, em animais sintomáticos,

sensibilidade de 92,6%, 88,2% e 94,7% para pesquisa de formas amastigotas em linfonodo, medula óssea e linfonodo e/ou medula óssea, respectivamente. Em animais assintomáticos mas com resultado positivo para leishmaniose pelo PCR observou-se sensibilidade de 25,8%, 14,6% e 27,6% para os mesmos órgãos. Em investigação semelhante, Moreira et al. (2007) relataram sensibilidade de 75,6%, 32,0% e 39,1% em pesquisa citológica de linfonodos de cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente. Mylonakis et al. (2005), descrevem uma sensibilidade de 96,9% e 25,0% para cães sintomáticos e assintomáticos, respectivamente. Saridomichelakis et al.(2005), Mylonakis et al. (2005) e Moreira et al. (2007) relataram ainda especificidade de 100% no exame citológico, independente do órgão investigado.

Sorologia

O teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é o mais utilizado para a confirmação do diagnóstico da erliquiose monocítica canina. Ele detecta anticorpos anti-*Ehrlichia* desde o sétimo dia após a infecção até 15 a 30 meses. No entanto, esse é um fator negativo do teste, pois os anticorpos ainda circulantes de uma infecção antiga podem emitir resultado de uma infecção que já foi debelada (Perrile e Matus, 1991). Esse teste também não diferencia anticorpos de diferentes espécies do gênero *Ehrlichia*, pela semelhança existente entre elas (Rikihisu, 1991).

O imunoensaio enzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) também pode ser utilizado como método diagnóstico para *E. canis*, apresentando maior sensibilidade quando comparado ao RIFI (Oliveira et al., 2000; Harrus et al., 2002).

A realização de testes sorológicos para a detecção do *A. platys* pode resultar em reação cruzada com *A. phagocitophilum*, agente da anaplasmose em bovinos e anaplasmose granulocítica humana, o que interfere no diagnóstico desses agentes (Ferreira et al., 2008).

Para a *Babesia canis*, assim como para a *E. canis*, pode-se obter, em testes sorológicos, resultados positivos para cães que conseguiram combater a infecção. Os testes sorológicos utilizados são o RIFI e o ELISA, mas existem relatos de reações cruzadas com outros hemoparasitas (Maia, 2005).

Os exames sorológicos para o diagnóstico da LVC são amplamente utilizados, com destaque para RIFI e ELISA. Pode ocorrer baixa sensibilidade em animais que possuem o parasita, mas encontram-se assintomáticos (Oliva et al., 2006). Para um diagnóstico definitivo, exames moleculares devem ser utilizados para confirmação da presença de *Leishmania sp.* (Campino, 2002).

Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction, PCR)

A PCR é uma técnica extremamente sensível, pois detecta o material genético do microrganismo. A extração do material genético para a realização do teste pode ser feita através de amostras de sangue, mas também a partir de aspirados de medula óssea e baço. A utilização da PCR é de difícil implementação na rotina diagnóstica, devido ao alto custo desse exame (Neer et al., 2002).

No caso de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, esse exame apresenta resultado positivo de quatro a 10 dias após a infecção, com elevada sensibilidade e especificidade. Pode ser utilizado para controle da eficácia do tratamento, devendo ser repetido quinze dias após o término do tratamento (Neer et al., 2002). Quando o tratamento é interrompido ou suspeita-se de resistência do microrganismo ao medicamento, a PCR deve ser feito a partir de aspirados do baço, medula óssea ou linfonodo, localizações em que a bactéria permanece quando desenvolve resistência (Harrus et al., 2004).

Bulla et. al (2004), utilizaram a técnica da PCR para o diagnóstico de erliquiose monocítica canina nos animais atendidos em Botucatu, SP. O agente foi detectado em 84,1% e 1,4%, dos animais que apresentavam-se trombocitopênicos ou com a contagem de plaquetas normal, respectivamente. Entretanto, um estudo realizado no Rio de Janeiro, observou que apenas 32,1% dos casos de animais trombocitopênicos foram positivos para *E. canis* (Macieira et al., 2005). Esses resultados

divergentes demonstram, que a trombocitopenia não deve ser considerada, isoladamente, para o diagnóstico da erliquiose monocítica canina.

A PCR não pode ser considerado um teste ouro para a detecção da *E. canis*. Diversos estudos demonstraram diferentes níveis de sensibilidade e especificidade, de acordo com a metodologia utilizada para a realização desse teste. A sensibilidade depende do material utilizado, da quantidade de DNA extraído, da cepa e da quantidade de microrganismos existentes no material extraído (Baneth et al., 2009). Deve-se associá-los com a clínica e exames laboratoriais para o diagnóstico definitivo.

No caso da *Babesia canis*, a PCR pode ser útil para detectar animais em fase crônica da infecção devido a baixa parasitemia que dificulta outros métodos diagnósticos (Macintire et al., 2002). Os métodos moleculares são necessários para diferenciar suas três subespécies, sendo importantes devido à diferenças relacionadas à patogenicidade e gravidade da infecção (Inokuma et al., 2004)

A PCR pode ser utilizada para o diagnóstico da LVC a partir de amostras de sangue, medula óssea, aspirados de linfonodo, pele, líquidos cavitários e outros órgãos, sendo que pele, medula óssea, baço e linfonodo apresentam maior sensibilidade e especificidade (Solano-Gallego et al., 2009). Pode ser realizado o PCR convencional, nested-PCR e PCR em tempo real, para a detecção das diferentes espécies de *Leishmania sp.*, sendo essa última capaz de

detectar o protozoário quantitativamente (Francino et al., 2006).

Segundo Manna et al. (2004), o diagnóstico por PCR é mais sensível do que a imunofluorescência direta na detecção da leishmaniose em cães sintomáticos, com

positividade de 99%, 94% e 95% em amostras de linfonodo, sangue e pele, respectivamente. Já Moreira et al. (2007) relataram sensibilidade no PCR de 100%, 96% e 96% em amostras de linfonodos de cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais

Participaram desse estudo cães de raças e idades variadas. Os animais foram provenientes de três locais: da rotina clínica no Hospital Veterinário da UFMG, do projeto de castração AGHA, realizado pela Escola de Veterinária da UFMG e de um canil comercial localizado na região norte de Belo Horizonte. Com exceção dos animais provenientes do projeto de castração AGHA, todos apresentavam suspeita clínica de hemoparasitose.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo n° 175/2010). Os tutores dos animais que participaram do experimento assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Anexo 1) atestando ciência dos termos do estudo e autorizando a participação.

Coleta

3,0 mL de sangue, foram obtidos a partir de punção da veia jugular ou cefálica, com armazenamento, sob refrigeração, por no máximo 24 horas, em tubos estéreis contendo

EDTA e tubos estéreis contendo ativador de coagulação. Após as análises hematológicas e bioquímicas as amostras de sangue total e medula óssea em EDTA foram mantidas congeladas para realização do diagnóstico molecular.

A punção de medula óssea, a partir do osso esternal, foi realizada, mediante anestesia local com lidocaína, sem vaso constritor, com posterior punção, utilizando agulha 40x12. O material obtido foi depositado em lâmina de vidro, para a confecção da lâmina pela técnica do esmagamento (“squash”). Após a secagem do material, foi utilizada a coloração de Romanowski (Panótico¹) com posterior avaliação em microscopia óptica. O restante do material coletado da medula óssea foi colocado imediatamente em tubos estéreis, contendo EDTA, e congelados para posterior análise molecular.

Processamento das amostras

Diagnóstico molecular

Amostras congeladas de sangue e medula óssea, em tubos contendo EDTA, foram utilizadas para o diagnóstico molecular de hemoparasitas, pela técnica da PCR.

O DNA das amostras congeladas foi extraído através do reagente para purificação de DNA (Ilustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit²). O produto da extração foi dosado quanto a sua concentração no aparelho *NanoDrop*® ND-1000 por espectrofotometria.

¹ Panótico Rápido LB®, Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil.

² Ilustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit®, GE Healthcare, São Paulo, São Paulo, Brasil.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o kit para PCR Gotaq Flexi DNA Polymerase 500U³, sendo nested-PCR para identificação de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* (após reação comum para *Ehrlichia spp.*), semi-nested-PCR para a identificação de *Babesia canis canis* (após reação para *Babesia spp.*) e PCR simples para identificação de *Leishmania sp.*

A nested-PCR para diagnóstico de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* consistiu, inicialmente na realização, de uma primeira reação para *Ehrlichia sp.*, utilizando-se 3µl de cada amostra de DNA extraído, 9,55 µl de água miliqué, 5µl de solução tampão, 5µl de MgCl₂, 0,5µl de dNTP (solução contendo as bases nitrogenadas adenina, timina, citosina e guanina) e 2,5µl dos oligonucleotídeos iniciadores (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3', senso e 5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3', antisenso), totalizando uma mistura para reação de 25µl, para cada amostra, submetida ao seguinte programa no termociclador: 94°C por três minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por um minuto, 60°C por um minuto e 72°C por um minuto, para finalmente ser mantido a 72°C por cinco minutos. A segunda reação (nested-PCR), contendo os iniciadores de *Ehrlichia canis* (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA A-3', senso e 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3', antisenso) ou *Anaplasma platys* (5'-TTTTTGTCGGAGCTTGCTATGATA-3',

senso e 5'-TGTGGGTACCGTCATTATCTTCCCCA-3', antisenso), envolve a mesma quantidade dos reagentes da primeira reação, mas ao invés de 3µl da amostra de DNA, é acrescentado 1µl do produto da primeira amplificação, totalizando uma mistura para reação de 23µl, que foi submetida ao mesmo ciclo anterior, no termociclador (Bulla et al., 2004).

No diagnóstico de *Babesia canis canis* a primeira reação é idêntica à utilizada para *Ehrlichia sp.*, substituindo apenas os iniciadores para aqueles referentes à *Babesia sp.* (5'-GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC-3', senso e 5'-ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA-3', antisenso). A segunda reação (semi-nested-PCR) é idêntica à primeira, no entanto, inclui os iniciadores específicos para *Babesia canis canis* (5'-ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA-3', senso e 5'-TGCGTTGACGGTTTGACC-3', antisenso) e apenas 1µl do produto da amplificação para *Babesia sp.* (Birkenheuer et al., 2003). As duas reações utilizam a mesma programação no termociclador, conforme utilizado para *Ehrlichia spp.*

Para o diagnóstico de *Leishmania sp.*, utilizou-se 23µL do PCR Supermix (Invitrogen)⁴ que contém os reagentes necessários para a reação (água, dNTP, MgCl₂, tampão e TAQ polymerase) acrescido de 1 µL do DNA extraído das amostras e 0,5µL de cada oligonucleotídeo iniciador, específicos para este

³ PCR Gotaq Flexi DNA Polymerase 500U®, Promega, São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁴ PCR Supermix, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil.

agente (5'-CTTTTCTGGTCCCGGGTAGG-3', sentido e 5'CCACCTGGCCTATTTACACCA-3', antisenso), totalizando 25µL de volume para a reação. A programação no termociclador consistiu em 94°C por quatro minutos, seguido de 49 ciclos de 94° por 30 segundos, 59° por 30 segundos, 72° por 30 segundos e, para finalizar a fase final de extensão do DNA, 72° por 10 minutos (Diniz et al., 2005).

Os produtos da amplificação foram separados a partir da eletroforese em gel de agarose 2%, a 110v e amperagem livre, por cerca de 60-70 minutos, utilizando 10µL de cada solução após amplificação. O produto gerado pelos pares de oligonucleotídeos iniciadores deve apresentar 478pb para *Ehrlichia sp.*, 389pb para *Ehrlichia canis*, 384pb para *Anaplasma platys* (Bulla et al., 2004), 340pb para *Babesia sp.*, 198pb para *Babesia canis canis* (Birkenheuer et al., 2003) e 145pb para *Leishmania sp.* (Diniz et al., 2005). Todas as reações foram conduzidas utilizando um controle negativo (água miliquê) e um controle positivo (DNA de cada microorganismo).

Hemograma

O hemograma foi realizado, a partir do sangue armazenado em tubos contendo EDTA, em Analisador Hematológico Veterinário Abacus⁵ pelo método de impedância, que fornece a contagem automática de leucócitos totais,

⁵ Analisador Hematológico Veterinário Abacus, Diatron, São Paulo, São Paulo, Brasil.

hemácias, plaquetas, concentração de hemoglobina e valores de VCM, CHCM, HCM, RDW. O volume globular foi avaliado, também, pelo micro-hematócrito, centrifugado por cinco minutos à 10000 rpm para comparação com o resultado automático. A contagem diferencial de leucócitos, realizada a partir da contagem de 100 células, e a análise citomorfológica foi realizada em microscopia óptica, em objetivas de 20X, 40X e 100x, utilizando esfregaços sanguíneos corados em Panótico. Contagens plaquetárias automáticas que não se encontram no valor de normalidade foram conferidas a partir da observação em lâmina contando-se a média em dez campos de 100X, com posterior multiplicação por 20000. Os valores de referência seguem Jain (1993).

Perfil bioquímico

O perfil bioquímico foi realizado, a partir do soro obtido após a centrifugação do sangue armazenado em tubos contendo ativador de coagulação, em Analisador Bioquímico Cobas Mira⁶. As análises bioquímicas, utilizando kits comerciais da Synermed, incluíram proteína total e frações, pelo método colorimétrico, creatinina, pelo método cinético, uréia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), pelo método enzimático. Os valores de referência seguem Kaneko et al. (1997).

⁶ Analisador Bioquímico Cobas Mira, Roche, São Paulo, São Paulo, Brasil.

*Avaliação citológica da medula óssea
(mielograma)*

As lâminas de medula óssea foram submetidas à secagem ao ar e posteriormente coradas em Panótico, para avaliação em microscopia óptica, em objetivas de 20X, 40X e 100X. O exame citológico (mielograma) teve início na identificação macroscópica de espículas ou partículas na lâmina, que em quantidade inadequada indicam hipocelularidade ou coleta mal sucedida, impedindo a continuidade do exame. Amostras adequadas foram avaliadas quanto à celularidade (relação células/gordura), concentração de megacariócitos e reservas de ferro. A contagem diferencial dos tipos celulares foi realizada em uma média de 500 células por amostra e incluiu a avaliação detalhada da morfologia celular e presença de microrganismos. Os valores de referência seguem Jain (1993) e Harvey (2001).

CAPÍTULO 1

Alterações hematológicas de sangue e medula óssea em animais infectados por *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp.*

RESUMO

Hemoparasitoses são doenças de elevada prevalência e importância na clínica de pequenos animais, resultando em uma grande variedade de alterações hematológicas, de acordo com o perfil infeccioso, imunidade do hospedeiro e fase da infecção. Esse estudo teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas de sangue e medula óssea em cães naturalmente infectados por hemoparasitas, e diagnosticados pela técnica da PCR, para um ou mais agentes etiológicos. Coinfecções por hemoparasitas são relativamente comuns em cães, ocorrendo em 42,9% (27/63) dos animais estudados. As alterações patoclínicas, agravadas nas coinfecções, incluíram anemia (85,7%), trombocitopenia (57,1%) e resposta variável de leucócitos, sendo a monocitopenia e linfopenia, mais frequentes que a monocitose e linfocitose.

Palavras-chave: Cães, hemoparasitoses, erliquiose, anemia, trombocitopenia.

