

ACHADOS HEMATOLÓGICOS EM SANGUE E MEDULA ÓSSEA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Ehrlichia* spp. E *Anaplasma* spp.

HEMATOLOGICAL OBSERVATIONS IN THE BLOOD AND BONE MARROW OF DOGS NATURALLY INFECTED BY Ehrlichia spp. AND Anaplasma spp.

Lidiana Carvalho de Holanda¹ ORCID - <http://orcid.org/0000-0003-4744-6475>

Telga Lucena Alves Craveiro de Almeida¹ ORCID - <http://orcid.org/0000-0002-7194-7993>

Rebeca Menelau de Mesquita² ORCID - <http://orcid.org/0000-0003-2537-9670>

Júnior Mario Baltazar de Oliveira¹ ORCID - <http://orcid.org/0000-0003-2655-2797>

Andréa Alice da Fonseca Oliveira^{1*} ORCID - <http://orcid.org/0000-0002-3728-177X>

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Fauna Consultório Veterinário, Recife, PE Brasil.

* Autora para correspondência - andreaafo@hotmail.com

Resumo

Objetivou-se analisar os achados hematológicos em sangue periférico e medula óssea em cães infectados por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.. Avaliaram-se 44 cães com suspeita clínica de hemoparasitose, de diferentes raças, idades e de ambos os sexos, submetidos ao exame sorológico pelo SNAP Test, a análises hematológicas e mielograma. Dos 44 cães avaliados, 63,6% (28/44) foram sorologicamente reagentes, sendo 57,1% (16/28) positivos para *Ehrlichia* spp., 21,4% (6/28) para *Anaplasma* spp. e 21,4% (6/28) de coinfectados. A trombocitopenia foi a alteração hematológica mais frequente em cães positivos para *Ehrlichia* spp., presente em 93,7% (15/16) ($p=0,015$) dos animais, enquanto a anemia macrocítica e hipocrômica prevaleceu em 66,7% (4/6) ($p=0,010$) dos animais infectados por *Anaplasma* spp.. Ao mielograma, 62,5% (10/16) ($p=0,005$) dos animais positivos para *Ehrlichia* spp. apresentaram hipoplasia medular e 75,0% (12/16) ($p=0,044$) diminuição do índice mieloide:eritroide (M:E). Nos animais positivos para *Anaplasma* spp., destacou-se a hiperplasia da série eritroide em 50,0% (3/6) ($p=0,022$) dos cães. Não houve associação significativa em nenhuma das análises com o grupo coinfeção ($p>0,05$). Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que o somatório de métodos laboratoriais é essencial na caracterização das hemoparasitoses em cães, agregando valor e permitindo uma efetiva consolidação do diagnóstico relacionado a essas doenças.

Palavras-chave: análises clínicas, hemoparasitoses, imunodiagnóstico, mielograma.

Abstract

This study aimed to analyze the hematological and cytomorphological findings in the peripheral blood and bone marrow of dogs infected with *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. Forty-four dogs with clinically suspected hemoparasitosis, belonging to different breeds, ages, and both sexes, underwent serological examination by SNAP Assay, hematological analysis, and myelogram. Among them, 63.6% (28/44) tested serologically positive; among the serologically positive dogs, 57.1% (16/28) tested positive for *Ehrlichia* spp., 21.4% (6/28) for *Anaplasma* spp., and 21.4% (6/28) were coinfecting. Thrombocytopenia was the most frequent hematologic alteration in dogs positive for *Ehrlichia* spp., present in 93.7% (15/16) ($p=0.015$) of the infected animals, while macrocytic and hypochromic anemia were observed in 66.7% (4/6) ($p=0.010$) of the animals infected with *Anaplasma* spp. In the myelogram, 62.5% (10/16, $p=0.005$) and 75.0% (12/16, $p=0.044$) of the animals positive for *Ehrlichia* spp. presented with bone marrow hypoplasia and decrease in the myeloid: erythroid (M:E) ratio, respectively. Hyperplasia of the erythroid series was observed in 50.0%

(3/6) ($p=0.022$) of the animals positive for *Anaplasma* spp. No significant association was observed between the hematological alterations and the coinfection group ($p >0.05$). On the basis of these hematological observations, it can be inferred that the aforementioned laboratory examinations could be employed for the characterization and confirmative diagnosis of hemoparasitosis in dogs.