ABSTRACT

Hemoparasitoses presents high prevalence and importance in small animal clinical, resulting in a variety of haematological disorders, according to the infectious profile, host immunity and stage of infection. This study has the objective to evaluate the hematological changes in blood and bone marrow in dogs naturally infected by

hemoparasites and diagnosed by PCR for one or more aetiological agents. Hemoparasites coinfections are relatively common in dogs, occurring in 42.9% (27/63) of the animals studied. Pato-clinical changes, worsened in coinfections, included anemia (85.7%), thrombocytopenia (57.1%) and variable response of leukocytes, with monocytopenia and lymphopenia more frequent than monocytosis and lymphocytosis.

Key-words: Dogs, hemoparasitoses, erliquiosis, anemia, thrombocytopenia.

INTRODUÇÃO

Hemoparasitoses são doenças de elevada prevalência e importância na clínica de pequenos animais, com destaque, no Brasil, para aquelas provocadas pelos agentes *Ehrlichia canis* (erliquiose monocítica canina), *Anaplasma platys* (anaplasmose), *Babesia canis* (babesiose) e *Leishmania sp.* Com exceção da *Leishmania sp.*, transmitida por flebotomíneos, os outros agentes são transmitidos, principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Monteiro et al., 1994; Dagnone et al., 2001). A *Leishmania* do complexo *donovani*, representa uma zoonose de grande importância (Monteiro et al., 1994).

Essas hemoparasitoses podem causar diversas alterações hematológicas nos animais infectados. Os animais infectados por *Ehrlichia canis* podem apresentar trombocitopenia, anemia e leucopenia (Moreira et al., 2003). No caso de infecções por *Anaplasma platys*, pode ocorrer anemia moderada e quedas temporárias no valor total de leucócitos, além de variações cíclicas na contagem de plaquetas (Harvey, 1998). Os animais acometidos por *Babesia canis* podem desenvolver anemia discreta a grave, reticulocitose, policromasia, macrocitose, linfocitose discreta dependendo de sua forma aguda ou crônica (Stockham e Scott, 2011). As infecções por *Leishmania chagasi* podem resultar em anemia, resposta variável de leucócitos com linfopenia e trombocitopenia (Baneth, 2006).

O diagnóstico dessas infecções exige exames complementares, mas o diagnóstico baseado apenas nas alterações clínicas, bioquímicas e hematológicas pode se tornar desafiador. Em alguns casos pode ser necessária a utilização de métodos auxiliares, com destaque para a pesquisa direta, testes sorológicos e moleculares (Dagnone et al., 2001).

Esse estudo teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas de sangue e medula óssea em cães naturalmente infectados por hemoparasitas, e diagnosticados pela técnica da PCR, para um ou mais agentes etiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos nesse estudo, avaliações hematológicas de sangue e medula óssea de 63 cães, de raças e idades variadas, com diagnóstico molecular de uma ou mais das seguintes hemoparasitoses: *Ehrlichia sp*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp*. (Tabela 1), provenientes, da rotina clínica no Hospital Veterinário da UFMG, do projeto de castração AGHA, realizado pela Escola de Veterinária da UFMG e de um canil comercial localizado na região norte de Belo Horizonte. Com exceção dos animais provenientes do projeto de castração AGHA, todos apresentavam suspeita clínica de hemoparasitose.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em que cada animal representou uma unidade experimental ou repetição e cada perfil infeccioso, considerando infecções isoladas ou associadas por hemoparasitas, representou uma parcela.

O perfil infeccioso e o número de animais e amostras obtidos em cada grupo encontram-se dispostos na Tabela 1.

Os dados foram analisados de forma descritiva, no entanto, nos grupos com $n > 6$ (infecções por *E.canis*, *A. platys* e coinfeção por *E. canis* e *A. platys*), foi possível aplicar a inferência estatística.

Os valores obtidos no hemograma e contagem diferencial dos tipos celulares na medula óssea foram testados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade.

As respostas que apresentaram distribuição normal de probabilidades e homogênea de variâncias (volume globular (VG), hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de eosinófilos) foram submetidas à análise de variância, teste de Fisher e, quando mais de dois grupos foram comparados, pós-teste de Tukey. As respostas que não atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade (mielograma, contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), red cell distribution width (RDW), contagem de plaquetas, contagem global de leucócitos e diferencial de neutrófilos bastonetes e segmentados, monócitos, linfócitos e basófilos) foram analisadas por métodos não-paramétricos, incluindo os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, quando mais de dois grupos foram comparados.

O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar diferenças, entre as parcelas, na dispersão de frequência da ocorrência de alterações nos parâmetros laboratoriais e na avaliação morfológica das células no hemograma e mielograma.

Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos animais incluídos nesse estudo 57,1% (36/63) apresentaram infecção por um único parasita, e 42,9% (27/63) apresentaram coinfeções, conforme disposto na Tabela 1. 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). Caeiros (2012) observou que 57,1% dos animais positivos para *Babesia canis* apresentavam infecções concomitantes, resultado similar ao encontrado nesse estudo em que 66,6% (3,4) dos casos de *Babesia canis canis* apresentaram coinfeção por outro hemoparasita.

Quatro cães apresentaram resultado positivo para o agente *Ehrlichia sp.* no PCR, mas com resultado negativo na nested-PCR para *Ehrlichia canis*. Isso pode ser explicado pela primeira reação conseguir detectar a presença do gênero da bactéria, podendo esses animais apresentar infecção por outra espécie do gênero *Ehrlichia* à exemplo da *E. risticii* e *E. ewingii*, que podem infectar naturalmente os cães.

Tabela 1 – Perfil infeccioso e número de animais e amostras obtidas em cada grupo.

Grupo / Infecção	Número de animais	Hemograma	Mielograma
1 / <i>Ehrlichia sp.</i>	4 (6,35%)	4	0
2 / <i>Ehrlichia canis</i>	18 (28,57%)	17	10
3 / <i>Anaplasma platys</i>	7 (11,11%)	7	4
4 / <i>Babesia canis canis</i>	3 (4,76%)	3	1
5 / <i>Leishmania sp.</i>	4 (6,35%)	4	0
6 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Anaplasma platys</i>	12 (19,04%)	12	10
7 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Babesia canis canis</i>	2 (3,18%)	2	2
8 / <i>Anaplasma platys</i> + <i>Babesia canis canis</i>	2 (3,18%)	2	1
9 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Anaplasma platys</i> + <i>Babesia canis canis</i>	2 (3,18%)	2	1
10 / <i>Ehrlichia sp.</i> + <i>Leishmania sp.</i>	2 (3,18%)	2	0
11 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Leishmania sp.</i>	3 (4,76%)	3	3
12 / <i>Anaplasma platys</i> + <i>Leishmania sp.</i>	2 (3,18%)	2	1
13 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Anaplasma platys</i> + <i>Leishmania sp.</i>	2 (3,18%)	2	2
Total	63	62	35

A Tabela 2 indica a média e o desvio padrão obtidos para os valores hematológicos nos diferentes grupos. As alterações observadas na avaliação morfológica das hemácias encontram-se dispostas na Tabela 3.

A anemia é caracterizada por diminuição nos valores de hemácias, volume globular e/ou hemoglobina no eritrograma (Stockham e Scott, 201) 85,7% (54/63) dos animais apresentaram anemia, sendo que 57,4% (31/54) apresentaram infecções isoladas e 42,6% (23/54) coinfeções.

Dos animais infectados por *Ehrlichia sp.* (grupo 1) dois (50%) apresentaram-se anêmicos, sendo que um deles apresentou volume globular de 20%, com volume corpuscular médio aumentado, porém sem visualização de alterações relacionadas às hemácias no esfregaço sanguíneo. Anemia foi um achado

comum em cães com *Ehrlichia sp.* em Uberlândia, no interior de Minas Gerais (82,3%)

(Borin et al.,2009), corroborado por diversos outros autores (Moreira et al., 2003; Woody e Hoskins, 1991; Dagnone et al., 2003)

Todos os animais infectados por *E. canis* (grupo 2) apresentaram anemia, o que pode ser explicado pelo reduzido número de animais quando comparado a outros estudos e pelo perfil da população estudada. Os animais deste grupo apresentaram média de VG de 30%, e todos eles apresentaram uma ou mais das características que permitiram a caracterização da anemia. Manoel (2010) encontrou média de VG similar (28,8%), mas resultados superiores de hemácias e hemoglobina. Em apenas 11,8% dos animais a anemia foi classificada como normocítica normocrômica diferente do observado por outros autores que encontraram maior ocorrência desse tipo de anemia (Albernaz et al.,2007; Almosny, 1998). 47,1% apresentaram alterações na morfologia das hemácias indicando alguma forma de regeneração da

medula óssea e 23,5% apresentaram anemia macrocítica hipocrômica, caracterizando anemia regenerativa. Esses dados podem ser explicados pela diferença no estágio da doença em que o animal possa se encontrar (Harrus et al., 1997a). A anemia causada pela *E. canis*, decorre de inúmeros mecanismos distintos, com destaque para a ação do sistema monocítico-fagocitário, lise celular pela ação do complemento e supressão da medula óssea do animal infectado (Moreira et al., 2003).

85,7% (6/7) dos cães infectados por *A. platys* (grupo 3) apresentaram anemia, sendo que classificada como macrocítica hipocrômica em três animais, resultado diferente do encontrado por Silva (2011) que não observou correlação entre essa infecção e ocorrência de anemia. Harrus et al. (1997c) estudaram cinco casos de cães infectados por esse agente e encontraram quatro cães anêmicos e nenhum deles apresentava alterações no esfregaço sanguíneo relacionadas à regeneração, assim como esse estudo, que encontrou apenas hemácias em rouleaux como alteração morfológica.

Foi encontrada diminuição nos valores de hemácias, VG e/ou hemoglobina nos três animais infectados isoladamente por *B. canis canis* (grupo 4), com média de $4,2 \times 10^6/\mu\text{l}$, 32% e 9,2g/dL respectivamente. Um desses animais apresentou VG de 20% e valores muito abaixo do normal de hemoglobina e hemácias, o que pode ter influenciado na média, devido à pequena quantidade de animais nesse grupo. Esse mesmo animal foi o único a ter alterações

nas hemácias indicando regeneração, visualizadas no esfregaço sanguíneo, que pode ser um indício de anemia hemolítica provocada pelo hemoparasita (Lobetti, 1998). Vasconcelos (2010) observou que 60% dos animais positivos para *Babesia sp.* apresentaram anemia e Berzina et al. (2013) encontraram anemia em todos os três animais avaliados que apresentavam infecção por *Babesia canis canis*. Carli et al. (2009) detectaram 24 cães com *Babesia canis canis* diagnosticada através de biologia molecular e apenas dois deles não apresentaram anemia.

75% (3/4) dos cães infectados por *Leishmania sp.* (grupo 5) apresentaram-se anêmicos, todos com valores de VCM normais e dois com CHCM abaixo dos valores de referência. A média dos valores de hemácias, hemoglobina e volume globular estavam abaixo dos valores de referência, no entanto, para os índices hematimétricos, as médias encontravam-se dentro dos valores normais. Apenas um dos animais apresentou mais de uma alteração indicativa de regeneração em hemácias, esses dados indicam predomínio de anemia normocítica normocrômica nos animais infectados. Moura (2013) observou que 90% dos animais positivos para *Leishmania sp.* apresentaram-se anêmicos e Dias (2008) observou que anemia era o achado mais frequente no hemograma de cães infectados, sendo na maioria das vezes arregenerativa, assim como no presente estudo. A anemia causada pela *Leishmania sp.* pode ser consequência de diversas causas como anemia

da doença inflamatória, perdas sanguíneas, sequestro esplênico e hipoplasia ou aplasia de medula óssea por ação direta ou indireta do parasita (Koutinas et al., 1999; De Luna et al., 2000).

Os animais coinfectados por *E. canis* e *A. platys* (grupo 6) apresentaram alta frequência de anemia, observada em 96,6% dos casos. As médias dos índices observados para classificação de anemia, nesse grupo, estavam abaixo dos valores de referência. Quatro dos animais anêmicos apresentaram anemia macrocítica hipocrômica, indicando regeneração da medula óssea. Sousa et al. (2009) relataram dois cães com coinfecção por esses agentes, nos quais foi observada anemia normocítica hipocrômica. No entanto os dois animais apresentavam co-morbididades graves como fratura exposta e tumor venéreo transmissível que podem ter influenciado nos resultados.

Assarasakorn e Niwetpathomwat (2007) observaram que ocorreu anemia normocítica normocrômica com valores de hematócrito, hemácias e hemoglobina inferiores aos valores de referência para a espécie em animais coinfectados com *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, fato também observado em um animal avaliado por Klag et al. (1991) e em apenas um animal neste estudo, com anemia discreta, sem sinais de regeneração.

Cortese et al. (2011) observaram anemia em 30% dos animais coinfectados por *Leishmania sp.* e *E. canis*, no presente estudo todos os animais com esse perfil (grupo 11)

apresentaram anemia discreta à moderada, sendo classificada como macrocítica hipocrômica em dois cães. Entretanto, um animal que apresentava coinfecção entre *A. platys* e *Leishmania sp.* (grupo 12) apresentou VG de 12%, demonstrando anemia intensa, classificada como normocítica hipocrômica, com aumento de RDW e visualização de 13% de metarrubricitos, policromasia e anisocitose com predomínio de macrocitose, demonstrando sinais intensos de regeneração medular.

As alterações morfológicas mais comumente identificadas nos animais parasitados, nesse estudo, em relação à hemácias foram rouleaux, anisocitose e hipocromasia, devido à estimulação antigênica e regeneração medular (Harve, 1998).

Foi possível utilizar testes estatísticos para comparação das médias obtidas em cada variável do hemograma nos animais presentes nos grupos infectados por *E. canis* (grupo 2), *A. platys* (grupo 3) e coinfectados por *E. canis* e *A. platys* (grupo 6). Observou-se diferença nas médias obtidas para VG (Fisher e Tukey, $p < 0,04$) e número de hemácias (Kruskall-Wallis e Dunns, $p < 0,03$) com médias inferiores para os animais infectados por *E. canis*, em relação àqueles infectados apenas por *A. platys*. Silva (2012) encontrou relação entre a infecção por *E. canis* e anemia mas não obteve essa correlação quando testou a infecção por *A. platys*, o que concorda com os dados do presente estudo. Não foram encontradas diferenças estatísticas nos outros valores do eritrograma entre os grupos

citados. O grupo que apresentava coinfeção não demonstrou agravamento nas alterações do eritrograma, com valores médios superiores à daqueles infectados por *E. canis*, mas inferior àqueles obtidos para o grupo infectado por *A. platys*, que segue em discordância às informações descritas na literatura (Harvey, 1998).

As alterações observadas no plaquetograma e avaliação morfológica das plaquetas encontram-se dispostas na Tabela 4.

A avaliação da contagem de plaquetas tem sido proposta com um método inicial de triagem para o diagnóstico de hemoparasitoses em cães (Bulla, et al., 2004; Greene, 2006). Trombocitopenia foi observada em 57,1% dos animais (36/63). A presença de macroplaquetas sugere uma aceleração na produção plaquetária pela medula óssea (Jain, 1993).

Os animais com infecção por *Ehrlichia sp.* (grupo 1) apresentaram trombocitopenia (50%) e macroplaquetas (50%) tendo como média 242.500 plaquetas/ μ L de sangue. Acetta (2008) encontrou trombocitopenia em 100% dos animais que apresentaram infecção por *Ehrlichia sp.* com uma média consideravelmente inferior à desse estudo (105.390 plaquetas/ μ L de sangue), enquanto Albernaz et al. (2007) descreveram a ocorrência de trombocitopenia em 76,7% dos animais infectados com uma média 140.000 plaquetas/ μ L.

Ocorreu trombocitopenia em 70,6% dos animais infectados por *E. canis* (grupo 2), que tiveram a média de 125.764 plaquetas/ μ L. Essa elevada ocorrência corrobora os resultados obtidos por Dagnone et al. (2003), Bulla et al. (2004), Macieira et al. (2005) e Nakaghi et al. (2008). A média encontrada nesse estudo foi similar a publicada por Manoel (2010). No presente estudo 53% dos animais infectados por *E. canis* apresentaram trombocitopenia com concentrações menores que 100.000 plaquetas/ μ L. Foram visualizados 70,6% e 5,9% de macroplaquetas e microagregados plaquetários respectivamente. Macroplaquetas também foram visualizadas por Harrus et al. (1997a). A primeira alteração visualizada por Almosny (1998) em cães experimentalmente infectados com esse parasita foi a presença de macroplaquetas seguidas por plaquetas ativadas circulantes, na fase aguda da infecção., apesar de não terem sido observadas trombocitopenias intensas.

Apenas um animal infectado por *A. platys* (grupo 3) apresentou-se trombocitopênico e o grupo dessa infecção apresentou média de 280.571 plaquetas/ μ L, o que vai de encontro aos resultados obtidos por Harrus et al. (1997c), Brown et al. (2006) e Little (2010). A trombocitopenia provocada pela *A. platys* é cíclica, o que pode justificar os resultados obtidos nesse estudo. A cronificação da doença, entretanto, pode resultar em agravamento e persistência da trombocitopenia, devido à lenta resolução do processo (Harrus et al., 1997c; Woody e Hoskins, 1991). A detecção de

macroplaquetas, em 71,4% desses pacientes, pode ser justificada por uma resposta medular a uma trombocitopenia anterior, conforme observado por Harrus et al. (1997c).

Trombocitopenia é o achado mais comum da Babesiose (Matijatko et al., 2007; Furlanello et al., 2005). No entanto, nos três animais infectados por *B. canis canis* (grupo 4), apenas um apresentou trombocitopenia e a média do grupo foi de 203.333 plaquetas/ μ L. No estudo conduzido por Vasconcelos (2010), obteve-se uma média 175.750 plaquetas/ μ L em animais infectados por *Babesia sp.* Schetters et al. (2009) observaram diminuição significativa na contagem de plaquetas após a infecção experimental de *B. canis*.

75% (3/4) dos animais infectados por *Leishmania sp.* (grupo 5) apresentaram trombocitopenia, associada à detecção de macroplaquetas na avaliação morfológica das plaquetas. A média na contagem plaquetária foi de 154.500 plaquetas/ μ L. Em um estudo realizado em Brasília foi encontrada trombocitopenia em 31% e 50% dos animais assintomáticos e sintomáticos portadores de LVC, respectivamente (Dias, 2008). Freitas et al. (2012) observaram média similar entre os animais sintomáticos e assintomáticos e os dois grupos apresentaram média superior ao valor de referência.

Dos animais que apresentaram coinfeção por *A. platys* e *E. canis* (grupo 6), 83,3% estavam trombocitopênicos e esse grupo apresentou média de 163.167 plaquetas/ μ L, média superior

à encontrada na infecção apenas por *E. canis*. Isso pode ser explicado de acordo com a fase de infecção que cada animal estava e na ocorrência da trombocitopenia cíclica descrita pela infecção por *A. platys*. 58,3% dos cães neste grupo apresentaram macroplaquetas. Coinfecções por esses agentes são comuns (Breitschwerdt, 2000), mas diferindo deste estudo, geralmente resultam em agravamento da trombocitopenia existente, conforme observado por Breitschwerdt (2000), Moreira et al. (2010) e Little (2010).

A coinfeção entre *E. canis* e *B. canis* (grupo 7) pode provocar trombocitopenia, conforme observado por Klag et al. (1991) e nos dois animais deste grupo.

Os cães coinfectados por *A. platys* e *B. canis canis* (grupo 8) não apresentaram trombocitopenia, mas um dos animais apresentou trombocitose, resposta medular que pode ser influenciada pela trombocitopenia cíclica. Os animais coinfectados por *Ehrlichia sp.* e *Leishmania sp.* (grupo 10) não apresentaram aumento ou diminuição na concentração das plaquetas no sangue, mas apresentaram macroplaquetas, provavelmente associadas à regeneração medular (Jain, 1993).

A inferência estatística entre os grupos 2, 3 e 6 permitiu a identificação de diferenças na contagem de plaquetas (Kruskall-Wallis e Dunns, $p < 0,01$) entre as infecções por *E. canis* e *A. platys*, sendo que a média do grupo 2 foi inferior a do grupo 3, provavelmente

relacionado à maior patogenicidade da *E. canis* (Hoskins, 1991).

As alterações observadas no leucograma e avaliação morfológica dos leucócitos encontram-se dispostas na Tabela 5.

A contagem global de leucócitos nas hemoparasitoses é variável, podendo apresentar leucopenia e leucocitose, dependendo do estágio em que a doença se encontra (Almosny e Massard, 2002). Não foram encontradas alterações na concentração de leucócitos nos animais infectados por *Ehrlichia sp.* (grupo 1). Albernaz et al. (2007) observaram que 89% dos animais avaliados com a mesma infecção também não apresentaram alterações nessa resposta. Na contagem diferencial, observou-se linfopenia (25%) e eosinofilia (50%), sem desvio nuclear dos neutrófilos, o que difere dos resultados encontrados por Borin et al. (2009) que observaram desvio à esquerda dos neutrófilos (67%) e eosinopenia (58%). Mendonça et al. (2005) observaram leucopenia e linfopenia em 24,7% e 22%, respectivamente, dos animais. Foram encontrados monócitos ativados e linfócitos reativos em 50% dos cães deste grupo, que podem ser indicativos de infecção sistêmica crônica (Stockham e Scott, 2011), apesar de não terem sido associados à leucopenia.

No grupo 2 (infecção por *E. canis*), o valor médio obtido para os leucócitos totais e na contagem diferencial, apresentou-se dentro dos valores de referência para a espécie. Dos animais infectados, 11,8% apresentaram

leucopenia e o mesmo percentual apresentou leucocitose, 29,4% apresentaram linfopenia associado à eosinopenia que são característicos da fase aguda de infecção ou à imunossupressão (Jain, 1993). Mylonaskis et al. (2010) relataram que linfopenia é comum nas infecções crônicas causadas por *E. canis* mas que pode ocorrer, também, linfocitose. Harrus et al. (1997a) estudaram 100 cães infectados naturalmente por *Ehrlichia canis*, observando leucopenia e linfopenia em 37% e 50%, respectivamente. Monocitopenia (11,8%) e neutrofilia (17,7%) também foram encontrados nesses animais (Harrus et al., 1997a). Foram encontradas alterações morfológicas nos leucócitos com indícios de doença inflamatória em 41,2% dos animais. Almosny (1998) encontrou reatividade linfocitária entre a segunda e sétima semana de infecção caracterizada pela intensa resposta imune do hospedeiro, além de ativação dos monócitos observados e sinais de eritrofagia. Em 23,5% dos animais foram encontrados basófilos e desvio nuclear de neutrófilos à esquerda (17,7%), ambos relatados por Xavier (2001) indicando processo infeccioso/inflamatório crônico, que é comum na erliquiose (Thrall, 2004).

No grupo 3, infectado por *A. platys*, a média dos valores de leucócitos totais e do diferencial estavam dentro dos valores de referência. 28,6% dos animais apresentaram leucocitose, com ocorrência de monocitose (1/7), linfocitose (2/7) e monocitose (2/7). Monocitose é um dos principais achados laboratoriais associados à essa infecção, observada em 60% (3/5) dos

animais estudados por Harrus et al. (1997c), sendo que um deles apresentou também leucocitose. No entanto, leucopenia também foi relatada por Woody e Hoskins (1991) e Little (2010).

Todos os valores das médias na contagem global de leucócitos e na contagem diferencial estavam dentro dos valores de referência para animais infectados por *B. canis canis* (grupo 4), e apenas uma animal apresentou leucopenia discreta. Kucer et al. (2008) encontraram valores dentro da referência para a média de leucócitos, neutrófilos e linfócitos em cães com essa infecção, no entanto, Furlanello et al. (2005) encontraram 69% de leucopenia.

Nenhum animal positivo para infecção isolada por *Leishmania sp.* (grupo 5) apresentou alteração na contagem global de leucócitos. Linfopenia associado com eosinopenia foram encontrados em 75% dos animais, corroborando com os achados de Paludo et al. (2007), que encontrou 50% de linfopenia.

Os animais coinfectedados com *A. platys* e *Leishmania sp.* (grupo 12) apresentaram leucocitose com neutrofilia, além de alterações morfológicas nos leucócitos. Um dos animais apresentou monocitose e eosinofilia. Geralmente a infecção por *A. platys* é associada à leucopenia, mas nesses casos, a associação à LVC pode ter resultado em infecções bacterianas secundárias com conseqüente leucocitose (Amusatogui et al., 2003).

Os dois cães coinfectedados por *E. canis*, *A. platys* e *Leishmania sp.* (grupo 13), apresentaram leucopenia, sendo que essa foi considerada intensa em um dos casos, associada à pancitopenia. Leucopenia intensa foi observada também em um animal do grupo 11 (coinfecção por *E. canis* e *Leishmania sp.*). Essa leucopenia, em infecções associadas à LVC podem ocorrer devido à migração leucocitária para sítios inflamatórios e possível bloqueio de maturação na medula óssea devido ao acometimento desse órgão (Alvar et al., 2004).

A inferência estatística nos grupos 2, 3 e 6 demonstrou diferenças nos valores médios obtidos para a contagem diferencial de linfócitos (Kruskall-Wallis e Dunns, $p < 0,01$), com médias superiores nos cães que apresentaram coinfecção por *E. canis* e *A. platys*, em relação aqueles infectados apenas por *E. canis*. Acetta (2008) observou linfocitose em 17,9% dos animais infectados por *Ehrlichia sp.* e/ou *Anaplasma platys*, identificando mórulas em plaquetas ou leucócitos mas sem correlacionar cada perfil infeccioso, separadamente, aos resultados hematológicos.

Em uma avaliação geral, foram identificadas maiores alterações, no hemograma, nos grupos 1, 9 e 13, que envolveram a infecção por *E. canis*, com destaque para o grupo 13, que apresentou coinfecção por *E. canis*, *A. platys* e *Leishmania sp.* Esses resultados podem ser justificados pela maior patogenicidade de *E. canis*, mas também pelo agravamento nas coinfecções.

Os animais infectados por *E. canis* (grupo 2) apresentaram alterações em relação à celularidade da medula, sendo que duas (20%) e quatro (40%) apresentaram-se com a celularidade aumentada e diminuída, respectivamente. Medulas hipercelulares são mais encontradas em infecções agudas e hipocelulares nas crônicas (Waddle e Littman, 1988). Em um animal em que foi observada hipercelularidade, o número de megacariócitos também estava aumentado, reiterando ainda mais a possibilidade de infecção aguda (Jain, 1993). Moreira et al. (2007) observaram aumento na relação mielóide/eritróide (M:E) em cães infectados, que ocorreu em 30% dos animais nesse estudo, mas nenhum apresentou essa relação diminuída. Todos os animais apresentaram aumento em algum dos precursores mielóides anteriores aos neutrófilos bastonetes, sendo que 50% e 40% dos animais apresentaram diminuição de bastonetes e neutrófilos segmentados, respectivamente. Em um animal em que foi observada leucocitose, a concentração de neutrófilos segmentados na medula óssea estava diminuída, provavelmente relacionada ao consumo do compartimento de reserva, secundário à infecção crônica.

Foi encontrado aumento de eosinófilos, macrófagos e linfócitos em 20% dos animais não sendo necessariamente associadas no mesmo animal. Linfócitos e plasmócitos foram encontrados em concentração aumentada na medula óssea por Harrus et al. (1999). Não foi encontrada plasmocitose em nenhuma das medulas avaliadas nos casos de infecção por *E.*

canis, o que vai de encontro ao observado por Hoskins (1991) e Breitschwerdt (1995).

Nos cães infectados por *Leishmania sp.* (grupo 5) foi possível avaliar apenas a celularidade, concentração de megacariócitos e concentração de ferro, devido à qualidade do material coletado. A única alteração observada nesses parâmetros foi a diminuição da celularidade, causada pela ação nociva direta ou indireta do parasita, corroborada por Prata e Silva (2005), Koutinas et al. (1999) e Tafuri et al. (2001), Amusatogui et al. (2003) observaram associação entre a sintomatologia clínica do animal infectado e a diminuição da celularidade da medula óssea.

Em 11 medulas avaliadas em animais coinfectados com *E. canis* e *A. platys* (grupo 6), três apresentaram hiperplasia e três hipoplasia, podendo evidenciar diferentes fases de infecção (Hoskins, 1991). Ocorreu 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 (Mendonça et al., 2005) e é uma ocorrência comum em processos inflamatórios (Stockham e Scott, 2011). Todos os animais desse grupo apresentaram aumento de alguma das células precursoras mielóides, mas 80% apresentaram também diminuição na concentração de neutrófilos bastonetes.

Um animal coinfestado por *E. canis* e *Leishmania sp.* (grupo 10) apresentou leucopenia intensa, mieloblastos não foram visualizados e neutrófilos bastonetes estavam diminuídos. A concentração de ferro nas partículas estava diminuída e apresentava anemia normocítica normocrômica, indicando hipoplasia medular (Jain, 1993)

A inferência estatística, utilizando-se os grupos 2, 3 e 6, permitiu a identificação de diferenças quanto à celularidade (Kruskall-Wallis e Dunns, $p < 0,03$) com menor celularidade no grupo infectado por *A. platys* (61%), em relação àquele que apresentou coinfeção por *E. canis* e *A. platys* (73%).

Tabela 2 – Média e desvio-padrão obtidos para os valores hematológicos, em cães, nos 13 grupos estudados, de acordo com o perfil infeccioso.