Key words: hematological analysis, hemoparasitosis, immunodiagnostic, myelogram.

Recebido em: 3 de julho de 2017.

Aceito em 25 de maio de 2018.

Introdução

As hemoparasitoses consistem em um complexo de enfermidades ocasionadas por agentes que se disseminam na corrente sanguínea, sendo capazes de lesionar ou alterar a função das células sanguíneas, constituindo um crescente problema na rotina da clínica médica de pequenos animais, pois expressam sinais clínicos inespecíficos que limitam o diagnóstico preciso, minimizando assim as possibilidades de recuperação do paciente ^(1,2).

Em cães, destacam-se a Erliquiose Monocítica e a Trombocitopenia Cíclica, causadas respectivamente pelos agentes intracelulares obrigatórios *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, que representam duas das mais frequentes hemoparasitoses em cães, com aproximadamente 5,47% de coinfeção, considerando os dois agentes ⁽³⁾.

Os achados clínicos e hematológicos são inespecíficos em ambas as infecções e relacionam-se a fases da doença, consistindo em: letargia, anorexia, mucosas pálidas, linfadenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia ^(4,5), sendo estas últimas informações essenciais ao profissional para solicitação de exames mais específicos, como a avaliação de medula óssea.

A medula óssea é um tecido semissólido, localizada em espaço restrito nos ossos longos e chatos, cuja principal função consiste na hematopoiese ^(6,7). Por ser um tecido multifuncional, as amostras obtidas de aspirados de medula óssea possibilitam a realização de exames diversos, tais como mielograma, citometria de fluxo, imunohistoquímica e, ainda, a citogenética convencional ⁽⁸⁾. O mielograma, por sua vez, consiste em valiosa ferramenta de caráter investigativo, tendo em vista fomentar o diagnóstico de boa parte das doenças hematológicas, desde desordens primárias a neoplásicas ⁽⁶⁾.

A aquisição de informações sobre as infecções por hemoparasitos, favorece a clínica médica e permite a condução de prognósticos e tratamentos mais adequados, assegurando uma melhor qualidade de vida, maior sobrevivência e redução potencial de sofrimentos desnecessários aos animais acometidos de conhecimentos sobre as alterações em medula óssea, associando-as a achados hematológicos e sorológicos nas.

Deste modo, objetivou-se com este estudo analisar os achados hematológicos em sangue periférico e citomorfológicos de medula óssea em cães infectados por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp..

Material e métodos

A pesquisa em questão foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Licença nº 037/2016) e foi executada respeitando-se as medidas de proteção e minimização de desconfortos e riscos previsíveis aos animais, assim como os dados gerados e os materiais

obtidos dos animais foram preservados e apenas os tutores que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido participaram da pesquisa.

Foram avaliados 44 cães, machos e fêmeas, de raças e idades variadas, com suspeita clínica de hemoparasitose, procedentes do município de Recife e Região Metropolitana do estado de Pernambuco, atendidos em clínica veterinária particular. Todos os animais suspeitos foram inicialmente submetidos ao exame clínico e à coleta de sangue para a realização de análise sorológica e análise hematológica e a obtenção de amostra de medula óssea para a realização do mielograma.

Após a análise sorológica, os animais foram divididos em grupos: Grupo E (sorologia positiva para *Ehrlichia* spp.); Grupo A (sorologia positiva para *Anaplasma* spp.); Grupo C (animais coinfectados – sorologia positiva para *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp) e Grupo Controle (CT) (animais não reagentes a nenhuma das doenças detectáveis pelo kit utilizado).

Amostras sanguíneas dos animais foram obtidas a partir da venopunção da jugular, sendo 2mL de sangue total acondicionados em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA/K3 (Vacuette[®], Greiner BioOne, SP, Brasil) para a realização das análises sorológicas e hematológicas.

A análise sorológica foi realizada empregando-se o kit SNAP 4Dx Plus[®] (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA), conforme recomendações do fabricante. O SNAP 4Dx Plus[®] consiste em teste de triagem baseado no princípio da imunoabsorção enzimática (ELISA) e analisa simultaneamente a presença de anticorpos anti *Dirofilaria immitis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii*. Entretanto, tendo em vista o objetivo proposto neste estudo, apenas os animais reagentes para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., ou coinfectados, foram analisados.