	1/ (<i>Ehrlichia</i> <i>sp.</i>)	2/ (<i>E. canis</i>)	3/ (<i>A. platys</i>)	4/ (<i>B. canis canis</i>)	5/ (<i>Leishmania sp.</i>)	6/ (<i>E. canis+A. platys</i>)	7/ (<i>E. canis+B. canis canis</i>)	8/ (<i>A. platys+B. canis canis</i>)	9/ (<i>E. canis+A. platys+B. canis canis</i>)	10/ (<i>Ehrlichia sp.+Leishmania sp.</i>)	11/ (<i>E. canis+Leishmania sp.</i>)	12/ (<i>A. platys+Leishmania sp.</i>)	13/ (<i>E. canis+A. platys+B. canis canis</i>)	Valores de referência (Jain, 1993)
Volume globular (%)	38,5 ± 12,1	30,2 ± 6,4	37,7 ± 4,5	32,0 ± 8,5	34,3 ± 9,3	33,5 ± 6,2	41,0 ± 5,0	28,5 ± 16,5	28,0 ± 9,0	39,5 ± 6,5	31,3 ± 2,6	26,5 ± 3,5	22,5 ± 1,5	37-55
Hemoglobina (g/dL)	11,5 ± 3,3	9,4 ± 2,2	11,2 ± 1,1	9,2 ± 2,9	11,0 ± 3,1	10,1 ± 1,9	12,7 ± 0,9	7,8 ± 5,0	9,1 ± 3,8	12,3 ± 1,9	9,9 ± 0,8	9,2 ± 1,6	7,3 ± 0,7	12-18
Hemácias (x10⁶ céls/μL)	5,4 ± 1,8	4,0 ± 0,9	5,1 ± 0,7	4,2 ± 1,2	4,9 ± 3,1	4,6 ± 1,9	5,3 ± 0,9	3,9 ± 2,4	3,6 ± 1,3	5,0 ± 1,2	4,0 ± 0,2	3,6 ± 0,7	3,0 ± 0,3	5,5-8,5
VCM (fL)	72,0 ± 3,4	76,0 ± 4,5	74,1 ± 5,8	76,9 ± 5,2	68,9 ± 4,6	73,5 ± 5,6	78,0 ± 4,4	74,0 ± 2,4	78,8 ± 3,4	80,0 ± 5,3	79,3 ± 4,6	74,7 ± 4,7	76,1 ± 2,5	60-77
CHCM (g/dL)	30,3 ± 1,9	30,9 ± 2,1	29,8 ± 1,9	28,1 ± 2,1	31,9 ± 0,5	30,3 ± 1,3	32,0 ± 1,7	25,8 ± 2,5	31,2 ± 3,4	31,1 ± 0,4	31,6 ± 0,3	34,0 ± 1,0	31,7 ± 0,3	32-36
HCM (g/dL)	21,9 ± 2,4	23,5 ± 1,8	22,1 ± 2,0	22,0 ± 3,1	22,1 ± 1,8	22,3 ± 2,3	24,4 ± 2,8	19,2 ± 1,1	24,4 ± 1,6	24,9 ± 2,0	25,2 ± 1,2	25,7 ± 0,5	24,5 ± 0,3	19,5-24,5
RDW (%)	12,4 ± 0,9	13,3 ± 1,1	12,8 ± 0,8	13,2 ± 0,7	13,5 ± 1,3	13,4 ± 1,3	12,5 ± 0,6	14,3 ± 1,6	12,8 ± 0,3	12,9 ± 0,5	13,1 ± 0,9	14,5 ± 2,5	13,6 ± 0,5	12-15
Leucócitos totais (céls/μL)	13540,0 ± 3319,6	10187,7 ± 5906,0	12945,7 ± 4691,1	7281,0 ± 1709,3	9882,5 ± 2320,4	10691,7 ± 6438,1	11265,0 ± 2935,0	8434,0 ± 2174,0	5540,0 ± 3850,0	12650,0 ± 1650,0	7400,0 ± 4172,7	22750,0 ± 50,0	5265,0 ± 375,0	6000-17000
Bastonetes (céls/μL)	0 ± 0	438,1 ± 1115,4	0 ± 0	32 ± 45,3	0 ± 0	48,0 ± 159,2	0 ± 0	0 ± 0	34,0 ± 34,0	0 ± 0	0 ± 0	227,0 ± 227,0	338,0 ± 169,0	0-300
Segmentados (céls/μL)	7650,8 ± 735,7	6998,0 ± 5352,5	8696,0 ± 4890,5	5033,3 ± 1679,2	8382,0 ± 1851,3	6096,8 ± 4896,3	5791,5 ± 1876,5	6962,0 ± 2267,0	2860,5 ± 1271,5	9691,0 ± 539,0	5353,7 ± 3193,6	16715,5 ± 2579,5	3307,5 ± 471,5	3000-11500
Eosinófilos (céls/μL)	2077,0 ± 1825,0	556,1 ± 630,5	806,7 ± 452,3	512,7 ± 302,4	117,0 ± 114,5	945,1 ± 744,1	1993,5 ± 5,5	284,5 ± 33,5	281,5 ± 281,5	412,5 ± 302,5	448,7 ± 220,7	1482,0 ± 1482,0	56,5 ± 56,5	100-1250
Basófilos (céls/μL)	0 ± 0	47,7 ± 78,6	20,4 ± 50,0	0 ± 0	24,0 ± 41,6	31,3 ± 69,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	38,7 ± 54,7	570,0 ± 570,0	0 ± 0	Raros
Linfócitos (céls/μL)	2958,3 ± 327,8	1549,1 ± 630,5	2688,4 ± 1770,0	1262,0 ± 429,6	713,8 ± 447,5	3291,8 ± 1813,8	3100,0 ± 1018,0	997,5 ± 254,5	2300,5 ± 2300,5	2436,5 ± 1996,5	1372,0 ± 692,3	2733,0 ± 1371,0	1542,0 ± 414,0	1000-4800
Monócitos (céls/μL)	854,1 ± 327,8	391,4 ± 313,5	734,3 ± 606,4	441,0 ± 328,5	665,3 ± 303,6	331,5 ± 233,8	379,5 ± 46,5	190,5 ± 127,5	64,0 ± 30,0	110,0 ± 110,0	186,7 ± 128,3	1022,5 ± 566,5	190,0 ± 92,0	150-1350
Plaquetas (x10³ céls/μL)	242,5 ± 134,1	125,8 ± 81,0	280,6 ± 126,0	280,6 ± 126,0	280,6 ± 126,0	280,6 ± 126,0	98,0 ± 80,0	472,0 ± 180,0	110,5 ± 100,5	300,5 ± 5,5	264,3 ± 130,3	239,5 ± 77,5	50,0 ± 36,0	200-500

VCM – Volume corpuscular médio, CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média, HCM – Hemoglobina corpuscular média, RDW - *red blood cell distribution width* (amplitude da variação dos eritrócitos).

Diferenças significativas para o volume globular (p<0,04), número de hemácias (p<0,03) e plaquetas (p<0,01), entre os grupos 2 e 3, e número de linfócitos (p<0,01) entre os grupos 2 e 6.

Tabela 3 – Número e porcentagem de cães, que apresentaram alterações na avaliação morfológica das hemácias, nos 13 grupos estudados, conforme o perfil infeccioso.

	1/ (<i>Ehrlichia</i> <i>sp.</i>)	2/ (<i>E. canis</i>)	3/ (<i>A. platys</i>)	4/ (<i>B. canis canis</i>)	5/ (<i>Leishmania sp.</i>)	6/ (<i>E. canis+A. platys</i>)	7/ (<i>E. canis+B. canis canis</i>)	8/ (<i>A. platys+B. canis canis</i>)	9/ (<i>E. canis+A. platys+B. canis canis</i>)	10/ (<i>Ehrlichia sp.+Leishmania sp.</i>)	11/ (<i>E. canis+Leishmania sp.</i>)	12/ (<i>A. platys+Leishmania sp.</i>)	13/ (<i>E. canis+A. platys+B. canis canis</i>)
Rouleaux	0/4 (0%)	7/15 (41,2%)	2/7 (28,56%)	1/3 (33,3%)	2/4 (50%)	4/12 (33,3%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
Policromasia	0/4 (0%)	2/15 (11,8%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	2/4 (50%)	1/12 (8,3%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
Hipocromasia	0/4 (0%)	5/15 (29,4%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	1/4 (25%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/3 (33,33%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
Macrocitose	0/4 (0%)	1/15 (5,9%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	1/4 (25%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/3 (33,33%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Anisocitose	0/4 (0%)	3/15 (17,7%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	1/4 (25%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/3 (0%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
Poiquilocitose	0/4 (0%)	1/15 (5,9%)	0/7 (0%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	1/12 (8,33%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/3 (33,33%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
Copúsculos de HowellJolly	1/4 (25%)	0/15 (0%)	0/7 (0%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)
Metarrubricitos	1/4 (25%)	2/15 (11,8%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	1/4 (25%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)

Tabela 4 – Número e porcentagem de cães, que apresentaram alterações nos parâmetros do plaquetograma e na avaliação morfológica das plaquetas, nos 13 grupos estudados, conforme o perfil infeccioso.

	1/ (<i>Ehrlichia</i> <i>sp.</i>)	2/ (<i>E. canis</i>)	3/ (<i>A.</i> <i>platys</i>)	4/ (<i>B. canis</i> <i>canis</i>)	5/ (<i>Leishmania</i> <i>sp.</i>)	6/ (<i>E.</i> <i>canis+A.</i> <i>platys</i>)	7/ (<i>E.</i> <i>canis+B.</i> <i>canis</i>)	8/ (<i>A.</i> <i>platys+B.</i> <i>canis</i> <i>canis</i>)	9/ (<i>E.</i> <i>canis+A.</i> <i>platys+B.</i> <i>canis</i> <i>canis</i>)	10/ (<i>Ehrlichia</i> <i>sp.+Leishmania</i> <i>sp.</i>)	11/ (<i>E.</i> <i>canis+Leishmania</i> <i>sp.</i>)	12/ (<i>A.</i> <i>platys+Leishmania</i> <i>sp.</i>)	13/ (<i>E.</i> <i>canis+A.</i> <i>platys+B.</i> <i>canis</i> <i>canis</i>)
Trombocitose	0/4 (0%)	0/15 (0%)	0/7 (0%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Trombocitopenia	2/4 (50%)	12/15 (80%)	1/7 (14,3%)	1/3 (33,4%)	3/4 (75%)	10/12 (83,3%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2(0%)	1/3 (33,3%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)
Macroplaquetas	2/4 (50%)	10/15 (66,7%)	5/7 (71,4%)	1/3 (33,3%)	3/4 (75%)	7/12 (58,3%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	2/3 (66,7%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
Microagregados discretos	0/4 (0%)	1/15 (6,7%)	0/7 (0%)	0/3 (0%)	1/4 (25%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)

Tabela 5 – Número e porcentagem de cães, que apresentaram alterações nos parâmetros do leucograma e na avaliação morfológica dos leucócitos, nos 13 grupos estudados, conforme o perfil infeccioso.

	1/ (<i>Ehrlichia</i> <i>sp.</i>)	2/ (<i>E. canis</i>)	3/ (<i>A. platys</i>)	4/ (<i>B. canis</i> <i>canis</i>)	5/ (<i>Leishmania</i> <i>sp.</i>)	6/ (<i>E. canis</i> + <i>A. platys</i>)	7/ (<i>E. canis</i> + <i>B. canis</i>)	8/ (<i>A. platys</i> + <i>B. canis</i>)	9/ (<i>E. canis</i> + <i>A. platys</i> + <i>B. canis</i>)	10/ (<i>Ehrlichia</i> <i>sp.</i> + <i>Leishmania</i> <i>sp.</i>)	11/ (<i>E. canis</i> + <i>Leishmania</i> <i>sp.</i>)	12/ (<i>A. platys</i> + <i>Leishmania</i> <i>sp.</i>)	13/ (<i>E. canis</i> + <i>A. platys</i> + <i>B. canis</i>)
Leucocitose	0/4 (0%)	2/17 (11,76%)	2/7 (28,6%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	1/12 (8,3%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)
Leucopenia	0/4 (0%)	2/17 (11,76%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	0/4 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/3 (33,33%)	0/2 (0%)	2/2 (10%)
DNNER	0/4 (0%)	3/17 (17,65%)	0/7 (0%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Neutrofilia	0/4 (0%)	3/17 (17,65%)	1/7 (14,3%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)
DNND	0/4 (0%)	1/17 (5,9%)	1/7 (14,3%)	0/3 (0%)	1/4 (25%)	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Neutropenia	0/4 (0%)	0/17 (0%)	1/7 (14,3%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/3 (50%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
Eosinofilia	2/4 (50%)	3/17 (17,7%)	1/7 (14,3%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
Eosinopenia	0/4 (0%)	7/17 (41,2%)	1/7 (14,3%)	0/3 (0%)	3/4 (75%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Basofilia	0/4 (0%)	3/17 (17,7%)	1/7 (14,3%)	0/3 (0%)	1/4 (25%)	3/12 (25%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/3 (33,33%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
Linfocitose	0/4 (0%)	0/17 (0%)	2/7 (28,6%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	3/12 (25%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Linfopenia	1/4 (25%)	5/17 (29,4%)	2/7 (28,6%)	1/3 (33,3%)	3/4 (75%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/3 (33,33%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Monocitose	0/4 (0%)	0/17 (0%)	1/7 (14,3%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
Monocitopenia	0/4 (0%)	2/17 (11,8%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	0/4 (0%)	3/12 (25%)	0/12 (0%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	1/2 (50%)	1/3 (33,33%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
Neutrófilos tóxicos	0/4 (0%)	2/17 (11,8%)	0/7 (0%)	0/3 (0%)	2/4 (50%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
Linfócitos reativos	2/4 (50%)	4/17 (23,59%)	1/7 (14,3%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	6/12 (50%)	0/12 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/3 (33,33%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Monócitos ativados	3/4 (75%)	1/17 (5,9%)	3/7 (42,9%)	2/3 (66,7%)	3/4 (75%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)

DNNER – Desvio nuclear dos neutrófilos para a esquerda regenerativo; DNND – Desvio nuclear dos neutrófilos para a direita.

CONCLUSÕES

- Coinfecções por hemoparasitas são comuns. As alterações patoclínicas mais comuns incluem anemia, trombocitopenia e resposta variável de leucócitos.
- Anemia é um achado comum nas hemoparasitoses, tanto em animais que apresentam apenas uma infecção quanto àqueles que apresentaram coinfecções. No entanto, coinfecções representam agravantes para essa condição.
- Dentre as hemoparasitoses, a trombocitopenia ocorre com maior intensidade e frequência em animais infectados por *E. canis* ou que apresentam coinfecções.
- As alterações morfológicas mais comuns em cães com hemoparasitose incluem hipocromasia, anisocitose e formação de rouleaux.
- Alterações laboratoriais são mais frequentes em cães infectados por *E. canis*, com agravamento nas coinfecções, pela maior patogenicidade desse agente dentre os hemoparasitas dos cães.
- Variações importantes podem ser identificadas na medula óssea de cães com hemoparasitose, no entanto, apresentam importância reduzida no diagnóstico, mas que podem ser utilizados para a definição do prognóstico e direcionamento do tratamento.

CAPÍTULO 2

Alterações da bioquímica sérica em animais infectados por *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp.*

RESUMO

As hemoparasitoses são doenças de extrema importância na clínica de pequenos animais, por serem infecções de elevada prevalência, fácil transmissão e difícil controle. Os sinais clínicos são inespecíficos, mas as alterações laboratoriais são freqüentes, com destaque para as alterações na bioquímica sérica. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações da bioquímica sérica em cães com infecções confirmadas, pela técnica da PCR, por hemoparasitas (*Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp.*), apresentando infecção por um ou mais agentes etiológicos. Alterações nos analitos bioquímicos foram freqüentes em animais com hemoparasitose, com destaque para os valores de albumina, fosfatase alcalina e alanina aminotransferase, nos animais infectados por *Ehrlichia canis*. A infecção por *Leishmania sp.* mostrou-se associada à redução dos valores de albumina e aumento das globulinas.

Palavras-chave: Cães, hemoparasitoses, albumina, *Leishmania sp.*

ABSTRACT

Hemoparasitoses have major importance in clinical diseases of small animals for infections are highly prevalent, easily transmitted and difficult to control. Clinical signs are nonspecific, but laboratory abnormalities are

frequent, especially the changes in serum biochemistry. The present study aimed to evaluate the changes in serum biochemistry in dogs with infections confirmed by PCR for hemoparasites (*Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* and *Leishmania sp.*), with infection by one or more aetiological agents. Changes in biochemical analytes were frequent in animals with hemoparasitoses, highlighting the values of albumin, alkaline phosphatase and alanine aminotransferase in animals infected with *Ehrlichia canis*. Infection by *Leishmania sp.* was associated with decreased levels of albumin and increased levels of globulins.

Key-words: Dogs, hemoparasitoses, albumin, *Leishmania sp.*

INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses são doenças de extrema importância na clínica de pequenos animais, por serem infecções de elevada prevalência, fácil transmissão e difícil controle (Urquhart et al., 1998). Os sinais clínicos são inespecíficos e extremamente variáveis, associados a diferentes taxas de morbidade e mortalidade.

A erliquiose monocítica canina e a trombocitopenia cíclica canina são denominações para afecções causadas pelas

bactérias *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, respectivamente.

Existem subespécies da *Babesia canis* que se diferenciam entre si pela patogenicidade, sendo que a *Babesia canis rossi* é a mais patogênica, seguida pela *Babesia canis canis* e finalmente pela *Babesia canis vogeli*, que provoca doença branda nos animais (Uilenberg et al., 1989).

A leishmaniose visceral canina (LVC), associada às espécies de *Leishmania* complexo *donovani*, é transmitida por mosquitos flebotomíneos, sendo encontrada na América desde os Estados Unidos até o norte da Argentina. Trata-se de uma zoonose de grande importância, com casos humanos (leishmaniose visceral humana, LVH) na América Latina (Monteiro et al., 1994).

Na infecção por *E. canis* pode ocorrer alterações nas proteínas plasmáticas. Na fase crônica da infecção ocorre hiperglobulinemia, principalmente monoclonal, e hipoalbuminemia. Esses achados se relacionam à problemas nutricionais (inapetência, perda de apetite), edema secundário à vasculite e doença renal ou hepática associadas (Woody e Dumber Junior, 1982). Pode ocorrer um aumento de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), decorrente de lesões hepáticas (Almosny, 1998). O aumento de FA, também pode ocorrer devido ao estresse sistêmico causado pelo parasita ou doenças concomitantes (Kaneko, et al., 1997). Na fase aguda da doença pode ocorrer aumento nos valores de uréia, creatinina

e fósforo devido a uma azotemia pré-renal (Hoskins, 1991), que pode se agravar na fase crônica (Almosny e Massard, 2002).

Em infecções por *Anaplasma platys* pode ocorrer hipoalbuminemia e hipocalcemia (Baker et al., 1987), mas também hipergamaglobulinemia com aumento de IgA e IgG e perda da capacidade de fixação do ferro (Almosny e Massard 2002).

Na babesiose canina, pode se observar alterações nas análises bioquímicas como a hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia e aumento das enzimas hepáticas. Na urinálise pode se observar a ocorrência de bilirrubinúria e hemoglobinúria, secundárias à hemólise intravascular (Brandão e Hagiwara, 2002).

Em cães com LVC ocorre aumento das enzimas hepáticas em apenas 16% dos animais (Ciamella 1997). Azotemia pode ser observada em até 45% dos animais, mas apenas 38% apresentam aumento no nível sérico de creatinina (Slappendel e Greene, 1990). A proteinúria é a alteração mais frequente na urinálise dos cães infectados (Koutinas et al., 1999). Além de anemia em 72% dos casos, Mylonakis et al. (2005), citam ainda hiperglobulinemia (78%), hiperproteinemia (59%) e proteinúria (50%) como os achados patoclínicos mais comuns na LVC. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações da bioquímica sérica em cães com infecções confirmadas, pela técnica da PCR, para hemoparasitas (*Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e

Leishmania sp.), apresentando infecção por um ou mais agentes etiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos, nesse estudo, avaliações bioquímicas de 37 cães, de raças e idades variadas, com diagnóstico molecular de uma ou mais das seguintes hemoparasitoses: *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis canis* e *Leishmania sp.*, provenientes, da rotina clínica no Hospital Veterinário da UFMG, do projeto de castração AGHA, realizado pela Escola de Veterinária da UFMG e de um canil comercial localizado na região norte de Belo Horizonte. Com exceção dos animais provenientes do projeto de castração AGHA, todos apresentavam suspeita clínica de hemoparasitose.

O perfil bioquímico foi realizado, a partir do soro obtido após a centrifugação do sangue armazenado em tubos contendo ativador de coagulação, em Analisador Bioquímico Cobas Mira⁷. As análises bioquímicas, utilizando kits comerciais da Synermed, incluíram proteína total e frações, pelo método colorimétrico, creatinina, pelo método cinético, uréia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), pelo método enzimático. Os valores de referência seguem Kaneko et al. (1997).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em que cada animal representou uma unidade experimental ou repetição e cada perfil infeccioso, considerando infecções isoladas ou associadas por hemoparasitas, representou uma parcela.

Os dados foram analisados de forma descritiva, no entanto, para os grupos 2 (*E. canis*) e 3 (*A. platys*), foi possível aplicar a inferência estatística. Os valores obtidos no perfil bioquímico foram testados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade. As respostas que apresentaram distribuição normal de probabilidades e homogênea de variâncias (concentração sérica de albumina e ALT) foram submetidas à análise de variância, teste de Fisher. As demais respostas, por não atenderem aos critérios de normalidade e homocedasticidade, foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 indica a média e o desvio padrão para cada analito realizado nos diferentes grupos. O resultado das médias e desvios pode ter sofrido a influência de casos específicos devido ao pequeno número de animais em determinados grupos.

⁷ Analisador Bioquímico Cobas Mira, Roche, São Paulo, São Paulo, Brasil.

Tabela 1 – Média e desvio-padrão obtidos para cada analito, em bioquímica sérica, de cães, nos 13 grupos estudados, de acordo com o perfil infeccioso.

Grupo / Infecção	ALT (U/L)	AST (U/L)	CREATININA (mg/dL)	PTNA (g/dL)	ALB (g/dL)	GLOB (g/dL)	GGT (U/L)	FA (U/L)	URÉIA (mg/dL)
1 / <i>Ehrlichia sp</i> (n=4)	83,5±22,7	72,8± 14,5	3,4±3,3	5,6±0,8	2,8±0,5	3,1±0,5	1,4 (n=1)	51,7±20,0	78,4±69,3
2 / <i>Ehrlichia canis</i> (n=8)	101,9±36,0	91,2±29,3	1,1±0,2	5,7±1,6	1,5±0,8	4,2±1,3	2,7±2,1	136,2±93,0	41,2±12,6
3 / <i>Anaplasma platys</i> (n=5)	58,6±20,5	64,6±18,8	1,1±0,2	6,5±0,6	2,6±0,5	3,9±0,9	1,8±0,6	31,1±21,6	27,5±11,3
4 / <i>Babesia canis canis</i> (n=2)	64,6±6,2	77,7±2,1	1,2±0,3	6,8±1,6	1,8±0,4	5±1,2	-	29,0±425,0	54,3±25,0
5 / <i>Leishmania sp.</i> (n=4)	117,5±71,3	60,9±13,0	3,5±2,9	6,7±0,8	1,8±0,8	4,8±1,0	5,4±5,8	120,8±147,1	110,2±106,6
6 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Anaplasma platys</i> (n=4)	140,4±139,5	109,6±99,7	1,2±0,1	7,8±0,7	2,4±0,5	5,3±0,6	4,2 (n=1)	35,0±14,4	27,6±4,1
7 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Babesia canis canis</i> (n=1)	83,7 (n=1)	60,4 (n=1)	1,3 (n=1)	6,1 (n=1)	2,8 (n=1)	3,4 (n=1)	0 (n=1)	31,2 (n=1)	33,0 (n=1)
8 / <i>Anaplasma platys</i> + <i>Babesia canis canis</i> (n=2)	232,2±205,8	101,3±41,4	1,1±0,4	4,5±1,1	1,8±0,6	2,7±0,5	1,2 (n=1)	56,5±2,5	17,4±6,5
9 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Anaplasma platys</i> + <i>Babesia canis canis</i> (n=1)	547,8 (n=1)	247,9 (n=1)	0,7 (n=1)	5,3 (n=1)	1,3 (n=1)	4,0 (n=1)	-	239,6 (n=1)	18,5 (n=1)
10 / <i>Ehrlichia sp.</i> + <i>Leishmania sp.</i> (n=1)	73,6 (n=1)	45,2 (n=1)	1,6 (n=1)	7,0 (n=1)	3,3 (n=1)	3,7 (n=1)	4,0 (n=1)	28,3 (n=1)	44,6 (n=1)
11 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Leishmania sp.</i> (n=1)	93,7 (n=1)	77,5 (n=1)	1,4 (n=1)	7,0 (n=1)	1,4 (n=1)	5,6 (n=1)	-	44,6 (n=1)	31,5 (n=1)
12 / <i>Anaplasma platys</i> + <i>Leishmania sp.</i> (n=2)	97±21,5	85,5±11,6	1,9±0,7	6,5±0,4	1,8±0,7	4,7±0,3	-	232,5±192,5	104,9±69,8
13 / <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Anaplasma platys</i> + <i>Leishmania sp.</i> (n=2)	127,3±14,3	62,0±29,9	1,5±0,3	7,1±0,4	1,5±0,4	5,6±0,8	-	108,1±61,3	96,0±39,6
VALORES DE REFERÊNCIA	0-110	0-100	0,5-1,5	5,4-7,5	2,3-3,1	2,7-4,4	0-25	20-160	20-56

ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; PTNA – proteína total; ALB – albumina; GLOB – globulina; GGT – gama glutamil-transferase; FA – fosfatase alcalina. Diferenças significativas para ALT (p<0,05), ALB (p<0,02) e FA (p<0,02), entre os grupos 2 e 3.

O grupo 1, infectado apenas por *Ehrlichia sp.*, apresentou média elevada para os valores de uréia e creatinina, sendo que dois animais apresentaram aumento de creatinina e um demonstrou aumento de uréia e creatina, com valores extremos de 187mg/dL de uréia e 8,99mg/dl de creatinina, com grande influência na média final desse grupo. Oliveira et al. (1998) observaram valores médios elevados para uréia e creatinina em cães com diagnóstico parasitológico de erliquiose. Os animais infectados por *Leishmania sp.* (grupo 5) também apresentaram médias desses analitos superiores aos valores de referência. Resultado observado também nas coinfeções (grupos 12 e 13), mas cujas médias podem ter sido influenciadas pelo valor de um único animal. Em um estudo conduzido por Dias (2008), em Brasília, observou-se aumento da concentração sérica de uréia em animais infectados por *Leishmania sp.*. Ciaramella et al. (1997) encontraram azotemia em 10,7% dos animais infectados por *L. infantum*. Assim como o presente estudo, Xavier (2011) não observou alterações nas médias desses analitos em animais coinfectados por *Ehrlichia canis* e *Leishmania sp.*

Médias elevadas, da enzima ALT, foram observadas nos grupos infectados por *Leishmania sp.* (grupo 5), *E. canis* e *A. platys* (grupo 6), *A. platys* e *B. canis canis* (grupo 8), *E. canis*, *A. platys* e *B. canis canis* (grupo 9) e *Ehrlichia canis* + *Anaplasma platys* + *Leishmania sp.* (grupo 13), indicando lesão hepatocelular. Observou-se aumento

concomitante da média dos valores de AST nos grupos 6, 8 e 9, mas apenas o grupo 9 apresentou aumento de fosfatase alcalina. Esse aumento nas enzimas pode decorrer de dano hepático ou estresse sistêmico causado pelos hemoparasitas (Almosny, 1998). Os animais infectados por *Leishmania sp.* foram os únicos que apresentaram alteração nas enzimas que estavam com apenas um dos agentes pesquisados. Em um estudo realizado por Xavier (2011) foram encontrados sete animais coinfectados por *Ehrlichia canis* e *Leishmania sp.*, apresentando média dos resultados dentro dos parâmetros estabelecidos. Em um estudo realizado em Brasília não foram observadas alterações nas enzimas em cães infectados por *Babesia sp.* (Vasconcelos, 2010), Oliveira et al. observaram aumento na média do ALT em animais infectados isoladamente por *A. platys* e *Babesia sp.*

O grupo 2, infectado por *E. canis*, apresentou alterações nas concentrações séricas de albumina e globulina, sendo que cinco cães (62,5%) apresentaram diminuição nos níveis de albumina e aumento da globulina, e três destes, apresentaram ambas as alterações. Nesses casos a proteína pode se encontrar normal, pois a hipoalbuminemia compensa a hipergamaglobulinemia que ocorre principalmente na fase crônica da infecção (Jain, 1993; Kuehn e Gaunt, 1985), sendo observado em dois destes três animais. Em um estudo realizado no Mato Grosso, região centro-oeste do país, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia foi um achado frequente em

cães com diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* (Sousa et al., 2010). A hipoalbuminemia pode ser consequência da diminuição na ingestão de proteínas causada pela anorexia, diminuição na produção de proteínas causadas por danos hepáticos ou perda na urina devido à lesão renal (proteinúria), enquanto a hiperglobulinemia encontra-se associada à resposta imune do hospedeiro em relação ao parasita (Harrus et al., 1996).

Os animais com infecção única por *Leishmania sp.* (grupo 5) apresentaram aumento dos valores médios para proteína e redução para albumina. Os valores da relação albumina/globulina encontravam-se alterados em três dos quatro animais desse grupo. Moura (2013) observou essa alteração em todos os animais sorologicamente positivos para esse agente. Essas alterações são comuns em na LVC e as causas são semelhantes àquelas descritas para a erliquiose (Lappin, 2006).

Considerando-se os valores de referência para a espécie canina, observou-se valores médios de globulina superiores e de albumina inferiores nos animais que apresentaram *E. canis* e/ou *A. platys* com infecção concomitante por *Leishmania sp.* (grupos 11, 12 e 13). Isso pode ser explicado pelo estímulo imunológico causado por esses agentes e pelos fatores associados à perda protéica e diminuição no metabolismo protéico, mecanismos que podem ter sido agravados devido à presença de infecções concomitantes.

Testes de comparação entre médias foram aplicados para a comparação entre os grupos infectados por *E. canis* (grupo 2) e *A. platys* (grupo 3). Observou-se diferença nos valores de albumina (Fisher, $p < 0,02$), ALT (Fisher, $p < 0,05$) e fosfatase alcalina (Mann-Whitney $p < 0,02$), sendo que os animais infectados por *E. canis* apresentaram valores inferiores de para albumina, e superiores para ALT e fosfatase alcalina. Esses dados podem sugerir uma maior patogenicidade desse agente ou diferenças entre o estágio da doença (Harrus et al., 1997d).

CONCLUSÕES

- Alterações nos analitos bioquímicos são frequentes em animais com hemoparasitose, com destaque para os valores de albumina, fosfatase alcalina e ALT, nos animais infectados por *Ehrlichia canis*.
- As alterações encontradas indicam que as hemoparasitoses provocam danos renais e hepáticos.
- A infecção por *Leishmania sp.* encontra-se associada à redução dos teores de albumina e aumento de globulina.

CAPÍTULO 3

Comparação das alterações bioquímicas, hematológicas e de medula óssea em animais com suspeita clínica de hemoparasitose por *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis canis*.

RESUMO

Apesar da elevada prevalência de hemoparasitoses no Brasil, o diagnóstico dessas afecções representa um desafio para o clínico de pequenos animais e, embora alterações laboratoriais sejam frequentes, elas se mostram inconstantes e inespecíficas. O presente estudo teve como objetivo comparar as alterações laboratoriais (hemograma, provas bioquímicas e mielograma) em cães com suspeita clínica de hemoparasitoses, que tiveram o diagnóstico molecular negativo ou positivo para pelo menos um dos agentes testados, verificando a sensibilidade dos achados laboratoriais. Observou-se maior ocorrência de anemia (77,8% versus 33,3%), trombocitopenia (55,6% versus 28,6%), leucocitose (18,5% versus 14,3%), leucopenia (14,8% versus 4,8%), hipergamaglobulinemia (40,7% versus 14,3%) e hipocelularidade medular (53,8% versus 0%) nos animais infectados por hemoparasitas, em relação àqueles que apesar da suspeita clínica não tiveram o diagnóstico molecular confirmado para os agentes testados. Exames hematológicos de sangue e medula óssea e de bioquímica sérica podem auxiliar no diagnóstico de hemoparasitoses em cães, embora não exista teste ouro.