Considerou-se como resultado positivo qualquer surgimento de cor nos poços indicando a presença de anticorpos anti- *A. phagocytophilum* e/ou *A. platys* e/ou do anticorpo anti- *E. canis* e/ou *E. ewingii* na amostra. Resultados negativos foram observados com surgimento de cor apenas no ponto de controle positivo.

Após a realização da análise sorológica, as amostras foram refrigeradas e processadas em até 24 horas após a coleta, a fim de assegurar a qualidade do exame. Os parâmetros considerados na pesquisa foram obtidos pelo analisador hematológico automático Sysmex pocH-100iV Diff[™] (Sysmex Corporation, Kobe, Japão), sendo eles: HEM (hemácias), HGB (hemoglobina), VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), HCT (hematócrito), CTL (contagem total de leucócitos) e PLT (plaquetas), sendo este último parâmetro conferido por meio de esfregaços sanguíneos corados pela técnica de panótico rápido, bem como a pesquisa do hemoparasito. A leitura das lâminas foi realizada por um único observador em microscopia óptica convencional.

As amostras procedentes de medula óssea foram obtidas pela técnica de punção aspirativa, utilizando-se agulha hipodérmica descartável 40 x 16. A colheita das amostras foi realizada a partir da punção esternal, segundo Grindem et al. ⁽⁹⁾, e processadas de acordo com Raskin e Messick ⁽¹⁰⁾, sendo utilizado o panótico rápido para coloração.

A avaliação citomorfológica da medula óssea foi realizada a partir do esfregaço de espículas medulares, obtidos pela técnica de compressão, em microscopia óptica convencional por um único observador, sendo os parâmetros avaliados de acordo com o preconizado por Grindem et al. ⁽⁹⁾.

Inicialmente as amostras de medula óssea foram avaliadas quanto ao aspecto qualitativo em menor aumento (10x, 20x e 40x), a celularidade foi estimada considerando-se a proporção de células *versus* gordura presentes nas espículas e a idade do animal. Para cães jovens (até 3 anos), a medula óssea foi considerada normal quando a amostra apresentou 75% de celularidade; para cães adultos (3,1 a 8 anos), 50% de

celularidade, e, para cães idosos (acima de 8 anos), 25% de celularidade. A medula foi considerada aplásica quando composta por menos de 10% de células⁽⁹⁾.

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

Em maior aumento, utilizando objetiva 100x (imersão), estimou-se o índice mieloide-eritroide (M:E). A relação M:E foi considerada normal quando se enquadrou entre 0,5 – 2,5⁽⁶⁾.

Os dados foram expressos em suas frequências relativas e absolutas e medidas de tendência central (média, desvio-padrão e mediana). Inicialmente, realizou-se uma análise de associação por meio do teste de Qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher, quando o primeiro não exequível, utilizando-se os resultados obtidos na sorologia para erliquiose/anaplasiose (reagente ou não reagente)⁽¹¹⁾. Para a comparação dos dados do eritrograma, leucograma e mielograma, os valores obtidos tiveram sua distribuição avaliada (normalidade) pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição normal e que apresentaram seus valores expressos em porcentagem (HT%) foram submetidas à transformação numérica, utilizando-se a metodologia do Arcoseno. Para a comparação dos valores obtidos no eritrograma em cada grupo, os resultados obtidos em cada parâmetro foram submetidos à análise de variância (teste F) e ao teste de Tukey para avaliação de diferenças entre grupos. Em relação ao leucograma e ao mielograma, os resultados obtidos foram submetidos aos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e U de Mann-Whitney⁽¹²⁾. O programa IBM SPSS *Statistics* 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

Resultados

Dos 44 cães com suspeita de hemoparasitose, 28 (63,6%) foram reagentes ao diagnóstico sorológico. Destes, 57,1% (16/28) apresentaram anticorpos anti-*Ehrlichia* spp., 21,4% (6/28) anticorpos anti-*Anaplasma* spp. e, em 21,4% (6/28) dos animais, foram detectados anticorpos para ambos os agentes.

A trombocitopenia foi a alteração hematológica mais frequente em cães positivos para *Ehrlichia* spp., presente em 93,7% (15/16) ($p=0,015$) dos animais, enquanto a anemia macrocítica e hipocrômica prevaleceu em 66,7% (4/6) ($p=0,010$) dos animais infectados por *Anaplasma* spp.. Não foi evidenciada a presença de mórulas na pesquisa de hemoparasitos realizada em lâminas.

Quanto ao mielograma, nos animais reagentes à *Ehrlichia* spp., detectou-se, em relação à celularidade, a presença de hipoplasia de medula óssea em 62,5% (10/16) ($p=0,005$) e diminuição do índice M:E em 75,0% (12/16) ($p=0,044$) dos cães. Nos animais reagentes à *Anaplasma* spp., evidenciou-se que a hiperplasia da série eritroide foi o achado mais frequente, sendo observado em 50,0% (3/6) ($p=0,022$) dos cães.

Em relação ao grupo de coinfectados (*Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp.), nenhum dos parâmetros hematológicos avaliados em sangue e medula óssea apresentou associação significativa com a infecção para ambos os agentes ($p>0,05$).

A comparação entre grupos e parâmetros obtidos no eritrograma, contagem plaquetária, leucograma e mielograma encontra-se disposta nas Tabelas 1, 2 e 3 respectivamente.

No eritrograma, o grupo A apresentou as menores concentrações de CHCM (g/dL) em relação aos demais grupos. Por sua vez, no plaquetograma, as menores concentrações de plaquetas totais foram observadas no grupo E (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre os resultados obtidos no eritrograma e no plaquetograma por grupos de animais avaliados

Grupos		HEM	HGB	VCM (fi)	CHCM	HCT%	PLT
		(x10 ⁶ /mm ³)	(g/dL)		(g/dL)		(x10 ³ /mm ³)
E	$\bar{X}\pm DP$	4,47±1,52	10,26±3,11	70,13±5,64	32,65±1,33^a	30,31±8,78	92,31±73,05^b
	Mediana	4,40	10,40	69,45	33,21	31,00	83,00
A	$\bar{X}\pm DP$	4,49±2,35	10,55±5,59	72,01±5,96	30,17±1,91^b	32,33±16,07	112,40 ±85,73^{ab}
	Mediana	4,95	12,15	73,83	29,35	36,00	105,50
C	$\bar{X}\pm DP$	5,86±2,26	12,61±4,58	65,60±0,52	33,07±1,00^a	38,33±14,58	171,91±71,51^{ab}
	Mediana	5,00	11,00	65,88	33,30	33,00	199,00
CT	$\bar{X}\pm DP$	5,14±1,86	11,60±4,08	69,19±3,26	32,52±1,44^a	35,69±12,41	200,93±111,13^a
	Mediana	4,95	11,50	68,20	32,96	35,00	204,00

E – Animais reagentes para *Ehrlichia* spp.; A - Animais reagentes para *Anaplasma* spp.; C – Coinfecção; CT – Grupo controle (não reagentes). Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Não houve diferença estatística (p>0,05) entre os grupos em relação aos parâmetros avaliados no leucograma (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos no leucograma por grupos de animais avaliados

Parâmetros		Grupos				Valor p ^(A)
		E	A	C	CT	
Leucograma (x10 ³ /mm ³)	$\bar{X}\pm DP$	17,03±25,71	8,50±7,51	10,36±10,99	11,33±10,52	0,891
	Mediana	6,50	6,60	7,55	7,70	
Metamielócitos (%)	$\bar{X}\pm DP$	0,06±0,25	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,626
	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	
Mielócitos (%)	$\bar{X}\pm DP$	0,12±0,50	0,00±0,00	0,16±0,40	0,19±0,54	0,739
	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	
Bastonetes (%)	$\bar{X}\pm DP$	5,31±9,56	1,16±1,60	3,83±5,63	4,43±6,23	0,818
	Mediana	1,50	0,50	2,50	0,50	
Segmentados (%)	$\bar{X}\pm DP$	64,50±26,81	59,50±29,31	69,00±10,15	72,12±9,17	0,647
	Mediana	72,50	70,00	64,00	70,50	
Eosinófilos (%)	$\bar{X}\pm DP$	3,31±4,15	5,83±3,71	6,00±6,00	3,06±3,43	0,362
	Mediana	1,50	6,00	5,00	2,00	
Basófilos (%)	$\bar{X}\pm DP$	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,000
	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	
Linfócitos (%)	$\bar{X}\pm DP$	10,75±7,15	12,50±7,66	17,66±12,40	15,62±6,94	0,286
	Mediana	11,00	13,50	21,00	15,00	
Monócitos (%)	$\bar{X}\pm DP$	3,43±3,24	4,33±2,58	2,16±0,75	4,56±3,38	0,283
	Mediana	2,00	5,00	2,00	4,00	