Palavras-chave: Cães, hemoparasitoses, anemia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia.

ABSTRACT

Despite the high prevalence of hemoparasitoses in Brazil, the diagnosis of these diseases represents a challenge for small animal practitioners and although laboratory abnormalities are frequent, they show inconsistency and unspecificity. The present study had the objective to compare the laboratory results (complete blood count, biochemical tests and bone marrow exam) in dogs suspected of hemoparasitoses, which had negative or positive molecular diagnosis for at least one of the tested agents, to check the sensitivity of the laboratory findings. It was observed higher incidence of anemia (77,8% versus 33,3%), thrombocytopenia (55,6% versus 28,6%), leukocytosis (18,5% versus 14,3%), leukopenia (14,8% versus 4,8%), hypergammaglobulinemia (40,7% versus 14,3%) and bone marrow hypocellularity (53,8% versus 0%) in animals infected by hemoparasites, compared to those who, despite clinical suspicion, had no diagnosis molecular confirmed for the tested agents. Hematological blood tests and bone marrow and serum biochemistry can help to diagnose hemoparasitoses in dogs, although there is no golden test.

Key-words: Dogs, hemoparasitoses, anemia, thrombocytopenia, hypergammaglobulinemia.

INTRODUÇÃO

Apesar da elevada prevalência de hemoparasitoses no Brasil, o diagnóstico dessas afecções, pode representar um desafio para o clínico de pequenos animais (Dagnone, 2001).

Alterações laboratoriais são frequentes, no entanto, mostram-se extremamente inconstantes e inespecíficas (Harvey, 1998; Almosny e Massard, 2002; Moreira et al., 2003). A anemia pode variar de discreta a intensa e resposta dos leucócitos, diante dessas infecções, é extremamente variável, pois está relacionada à fase da infecção, imunidade do hospedeiro e patogenicidade do hemoparásita envolvido (Almosny e Massard, 2002; Stockham e Scott, 2011). Da mesma forma, a trombocitopenia mostra-se um parâmetro inconstante, que pode estar ausente em pacientes infectados (Costa, 2011), mas também inespecífico, pois pode estar relacionado a uma série de patologias e processos inflamatórios (Stockham e Scott, 2011).

Apesar da inexistência de um teste ouro para o diagnóstico dessas afecções, torna-se relevante, em casos específicos, a utilização de métodos auxiliares, com destaque para a pesquisa direta, testes sorológicos e moleculares (Dagnone et al., 2001).

O presente estudo teve como objetivo comparar as alterações laboratoriais (hemograma, provas bioquímicas e mielograma) em cães com suspeita clínica de hemoparasitoses, que tiveram

o diagnóstico molecular negativo ou positivo para pelo menos um dos agentes testados, verificando a ocorrência de alterações laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos nesse estudo, avaliações bioquímicas, hematológicas e de medula óssea de 48 cães, de raças e idades variadas, com suspeita clínica de hemoparasitose, provenientes, da rotina clínica no Hospital Veterinário da UFMG e de um canil comercial localizado na região norte de Belo Horizonte.

Desses animais, 27 apresentaram diagnóstico molecular positivo para *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e/ou *Babesia canis canis*, constituindo o grupo 1 (infectados), enquanto os 21 animais restantes foram negativos para pela técnica da PCR.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em que cada animal representou uma unidade experimental ou repetição.

O número de amostras obtidas em cada grupo encontra-se disposto na Tabela 1.

Tabela 1 – Perfil infeccioso, contendo respectivo número de animais e amostras obtidas em cada grupo.

Grupo / Infecção	Número de animais	Bioquímica	Hemograma	Mielograma
1 / Infectados	27	27	27	13
2 / Não infectados	21	20	21	9
Total	48	48	48	22

Os dados foram analisados de forma descritiva, e pela estatística de inferência.

Os valores obtidos no hemograma, perfil bioquímico e contagem diferencial dos tipos celulares na medula óssea foram testados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade.

As respostas que apresentaram distribuição normal de probabilidades e homogênea de variâncias (volume globular (VG), hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de eosinófilos) foram submetidas à análise de variância e teste de Fisher. As respostas que não atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade (respostas obtidas nas provas bioquímicas e mielograma, contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), red cell distribution width (RDW), contagem de plaquetas, contagem global de leucócitos e diferencial de neutrófilos bastonetes e segmentados, monócitos, linfócitos e basófilos) foram analisadas por métodos não-paramétricos, utilizando-se o teste de Mann-Whitney. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar

diferenças, entre os grupos, na dispersão de frequência da ocorrência de alterações nos parâmetros laboratoriais e na avaliação morfológica das células no hemograma e mielograma.

Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 48 animais com suspeita de hemoparasitoses, 27 (56,3%) confirmaram as suspeitas, com diagnóstico molecular de *Ehrlichia sp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e/ou *Babesia canis canis*, e 21 (43,7%) apresentaram resultados negativos no diagnóstico molecular para esses agentes.

Hematologia

A média e desvio-padrão obtidos no hemograma dos animais infectados e não-infectados encontram-se dispostos na Tabela 2.

A tabela 3 inclui as alterações encontradas no hemograma e avaliação morfológica dos tipos celulares, em animais infectados e não-infectados.

Tabela 2 – Média e desvio-padrão obtidos para os valores hematológicos, em cães, positivos e negativos para as hemoparasitoses estudadas.

	Grupo 1 (infectados) n = 27	Grupo 2 (não infectados pelos agentes testados) n = 21	Valores de referência
Volume globular (%)	32,3 ± 10,7	41,3 ± 8,9	37-55
Hemoglobina (g/dL)	9,5 ± 3,2	12,6 ± 2,8	12-18
Hemácias (x10⁶ céls/μL)	4,5 ± 1,6	5,9 ± 1,4	5,5-8,5
VCM (fL)	73,9 ± 5,4	70,9 ± 3,7	60-77
CHCM (g/dL)	29,2 ± 2,4	30,5 ± 1,9	32-36
HCM (g/dL)	21,6 ± 2,1	21,7 ± 2,0	19,5-24,5
RDW (%)	13,4 ± 1,1	13,0 ± 0,8	12-15
Leucócitos totais (céls/μL)	12150 ± 6539	13847 ± 11026	6000-17000
Bastonetes (céls/μL)	303 ± 908	144 ± 503	0-300
Segmentados (céls/μL)	8340 ± 5440	9290 ± 9968	300-11500
Eosinófilos (céls/μL)	769 ± 1046	1182 ± 879	100-1250
Basófilos (céls/μL)	14,6 ± 54,0	7,4 ± 33,2	Raros
Linfócitos (céls/μL)	2017 ± 1902	2504 ± 1404	1000-4800
Monócitos (céls/μL)	588,4 ± 454,1	711 ± 485	150-1350
Plaquetas (x10³ céls/μL)	204,5 ± 159,2	243,2 ± 118,6	175-500

VCM – Volume corpuscular médio, CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média, HCM – Hemoglobina corpuscular média, RDW - *red blood cell distribution width* (amplitude da variação dos eritrócitos).

Diferenças significativas para o volume globular (p<0,003), hemoglobina (p<0,0003), número de hemácias (p<0,003), VCM (p<0,04), CHCM (p<0,05) e número de linfócitos (p<0,02).

Tabela 3 – Número e porcentagem de cães, que apresentaram alterações nos parâmetros do hemograma e na avaliação citomorfológica, nos dois grupos estudados.

	Grupo 1 (infectados) n = 27	Grupo 2 (não infectados) n = 21
Rouleaux	8 (29,6%)	5 (23,8%)
Policromasia	4 (14,8%)	3 (14,3%)
Hipocromasia	7 (25,9%)	2 (7,4%)
Macrocitose	3 (11,1%)	0 (0%)
Anisocitose	5 (18,5%)	1 (4,8%)
Poiquilocitose	2 (7,4%)	0 (0%)
Copúsculos de Howell Jolly	1 (3,7%)	0 (0%)
Metarrubríctos	4 (14,8%)	2 (7,4%)
Leucocitose	5 (18,5%)	3 (14,3%)
Leucopenia	4 (14,8%)	1 (4,8%)
DNNER	4 (14,8%)	2 (9,5%)
Neutrofilia	4 (14,8%)	4 (19%)
DNND	2 (7,4%)	2 (9,5%)
Neutropenia	3 (11,1%)	1 (4,8%)
Eosinofilia	5 (18,5%)	8 (38,1%)
Eosinopenia	9 (37,5%)	1 (4,8%)
Basofilia	0 (0%)	0 (0%)
Linfocitose	3 (11,1%)	1 (4,8%)
Linfopenia	11 (40,7%)	3 (14,3%)
Monocitose	1 (3,7%)	3 (14,3%)
Monocitopenia	2 (7,4%)	2 (9,5%)
Neutrófilos tóxicos	2 (7,4%)	1 (4,8%)
Linfócitos reativos	8 (29,6%)	9 (42,9%)
Monócitos ativados	8 (29,6%)	5 (23,8%)
Trombocitose	1 (3,7%)	1 (4,8%)
Trombocitopenia	15 (55,6%)	6 (28,6%)
Macroplaquetas	18 (66,7%)	16 (76,2%)
Microagregados discretos	2 (7,4%)	1 (6,7%)

DNNER – Desvio nuclear dos neutrófilos para a esquerda regenerativo; DNND – Desvio nuclear dos neutrófilos para a direita.

Diferenças significativas para a ocorrência de eosinopenia ($p < 0,006$), linfopenia ($p < 0,04$) e trombocitopenia ($p < 0,01$).

A média obtida para os valores de hemácia, hemoglobina e VG apresentou-se diminuída nos animais infectados e dentro dos valores de referência para os animais não infectados. No estudo de dispersão de frequências observou-se que 77,8% (21/28) e 33,3% (7/21) dos animais dos grupos 1 e 2, respectivamente, apresentaram diminuição nos valores hemácias ($p < 0,007$), hemoglobina ($p < 0,0005$) e VG ($p < 0,006$). Nos animais infectados a anemia foi classificada como macrocítica hipocrômica (7/28), sugerindo regeneração medular, e normocítica normocrômica (3/28), enquanto no grupo 2, anemias desse tipo ocorreram em apenas um animal. Caprariis et al. (2011) avaliou um canil com suspeita de hemoparasitoses transmitidas por carrapatos e observou através de técnicas moleculares, que dos 58% dos animais infectados, 40% apresentaram anemia. Acetta (2008) analisou 84 animais trombocitopênicos infectados por *E. canis* ou *A. platys* com diagnóstico parasitológico e observou a presença de anemia em 59,5% das amostras, sendo que 53% dessas eram normocítica normocrômica.

Análises estatísticas demonstraram, no grupo infectado valores médios inferiores para VG (Mann-Whitney, $p < 0,003$), hemácias (Mann-Whitney, $p < 0,003$) e hemoglobina (Mann-Whitney, $p < 0,0003$). Fonseca (2008) encontrou diferença similar a esse estudo entre animais infectados e não infectados por hemoparasitas. Para os índices hematimétricos, observou-se médias mais elevadas de CHCM (Mann-

Whitney, $p < 0,05$) e inferiores de VCM (Mann-Whitney, $p < 0,04$), nos animais infectados, revelando uma maior tendência, nesse grupo, ao desenvolvimento de anemia macrocítica hipocrômica. Essa diferença nos valores nos índices hematimétricos não foi encontrada por Fonseca (2008).

Rouleaux, hipocromasia e anisocitose foram os achados mais comuns observados em lâmina nos animais infectados, apresentando 29,6%, 25,9 e 18,5% respectivamente. No grupo dos animais não infectados as alterações mais frequentes foram rouleaux (23,8%) e policromasia (14,28%). Quatro dos animais infectados apresentaram rouleaux associado ao aumento da proteína total sérica e dois dos animais negativos apresentaram essa associação.

Leucocitose ocorreu em 18,5% (5/27) dos animais infectados e leucopenia em 14,8% (4/27), corroborando a resposta leucocitária variável nas hemoparasitoses (Almosny e Massard, 2002). No grupo 2, leucocitose e leucopenia ocorreram em 14,3% (3/21) e 4,8% (1/21), respectivamente, provavelmente associadas à outras infecções ou patologias. A média no valor total dos leucócitos foi similar dos dois grupos, dentro do intervalo de referência, conforme observado por Fonseca (2008) e Dieckmann (2010).

Infecções por *E. canis* podem provocar neutropenia, principalmente na fase subclínica e crônica da infecção (Troy e Forrester, 1990;

Woody e Hoskins, 1991), enquanto a babesiose canina pode cursar com leucopenia na fase inicial e evoluir para leucocitose neutrofílica ao longo do desenvolvimento da doença (Abdulahii, et al., 1990). Nesse estudo, quatro animais de cada grupo apresentaram neutrofilia, enquanto três, no grupo 1, e um no grupo 2, apresentaram neutropenia. 14,5% dos animais positivos e 9,5% dos negativos apresentaram desvio nuclear de neutrófilos à direita. Essa alteração foi identificada em 7,1% dos animais com diagnóstico parasitológico para *Ehrlichia sp.* e/ou *Anaplasma platys.*, no estudo conduzido por Acetta (2008).

Ocorreu linfopenia em 40,7% dos animais infectados, embora Acetta (2008) tenha relatado que apenas 22,6% dos animais apresentaram linfopenia. Observou-se maior ocorrência de linfopenia nos animais infectados, com $p < 0,03$. Linfócitos reativos foram observados em 29,6% dos animais infectados e 42,9% dos animais não infectados, enquanto monócitos ativados ocorrem em 29,6% e 23,8%, respectivamente. Essas alterações podem ocorrer secundária a diversos processos inflamatórios (Stockham e Scott, 2001). Os animais do grupo 2 podem apresentar outras hemoparasitoses, infecções ou outras doenças inflamatórias para que essas alterações sejam observadas. A possibilidade de que animais negativos sejam positivos para as infecções estudadas existe, já que não existe teste ouro e que o PCR pode apresentar resultados falso-negativos devido a diversos fatores com destaque para as infecções crônicas, em que a parasitemia é baixa e o DNA do

microrganismo se encontra em baixas concentrações, podendo não ser detectado (Cohn, 2003). Além disso, o DNA do parasita morto pode persistir no material coletado, conferindo resultados falso-positivos (Neer et al., 2002).

Observou-se diferença significativa nos valores médios obtidos para eosinófilos nos dois grupos (Mann-Whitney, $p < 0,02$), com resultado inferior no grupo infectado. Da mesma forma, observou-se, no estudo de dispersão de frequências um maior número de animais com eosinopenia, no grupo 1 (37,5%), com $p < 0,02$, resultado similar ao encontrado por Acetta (2008) que 39,3% dos animais infectados por *E. canis* e/ou *A. platys* apresentaram eosinopenia.