E – Animais reagentes para *Ehrlichia* spp.; A - Animais reagentes para *Anaplasma* spp.; C – Coinfecção; CT – Grupo controle (não reagentes). ^(A) Teste de Kruskal-Wallis; * Diferença significativa (P<0,05). Letras diferentes em uma mesma linha nos valores da mediana dos grupos indicam diferença significativa (P<0,05) pelo teste U de Mann-Whitney.

Ao se comparar os resultados do mielograma por grupos, observou-se uma menor concentração da série mieloide, com consequente diminuição do índice M:E nos animais do grupo E. A série linfóide mostrou-se elevada nos grupos E e C quando comparados aos demais grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos no mielograma por grupos de animais avaliados

Parâmetros/Série	Grupos				Valor p ^(A)	
	E	A	C	CT		
Celularidade (%)	$\bar{X} \pm DP$	33,00±21,59	49,67±30,74	34,16±11,35	40,06±17,74	0,404
	Mediana	25,00	58,50	31,50	46,00	
Mieloide (%)	$\bar{X} \pm DP$	27,50±14,32	36,33±20,72	40,66±9,93	44,81±17,04	0,047*
	Mediana	28,00^b	40,00^{ab}	43,50^{ab}	50,50^a	
Eritroide (%)	$\bar{X} \pm DP$	51,00±15,88	40,50±23,16	45,66±11,97	45,69±16,78	0,327
	Mediana	56,00	45,00	42,00	40,50	
Índice M:E	$\bar{X} \pm DP$	0,54±0,36	0,85±0,65	0,97±0,36	1,21±0,71	0,038*
	Mediana	0,46^b	0,72^{ab}	1,08^a	1,23^a	
Linfóide (%)	$\bar{X} \pm DP$	14,22±8,56	5,66±4,41	12,50±4,03	7,25±4,41	0,003*
	Mediana	12,50^a	5,50^b	12,00^a	6,00^b	
Monocítica (%)	$\bar{X} \pm DP$	0,65±0,43	0,75±0,75	0,67±0,81	0,94±1,21	0,984
	Mediana	1,00	0,75	0,50	0,75	
Outras células (%)	$\bar{X} \pm DP$	0,37±0,46	0,08±0,20	0,50±0,54	1,31±3,17	0,230
	Mediana	0,00	0,00	0,50	0,50	
Megacariócitos	$\bar{X} \pm DP$	4,12±3,86	7,50±5,20	4,33±4,50	5,81±2,81	0,175
	Mediana	3,00	7,50	2,00	6,00	

E – Animais reagentes para *Ehrlichia* spp.; A - Animais reagentes para *Anaplasma* spp.; C – Coinfecção e CT – Grupo controle (não reagentes). ^(A) Teste de Kruskal-Wallis; * Diferença significativa ($P < 0,05$). Letras diferentes em uma mesma linha nos valores da mediana dos grupos indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste U de Mann-Whitney.

Discussão

Em relação à resposta sorológica dos cães diante dos agentes, obteve-se neste estudo maior frequência de animais reagentes para *Ehrlichia* spp. (57,1%) em relação à *Anaplasma* spp. (21,4%), divergindo dos achados de Ribeiro et al. ⁽¹³⁾, que analisaram 182 cães procedentes de Pato Branco – PR e obtiveram 32,9% (60/182) de animais positivos para *A. platys* e todos negativos para *E. canis*, com base na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), assim como dos resultados obtidos por Witter et al. ⁽¹⁴⁾, que, utilizando a técnica de PCR associada à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), obtiveram 23,3% e 9,1% de animais reagentes para *E. canis* e *A. platys*, respectivamente, com base em análise realizada em 77 cães em Cuiabá – MT, além de 5,2% de coinfecção.

Ramos et al. ⁽¹⁵⁾ obtiveram índice de coinfecção entre *E. canis* e *A. platys* pela nested-PCR em 32% dos 100 animais analisados, procedentes de rotina hospitalar e suspeitos clinicamente de hemoparasitose, diferentemente do observado neste estudo, em que 21,2% dos cães analisados apresentaram sorologia positiva para ambos os agentes.

A divergência encontrada entre este estudo e os realizados por Ribeiro et al. ⁽¹³⁾, Witter et al. ⁽¹⁴⁾ e Ramos et al. ⁽¹⁵⁾ pode ser explicada principalmente pelo número e pelas características dos animais

amostrados, uma vez que, neste estudo, todos eram clinicamente suspeitos, fase clínica da doença, sendo frequente a detecção de altos índices de animais soropositivos nas fases subclínicas e crônica⁽¹⁶⁾, além de diferenças nas técnicas utilizadas para diagnóstico, uma vez que os autores supracitados empregaram métodos moleculares, diferentemente do teste utilizado neste estudo, baseado em ELISA.

Além de fatores inerentes a amostragem, fase clínica da infecção e técnica empregada, há de se considerar, conforme ressaltado por Ribeiro et al.⁽¹³⁾, a diversidade genética do principal vetor transmissor, o *Rhipicephalus sanguineus*, que, conforme Moraes-Filho et al.⁽¹⁷⁾, se divide em populações distintas com alta e baixa competência vetorial, a depender da distribuição epidemiológica do vetor.

Alterações laboratoriais nas infecções por hemoparasitos são frequentes, no entanto, mostram-se extremamente inconstantes e inespecíficas^(18,19). Os animais deste estudo com infecção por *E. canis* apresentaram uma evidente trombocitopenia (65,2%). Albernaz et al.⁽²⁰⁾ descreveram a ocorrência de trombocitopenia em 76,7% dos animais. Achados de trombocitopenia em cães infectados por *E. canis* estão em concordância com outros estudos no Brasil^(21, 22, 23,24). Os resultados confirmaram a trombocitopenia como a alteração hematológica mais comum nas infecções por *E. canis*.

De acordo com Bulla et al.⁽²²⁾, pode-se atribuir a trombocitopenia na erliquiose canina a fatores relacionados a deficiência imunológica, consumo elevado de plaqueta ou diminuição da sua meia vida, bem como ao sequestro pelo sistema mononuclear fagocitário e ainda ao aumento nas concentrações do fator inibidor da migração plaquetária. Sousa⁽²⁵⁾, por sua vez, ressalta também que o aparecimento da trombocitopenia em animais com erliquiose é promovido pela hipoplasia megacariocítica resultante de processos imunológicos. Essa hipoplasia megacariocítica foi constatada no grupo E deste estudo, entretanto, não apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos.

A relação da trombocitopenia com animais infectados por *Anaplasma* spp. não foi verificada neste estudo, entretanto, de acordo com Harvey⁽¹⁹⁾, considerando-se a fase da infecção em que o animal se encontra, a trombocitopenia pode estar ausente em cães infectados com *A. platys*, sendo, portanto, um parâmetro inconstante em face de seu comportamento cíclico.

No grupo E, a anemia normocítica normocrômica foi detectada em 68,7% (11/16). Esse valor não foi significativo estatisticamente, porém, consiste em achado condizente com os estudos de Castro et al.⁽²⁶⁾ e Albernaz et al.⁽²⁰⁾.

A anemia macrocítica e hipocrômica consistiu na alteração hematológica mais frequente no grupo A., sendo evidenciada em 66,7% dos animais. Esse tipo de anemia é regenerativa durante remissão à perda de sangue ou hemólise aguda. De acordo com Dawson et al.⁽²⁷⁾ e Harvey⁽¹⁹⁾, os achados hematológicos mais frequentes relacionados com a infecção por *Anaplasma platys* em cães consistem em anemia moderada, leucopenia temporária e valores plaquetários oscilantes, entretanto, no que se refere à anemia, comumente a associam à forma arregenerativa, exceção ao estudo de Costa⁽²⁸⁾, que analisou sete cães infectados por *A. platys*. Destes, três animais apresentaram anemia classificada como macrocítica hipocrômica, de forma similar a este estudo.