Não foi observada diferença estatística nos valores de plaquetas entre os grupos estudados. No entanto, trombocitopenia foi identificada em 55,6% dos animais no grupo 1 e em 28,6% no grupo 2. Costa (2011) realizou a pesquisa de hemoparasitas através de técnicas moleculares e observou que 20,7% dos animais parasitados não apresentavam trombocitopenia e que 21,3% dos trombocitopênicos não apresentavam hemoparasitas. Nesse estudo, observou-se um maior número de animais trombocitopênicos no grupo 1 ($p < 0,04$), no entanto, 44,4% dos animais infectados não apresentaram trombocitopenia e 28,6% dos animais que não apresentaram nenhum das infecções estudadas eram trombocitopênicos. Diversos mecanismos podem causar a diminuição das plaquetas no sangue além das hemoparasitoses (Stockham e

Scott, 2011). Fonseca (2008) encontrou uma média de 100.555 plaquetas/ μ L de sangue em animais infectados e 182.658 plaquetas/ μ L de sangue em animais negativos. Dieckmann (2010) encontrou média de 203.874 plaquetas/ μ L de sangue em animais infectados por *Ehrlichia sp.* e/ou *Babesia sp.*, resultado similar ao desse estudo.

Foram analisadas 13 medulas ósseas dos animais parasitados e nove dos animais negativos para as hemoparasitoses avaliadas.

Hiperplasia foi identificada em 38,5% e 22,2% dos animais nos grupos 1 e 2, respectivamente. Por outro lado, 53,8% das medulas ósseas avaliadas no grupo 1 apresentaram hipocelularidade e essa alteração não foi identificada em nenhum dos casos, no grupo 2, com $p < 0,02$. A hipoplasia medular é comum em animais com hemoparasitoses, principalmente na fase crônica das infecções (Woody e Hoskins, 1991; Neer e Harus, 2006).

Não foram observadas alterações na concentração de megacariócitos na medula óssea dos cães infectados e apenas um animal apresentou aumento nos megacariócitos no grupo 2, sendo que esse mesmo animal encontrava-se trombocitopênico.

Cinco animais de cada grupo apresentaram aumento na concentração de ferro na medula óssea, em quatro casos esse aumento estava associado com anemia, mas o aumento na concentração de ferro na medula pode acontecer

também em animais com idade mais avançada (Harvey, 2001).

Dos quatro animais que apresentavam aumento na relação mielóide:eritróide no grupo infectado três estavam anêmicos e não apresentavam leucocitose evidenciando a diminuição eritróide pela medula óssea. No grupo 2, três animais apresentaram diminuição na relação mielóide:eritróide, associado a leucopenia em um desses animais; dois animais apresentaram aumento nessa relação, sendo que um deles estava com leucocitose intensa e anemia, resultando em aumento da produção da série mielóide (Jain, 1993).

Observou-se diferença significativa, entre os dois grupos, nos valores de bastonetes (Mann-Whitney, $p < 0,02$), linfócitos (Mann-Whitney, $p < 0,007$) e prórrubricitos (Mann-Whitney, $p < 0,009$). Em relação aos bastonetes encontrou-se média inferior nos animais infectados, podendo ser explicado pela maior porcentagem de animais leucopênicos nesse grupo. A diferença observada em linfócitos foi significativa, com maiores valores nos animais infectados, podendo ser explicado pela possibilidade de ocorrer hiperplasia linfóide em medula óssea em casos de processos inflamatórios (Stockham e Scott, 2011). Os prórrubricitos podem estar aumentados nos animais infectados devido a maior prevalência de anemia nesse grupo, exigindo maior concentração de precursores eritróides. No estudo de dispersão de frequência observou-se que um diminuições marcantes na contagem de

neutrófilos bastonetes, na medula óssea, nos cães do grupo 1 ($p < 0,01$).

Bioquímica

A tabela 4 inclui os valores de média e desvio padrão obtidos nos exames bioquímicos séricos

dos animais com suspeita clínica, de acordo com o diagnóstico molecular dos hemoparasitas *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis canis*.

Tabela 4 – Média e desvio-padrão obtidos para os valores de bioquímica sérica de cães com o diagnóstico molecular positivo ou negativo para *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis canis*.

	Grupo 1 (infectados) n = 27	Grupo 2 (não infectados) n = 21	Valores de referência
ALT (U/L)	119,6 ± 124,9	89,4 ± 52,8	0-110
AST (U/L)	90,7 ± 56,1	57,9 ± 17,6	0-100
Creatinina (mg/dL)	1,5 ± 1,5	1,5 ± 1,2	0,5-1,5
Proteína (g/dL)	6,2 ± 1,4	6,8 ± 1,3	5,4-7,5
Albumina (g/dL)	2,1 ± 0,8	2,7 ± 0,48	2,3-3,1
Globulina (g/dL)	4,1 ± 1,2	4,1 ± 1,4	2,7-4,4
GGT (U/L)	2,2 ± 1,8	6,8 ± 3,0	0-25
Fosfatase alcalina (U/L)	75,3 ± 76,1	77,6 ± 90,2	20-160
Uréia (mg/dL)	40,2 ± 34,3	43,4 ± 64,9	20-56

ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; GGT – gama-glutamilttransferase. Diferenças significativas para AST ($p < 0,01$), albumina ($p < 0,007$) e GGT ($p < 0,008$).

Seis cães infectados por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e/ou *Babesia canis canis* (22,2%) apresentaram aumento de ALT e AST entre os animais infectados, enquanto apenas três (14,3%) animais negativos apresentaram alterações nas concentrações séricas de ALT. Os animais infectados pelas hemoparasitoses estudadas apresentaram valor médio de ALT de 119,58 U/L, enquanto os animais negativos apresentaram média de 89,42 U/L. O aumento da ALT ocorreu em 6 animais infectados e 3 animais não infectados, com $p < 0,03$. Em um

estudo conduzido no estado do Rio de Janeiro, foram pesquisados hemoparasitas, por diagnóstico sorológico, molecular e parasitológico, em cães que participaram de programas de castração gratuitos. Os animais não apresentaram média dos valores de ALT e AST superiores aos valores de referência para a espécie em nenhum dos grupos (Fonseca, 2008), mas o aumento dessas enzimas, conforme observado no grupo infectado, pode ocorrer devido a dano hepático resultante da ação de inúmeros hemoparasitas (Almosny, 1998).

Nenhum animal dos dois grupos apresentou aumento de GGT e apenas três, em cada grupo, apresentaram aumento de fosfatase alcalina. Os grupos apresentaram diferenças muito sutis entre as médias de fosfatase alcalina, resultado similar ao encontrado por Fonseca (2008). O aumento da fosfatase alcalina em cães ocorre por diversos mecanismos, sendo a colestase e indução por drogas ou hormônios os principais deles (Stockham e Scoot, 2011), no entanto, em animais infectados por hemoparasitas, pode ocorrer devido ao estresse sistêmico causado (Almosny, 1998).

A média dos valores de uréia e creatinina não apresentaram alterações em ambos os grupos. Quatro (14,8%) e três (11,1%) animais do grupo infectado apresentaram aumento de creatinina e uréia respectivamente e no grupo não infectado três (14,3%) apresentaram aumento de creatinina, e dois, (9,5%) aumento na concentração sérica de uréia. Fonseca (2008) não observou aumento nesses analitos em animais infectados e negativos. Concentrações séricas normais de uréia e creatinina são comuns em casos de erliquiose (Bonnard e Dralez, 1990).

Os valores médios para as globulinas séricas apresentou-se similar nos dois grupos, e dentro dos valores normais de referência, no entanto, uma maior número de animais infectados (40,7%) apresentou aumento nesse analito, em relação aos animais não infectados (14,3%), com $p < 0,007$. Não foram observadas diferenças significativas, entre os grupos, no valor médio

obtido para albumina e proteína total, mas observou-se um maior número de animais com valores de albumina abaixo dos valores de referência no grupo dos animais infectados (48,2%), com $p < 0,03$. Vasconcelos (2010) encontrou 58,1% de hipoalbuminemia e 4,7% de hipergamaglobulinemia em animais infectados por *Babesia sp.* Fonseca (2008) observou hiperglobulinemia e hipoalbuminemia em animais infectados, revelando diferença em relação aos animais livres de infecção, em seu experimento.

Foi realizada análise estatística entre os grupos estudados e observou-se diferença nos valores de AST e albumina, encontrando-se aumentados e diminuídos respectivamente no grupo dos animais infectados. Resultados diferentes foram relatados por Fonseca (2010), que não observou diferenças estatísticas nos valores de albumina entre animais infectados e não infectados, e observou diminuição nos valores de AST nos animais infectados por *E. canis* e/ou *A. platys*.

A Tabela 5 contém a correlação estatística entre as respostas estudadas.

Correlações negativas, classificadas como moderadas, foram identificadas nos animais infectados quando as taxas de albumina e proteína foram comparadas à concentração sérica de fosfatase alcalina ($p < 0,01$ e $p < 0,03$, respectivamente), provavelmente relacionada ao dano hepático que pode ser causada pelos hemoparasitas (Almosny e Massard, 2002). Nos animais não infectados essa correlação foi

observada apenas entre albumina e fosfatase alcalina ($p < 0,05$), que pode estar relacionada à dano hepático de causa indeterminada, nesse estudo.

As correlações observadas, considerando-se proteína total ou albumina, em relação ao volume globular, pode ocorrer devido a casos de hemoconcentração, relacionadas à desidratação (Stockham e Scott, 2011).

A correlação entre leucócitos totais e monócitos ocorreu em ambos os grupos. Com uma porcentagem de 38% e 54% no grupo infectado e não infectado respectivamente. Monocitose é um achado comum em animais com hemoparasitoses (Meyer e Harvey, 2004;

Almosny, 2002), podendo estar relacionada ou não ao aumento de leucócitos totais. A monocitose ocorre também em doenças inflamatórias agudas ou crônicas e sob concentrações elevadas de corticosteróides (Stockham e Scott, 2011).

Não houve correlação entre o número de plaquetas no sangue e o número de megacariócitos na medula óssea nos animais infectados e essa correlação foi negativa nos animais não infectados, provavelmente devido ao número de animais, mas a concentração plaquetária no hemograma pode estar diminuída, mesmo com o aumento de megacariócitos na medula óssea (Stockham e Scott, 2011).

Tabela 5 – Correlações de Spearman entre os parâmetros laboratoriais avaliados em cães infectados por hemoparasitas (grupo 1) e não infectados (grupo 2)

Associações	Grupo 1 (infectados) n = 27	Grupo 2 (não infectados) n = 21
Fosfatase alcalina X Albumina	$p < 0,01$; $r_p = -0,48$	$p < 0,005$; $r_p = -0,59$
Fosfatase alcalina X Proteína	$p < 0,03$; $r_p = -0,41$	CNS
Proteína X Volume globular	$p < 0,004$; $r_p = 0,53$	CNS
Albumina X Volume globular	$p < 0,00000007$; $r_p = 0,83$	$p < 0,007$; $r_s = 0,57$
Leucócitos X Monócito	$p < 0,0005$; $r_s = 0,62$	$p < 0,0001$; $r_s = 0,74$
Plaquetas X Megacariócitos	CNS	$p < 0,001$; $r_p = -0,89$

As correlações significativas foram consideradas fortes quando ocorrerem em mais de 49% da população estudada ($r > 0,07$), moderada, quando ocorrerem em 9 a 49% ($0,3 < r < 0,7$), e fraca, quando ocorrerem em menos de 9% da população ($r < 0,3$).

CNS – correlação não significativa, p – nível de significância, r_s – correlação de Spearman, r_p – correlação de Pearson.

CONCLUSÕES

- Animais com hemoparasitose frequentemente apresentam anemia, trombocitopenia e variação na contagem de leucócitos (leucocitose / leucopenia).
- Infecções por hemoparasitas resultam em hipergamaglobulinemia no soro e hipocelularidade na medula óssea.
- Exames hematológicos de sangue e medula óssea e de bioquímica sérica podem auxiliar no diagnóstico e no prognóstico de hemoparasitoses em cães, embora não exista teste-ouro.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, S. U.; MOHAMMED, A. R.; TRIMNEL, A. et al. Clinical and haematological findings in naturally occurring cases of canine babesiosis. *Journal of Small Practice*, v. 31, p. 145-147, 1990
- 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. *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 200 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração: Parasitologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- 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, 2002. V.1 p. 13-56.
- ALVAR, J.; CANÃVATE, C.; MOLINA, R. et al. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. v. 57, p. 1-87, 2004.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F. et al. Distribution and relationships between clinical and pathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, v.18, p.147-156, 2003.
- ASSARASAKORN, S.; NIWETPATHOMWAT, A. A complicated case of concurrent canine babesiosis and canine ehrlichiosis. *Comparative Clinical Pathology*. v. 16, p. 281-284, 2007.
- BAKER, D. C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S. D. Acute Ehrlichia platys infection in the dog. *Veterinary Pathology*, v. 24, p. 449-453, 1987.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.685-698.
- BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S. et al. Longitudinal quantification of Ehrlichia canis in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology*. v. 136, p. 321-325, 2009.

- BERZINA, I.; CAPLIGINA, V.; BAUMANIS, V. et al. Autochthonous canine babesiosis caused by *Babesia cani canis* in Latvia. *Veterinary Parasitology*. v. 196, p. 515-518, 2013.
- BONNARD, P.; DRALEZ, F. Cas Clinique: Pancytopenie canine. *Le Point Veterinaire*. v. 22, n. 128, p. 129-134, 1990.
- BORIN, S.; CRIVELENT, L. Z.; FERREIRA F.A. Epidemiological, clinical, and hematological aspects of 251 dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp. Morulae. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*. vol. 61, no.3, p. 566-571, 2009.
- 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.
- BRANDÃO, L P.; HAGIWARA, M. K. Babesiose Canina – Revisão. *Clinica Veterinária*. v.41, p.50-59, 2002
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 120p.
- BRAVO, L.; FRANK, L. A. e BRENNEMAN K. A. Canine leishmaniasis in the United States. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.15, p. 699-708, 1993.
- BREITSCHWERDT, E. B.; MALONE, J. B.; MACWILLIAMS, P. et al. Babesiosis in the Greyhound. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 182, n. 9, p. 978-982, 1983.
- BREITSCHWERDT, E.B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C., *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 1995, p. 376-383.
- BREITSSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B.; HANCOCK, S. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two Ehrlichia canis strains. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 42, p. 362–368, 1998.
- BREITSCHWERDT, E. B.; Riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.) *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, v. 1, cap. 86, p. 422-429.
- BROWN, G. K. ; CANFIELD, P. J.; DUNSTAN, R. H. et al. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. *Australian Veterinary Journal* .v. 84, No 9, 321-325, 2006.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO JR., J.P. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in an endemic area. *Veterinary Research*. n. 35, p. 141-146, 2004.

CAEIROS, A.P.S. *Detecção de Babesia spp. e de outros parasitas em cães por técnicas morfológicas, sorológicas e moleculares no distrito de Lisboa, Portugal*. 2012. 111p. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa.

CARLI, E.; TASCIA, S.; TROTTA, M. et al. Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with Babesia canis canis or Babesia canis vogeli infection. *Veterinary Parasitology*. v.162, p. 51-57, 2009.

CAPRARIIS, D.; DANTAS-TORRES, F.; CAPELLI, G. et al. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Veterinary Microbiology*. v. 149, p. 206-212, 2011.

CESAR, M.F.G. Ocorrência de Ehrlichia canis em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição. 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal)-Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. *The Veterinary Records*, v.141, p. 539-543, 1997.

CODNER, E.C., FARRIS-SMITH, L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.187, n.1, p. 47-50, 1986.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. *The Veterinary Clinics of North America – Small animals Practice*. V. 33, p. 863-884, 2003.

CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 12º, 2002, Rio de Janeiro. Avaliação soropidemiológica da infecção por Ehrlichia canis, Dirofilaria immitis e Borrelia burgdorferi em cães de uma população hospitalar. Rio de Janeiro, 2002.

CORTESE, L.; TERRAZZANO, G.; PINTEDOSI, D. et al. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by Leishmania infantum and Ehrlichia canis. *The veterinary Journal*. v. 188, p. 118-121, 2011.

COSTA, J.O.; SILVA, M.; BATISTA JUNIOR, J.A. Ehrlichia canis infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. *Arquivo Escola. Veterinária. UFMG*, v. 25, p. 199-200, 1973.

- COSTA, H.X. Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia. 2011. 58 f. Dissertação (Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTO, M.C. Erliquiose nos animais e no homem. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 22, p. 191-201, 2001.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTO, M.C. et al. 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.
- DACEY, M.J.; MARTINEZ, H.; THOMAS, R. et al. Septic shock due to babesiosis. *Clinical Infectious Diseases*. v. 33, p. 37-38, 2001.
- DAVOUST, B. L'ehrlichiose Canine. *Le point veterinaire*, v.25, n. 151, p. 43-51, 1993.
- DAWSON, J. E.; ANDERSON, B. E.; FISBEIN, D. B. et al. 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
- DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L. et al. Decrease liquid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anemia. *Journal of Comparative Pathology*. v. 122, p. 213-216, 2000.
- DIAS, C.Z. Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados no distrito federal. 2008. 82 f. Dissertação de mestrado em saúde animal, Universidade de Brasília, Brasília.
- DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, R. et al. Genital Lesions Associated with Visceral Leishmaniasis and Shedding of *Leishmania* sp. in the Semen of Naturally Infected Dogs. *Veterinary Pathology*. v. 42, p. 650–658, 2005.
- DUMLER, J.S.; BARRET, A.F.; BEKKER, C.P. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and HE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocitophila. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Grã Bretanha, v. 51, p. 2145-2165, 2001.
- FERREIRA, F.R. Validação do diagnóstico morfológico de Anaplasma platys, Harvey et al., 1978 (Dumler et al., 2001) em cães (Canis familiaris) por meio da reação da polimerase em cadeia. 2006. 60 f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração:

Clínica médica. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA A.M. et al. Anaplasma platys diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. v. 5, n.3, 2007.

FERREIRA, R. F. ; CERQUEIRA, A. M. F. ; PEREIRA, A. M. et al. 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.

FONSECA, C.N. Situação atual da ocorrência de hemoparasitas e Leishmania spp. em cães de Maricá, região da baixada litorânea do estado do Rio de Janeiro – Brasil. 2008. 164 f. Dissertação (Departamento de Clínica e Reprodução Animal – Universidade Federal Fluminense. Niterói.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. v.137, p.214-221, 2006.

FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, N. et al. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*. v. 134, p. 77-85, 2005.

GASPARNI, M.R. ; COELHO, A. L. M. ; JOJIMA, F. S. et al. CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, n. 15, 2008, Curitiba. Ocorrência de Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães de uma população hospitalar em Londrina, Paraná. Curitiba. 2008. v. 15.

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.

GRIMALDI JR, G., TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clinical Microbiology. Rev.* v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

HARRUS, S.; WARNER, T.; AVIDAR, Y. et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Brazilian Journal of Veterinary*. v. 66, p. 241-249, 1996.

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E. et al. Canine monocytic ehrlichiosis a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Veterinary Record*. v. 141, p. 360-363, 1997a.

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. et al. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Veterinary Record*, v.14, p.247-250, 1997c.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T.E. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. *The Compendium Continuing Education*. v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997d.

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

HARRUS S, WANER, T.; AIZENBERG, I. et al. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 36, p. 2140-2142, 1998b.

HARRUS, S., WANER, T., BARK, H. et al. 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.; BARK, H. et al. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent 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.; KENNY, M.; MIARA, L. et al. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 48, n.11, p.4488-4490, 2004.

HARVEY, J.N.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia like agent in dogs. *Journal Infectious Disease*, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

HARVEY J.W. *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals*. 1 ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001, 228p.

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.

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

HARVEY, J. W. Canine Cyclic Thrombocytopenia. In GREENE C. E; HARVEY, J. W. (3ed): *Infectious Diseases of the dog and cat*, Philadelphia, SAUNDERS, W. B., p. 229-231, 2006.

- HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. *Canine Practice*. v.16, n.3, p.13-21, 1991.
- 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.
- 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*. v. 38, n. 11, p. 4219-4221, 2000.
- INOKUMA, H., YOSHIKAWA, Y., MATSUMOTO, K. et al. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology*, v.121, n 3-4, p. 341-346, 2004.
- IRWIN, P.J.; HUTCHINSON, G.W. Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. *Australian Veterinary Journal*, v. 68, p. 204-209, 1991.
- JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia. Lea & Febiger, 417p. 1993.
- JOJIMA, F.S.; GARCIA, J.L.; VIDOTO, M.C. et al. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. *Revista Brasileira de Parasitologia*. v. 17, supl. 1, p.277-283, 2008.
- KAGIWARA, M. K.; HOLZCHUH, M. P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis*. I- Avaliação de leucograma durante a evolução da doença. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.39, p. 745-755, 1987.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.
- KILLICK-KENDRICK, R. The life cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*. *Proceeding...* Sevilha, Espanha, 2002. p. 57-69, 2002.
- KLUG, A.R.; DUNBAR, L.E.; GIRARDI G.A. et al. Concurrent ehrlichiosis and babesiosis in dogs. *Canadian Veterinary Journal*. v. 32, p. 305-307, 1991.
- KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989– 1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*. v. 35, p. 376–383, 1999.
- 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.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*. v. 30, p. 24-42, 2001.

LIMA, W.G.; MICHALIK, M.S.N.; MELO M.N. et al. Canine visceral leishmaniasis a histopathological study of lymph nodes. *Acta tropica*. v. 92, p.43-53, 2004.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal*. v. 40, p. 1121-1140, 2010.

LOBETTI, R.G. Canine babesiosis. *Compendium Continuing Education for the Practising Veterinary*, v.20, p.418-430, 1998.

LOPES, E.G.P.; MAGALHÃES, E.F.; SILVA, J.A. et al. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 62, n. 5, p. 1062-1071, 2010.

MACHADO, G.P.; DAGNONE, A.S.; SILVA, B.F. Anaplasmosse trombocítica canina – uma breve revisão. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. n. 15, Jul 2010.

MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA, A.M. et al. Prevalence of Ehrlichial canis infection in thrombocytopenic

dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*. v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MACINTIRE, D. K.; BOUDREAUX, M. K.; WRIGHT, J. C. et al. Babesia gibsoni infection among dogs in the southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 220, n. 3, p. 33325-33329, 2002.

MAIA, M. G. Aspectos epidemiológicos da babesiose canina em área semi-árida do estado de Minas Gerais. 2005. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Medicina Veterinária Preventiva). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. v. 125, p. 251-262, 2004.

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

McDADE, J.E. Ehrlichiosis – a disease of animals and humans. *Journal Infectious Disease* v.161, p.609-617, 1990.

- MEDEIROS, C.M.O.; MELO, A.G.C.; LIMA, A.K.F. et al. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Ciência Animal*. v. 18, p. 43-50, 2008.
- MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & Diagnosis*. Philadelphia, W.D. Saunders, 349p, 2004.
- MONTEIRO S.P.; LACERDA, M.M.; ARIAS, JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 27, p. 67-72, 1994.
- MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAUJO, R.B. et al. 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.
- MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F. et al. Comparasion of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different signs. *Veterinary Parasitology*. v. 145, p. 245-252, 2007.
- MORENO, P.; LUCENA, R.; GINEL, P. J. Avaluation of primary hemostasis in canine leishmaniasis. *Veterinary Record*. v. 142, n. 4, p. 81-83, 1998.
- MOURA, A.C.J. Avaliação clinico-laboratorial e do xenodiagnóstico de cães com anticorpos anti-*leishmania* e de cães vacinados com Leishmune, provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina. 2013. 96 f. Dissertação Mestrado Ciência Animal. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MYLONAKIS, M.E.; PAPAIOANNOU, N.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. et al. Cytology patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Clinical Pathology*. v. 34, p. 243-247, 2005.
- MYLONASKIS, M.E.; SIARKOU, V.I.; KOUTINAS, A F. Mielosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): na update of pathogenesis, diagnosis and management. v. 65, n. 4, 2010.
- NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, MC. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*. v. 38, n. 3, p.766-770, 2008.
- NEER, M.T.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPINN, M.R. Consensus statement of Ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.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, 2006. P.203-216.

NELSON, R. W. Doenças protozoárias polissistêmicas. In: (Ed.) *Medicina interna de pequenos animais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 1083 p., cap 104, p. 1035-1036.

O'DWYER-OLIVEIRA, L. H. Aspectos biológicos do desenvolvimento e da transmissão da *Babesia canis* (PIANA & GALLIVALLERIO, 1895) pelo *Rhipicephalus sanguineu* (LATREILLE, 1806) no Brasil. 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

O'DWYER.; MASSARD, C.L. Babesiose 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, 2002. V.1 p. 13-56.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, F. et al. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR

techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.* v. 44, p. 1318–1322, 2006.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C. T.; TINUCCI-COSTA, M. et al. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

OWENS, S.D.; OAKLEY, D.A.; MARRYOTT, K. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 219, p. 1076–1083, 2001.

PALUDO, G. R.; AQUINO, L. C.; LOPES, B. C. C. et al. Laboratory Findings in Canine Visceral Leishmaniasis In Brasília, Brazil. *Veterinary Clinical. Pathology*. v. 36, p. 382-398, 2007.

PERILLE A.L.; MATUS, R.E.; Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 5, p. 195–198, 1991.

RAFAJ, R.B.; KULES, J.; SELANEC, J. et al. Markers of Coagulation Activation, Endothelial Stimulation, and Inflammation in Dogs with Babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 27, p. 1172–1178, 2013.

- 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.
- RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichiae and Ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 4, p. 286-308, 1991.
- RISTIC, M.; HOLLAND, C.J. Canine ehrlichiosis. In: WOLDEHIWET, Z; RISTIC, M. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Pergamon press, Oxford, United Kingdom, cap. 8, p. 169-186, 1993.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.A.; OLIVEIRA, L.P. et al. Molecular evaluation of the incidence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys and Babesia spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *The Veterinary Journal*. v. 179, p. 145-148, 2009.
- SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.S. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis in symptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 73, p. 82-86, 2005.
- SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J. et al. Tick-borne infectious of dogs. *Trends in Parasitology*, v. 17, n. 2, p. 74-80. 2001.
- SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENITAGER, L. et al. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 153, p. 131-138, 2008.
- SILVA, J.N. Soroprevalência de anticorpos ANTI-Ehrlichia canis em Cuiabá, Mato Grosso. 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade de animais domésticos e selvagens) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.
- SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-Ehrlichia canis em cães de Cuiabá, Mato Grosso. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.
- SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C.E. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the dog and cat*. Filadélfia. W.B. Saunders Company, 1990. Cap.79, p.769-777.
- SMITH, R.D.; HOOKS, J.E.; HUXSOLL, D.L. et al., Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): survival of phosphorus-32-labeled blood platelets in normal and infected dogs. *American Journal of Veterinary Research*. v. 35, p. 269–273, 1974.
- SOLANO-GALLEGO, L.; LLOUL, J.; OSSO, M. et al. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*. v. 37, n. 2, p.232-244, 2006

- SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. v. 165, p. 1-18, 2009.
- SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to Leishmania infection. *Advances in Immunology*. v. 74, p. 275–317, 2000.
- SOUSA, V.R.F.; BONFIM, T.C.B.; ALMEIDA, A.B.P.F. et al. Co-infecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cães diagnosticada pela PCR. *Acta Scientiae Veterinarie*. v. 37, n. 3, p. 281-283, 2009.
- SOUSA, V.R.F.; ALMEIDA, A.B. P. F.; BARROS, L.A. et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. *Ciência Rural*. v. 40, n.6, p. 1309-1313, 2010.
- 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*. v. 13, p. 352, 2004.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2. ed. Iowa: Blakwell Publishing, 2008. 729p.
- SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infections. In: ETTINGER, S.J. (ED): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, W.B, Saunders Company, 1989, p. 265-297.
- TABOADA, J.; MERCHANDT, S. R. Infecções causadas por protozoários e por outras causas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4 ed. São Paulo. Manole LTDA. 3020p. 1995, p.574-582.
- TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. *Infectious disease of the dog and cat*. 2 ed. Philadelphia. Saunders, 1998, p.471-481.
- TAFURI, W. L. Leishmaniose visceral em cães natural e experimentalmente infectados: histopatologia estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CR3-CD11b/CD18) e 4(CR4-CD11b/CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da classe II no fígado e órgãos linfóides. 1995. 207 f. Tese (Doutorado em Patologia Geral) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N. et al. Canine visceral leishmaniosis a remarkable histopathological Picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001.
- THRALL, M.A. et al. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Ed. Roca. p. 170 – 184, 2007.
- TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. *Clinical*

Microbiology infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia. W.B. Saunders Company, p. 404-417, 1990.

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*, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

UILENBERG, G.; FRANSSEN, F. F.; PERIE, N. M. et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Veterinary Quarterly*, v. 11, n. 1, p. 33-40, 1989.

UILENBERG, G. Babesia—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v.138, p.3–10, 2006.

UNGAR DE SÁ, J.E.; BITTENCOURT, D.V.V.; BISPO, A.C. et al. Estudo retrospectivo (1991-2005) dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e região metropolitana, Bahia. *Revista brasileira de Saúde e produção animal* v.8, n.3, p. 178-183, jul/set, 2007.

URQUHART, G.M; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L. et al. Parasitologia Veterinária. 2 ed.Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1998.

VASCONCELOS, M.F. Estudo da infecção por *Babesia spp.* em cães da região periurbana de

Brasília, Distrito Federal. 2010. 85 f. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal. Universidade de Brasília, Brasília.

VERCAMMEN, F.; DEDEKEN, R.; MAES, L. Prophylactic activity of imidocarb against experimental infection with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, v. 63, n. 3-4, p. 195-198, 1996.

XAVIER, M.S. Estudo de hemoparasitas por evidências morfológicas, sorológicas e moleculares, com ênfase na família Anaplasmatacea em *Canis familiaris*, na região litorânea do estado do Rio de Janeiro. 2011. 222 f. Tese na area de Clínica e Reprodução Animal. Universidade Federal Fluminense, Niterói.

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

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*. v.9, p. 307-317, 1997.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M. et al. Comparison of Nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*. Washington, V. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WITTER, R.; VECCHI, S.N.; PACHECO, T.A.
et al. Prevalence of canine monocytic
ehrlichiosis and canine thrombocytic
anaplasmosis in dogs suspected of
hemoparasitosis in Cuiabá Mato Grosso.
Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n.
6, suplemento 2, p. 3811-3822, 2013,

WOOD, B.J.; DUMBAR JUNIOR, M. Canine
Ehrlichiosis. *The Southwestern Veterinarian*. v.
34, n.3, p. 211-215, 1982.

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

ANEXO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Eu, _____,
proprietário (a) do paciente _____, da raça _____, com a
idade de _____, tenho o consentimento de que meu animal será
submetido à coleta de medula óssea e sangue, e será incluído em Projeto de
Pesquisa do prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes, no qual serão avaliados
sobre a presença ou não de hemoparasitas.

Local e data

Assinatura do proprietário