Em relação ao leucograma, não houve associação entre os parâmetros avaliados por grupo, bem como não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Para todos os grupos, os valores encontraram-se na faixa de normalidade. A variação de resultados obtidos no leucograma é comumente relatada na literatura^(29,20). A ausência de alterações leucocitárias pode ocorrer até a quarta semana de infecção, no caso de animais infectados por *E. canis*, quando, em decorrência da

supressão medular, evidencia-se um quadro de leucopenia ⁽²⁶⁾. Além da fase clínica da doença, destacam-se também a patogenicidade do agente, a condição imunológica do animal e a presença de infecções concomitantes.

A coinfeção não demonstrou interferir nos parâmetros hematológicos averiguados. Considerando que os agentes etiológicos alteram os índices de forma antagônica de acordo com a fase da infecção, sugere-se que houve um balanceamento entre diminuição e aumento dos mesmos parâmetros. No estudo realizado por Costa ⁽²⁸⁾, o grupo que apresentava coinfeção não demonstrou agravamento nas alterações do eritrograma, mas apresentou valores médios superiores aos daqueles animais infectados somente por *E. canis*, ou somente por *A. platys*, concordando com informações descritas na literatura ⁽¹⁹⁾.

Em contraponto a este estudo, Gaunt et al. ⁽³⁰⁾ evidenciaram em animais experimentalmente coinfectados por *A. platys* e *E. canis* a presença de trombocitopenia severa e anemia associada a infecção persistente e ressaltaram a importância de que sejam considerados outros agentes patogênicos, conhecidos ou não, veiculados por carrapatos que podem determinar alterações hematológicas significativas.

Quanto ao mielograma, na comparação dos resultados por grupos, o grupo E apresentou menor concentração da série mieloide, com conseqüente diminuição do índice M:E e aumento na série linfóide. O grupo A apresentou discreta diminuição da série linfóide e, no grupo C, de forma semelhante ao grupo E, observou-se o aumento na série linfóide.

A diminuição do índice M:E observado neste estudo para o grupo E pode indicar o aumento na população de hemácias (hiperplasia eritroide) e/ou diminuição nos precursores granulocíticos (hipoplasia mieloide). Acredita-se que a diminuição da relação M:E encontrada neste estudo decorra de uma hipoplasia do compartimento mieloide, tendo em vista que os casos de depleção, depressão e aplasia dessa série são alterações mais graves de hipoplasia, ou seja, ao somar as diferentes alterações que indicam diminuição da série mielocítica da medula óssea, tem-se mais casos de redução mieloide. Esses achados diferem de Moreira et al. ⁽¹⁸⁾, que observaram aumento na relação M:E em cães infectados por *E. canis*.

O aumento da série linfóide, para os grupos E e C, constatado neste estudo, denota o caráter de resposta imunológica que ocorre nos casos de erliquiose. De acordo com Kallick ⁽³¹⁾, sugere-se que haja uma estreita relação entre o sistema imune do hospedeiro e a patogenia da erliquiose canina, haja vista que a *E. canis* atua diretamente nas células precursoras da medula óssea.

O grupo A apresentou hiper celularidade na série eritroide da medula óssea, entretanto, esse achado não foi estatisticamente significativo ($p=0,327$), quando comparado aos demais grupos. Porém, é um indicador da resposta regenerativa da anemia macrocítica e hipocrômica detectada pelos índices hematimétricos nos animais desse grupo. Apesar de o aumento da série eritroide não ser estatisticamente significativo, justificaria a diminuição da relação M:E ($p=0,038$) observada neste grupo, quando comparado aos demais, discordando de De Tomassi et al. ⁽³²⁾, que classificaram dentro da normalidade essa relação em animais positivos a *A. platys* pela técnica de PCR. Porém, os autores avaliaram apenas dois animais.

A série mieloide, bem como a relação M:E do grupo controle, apresentou maiores proporções quando comparada aos demais grupos avaliados. Isso não significa que esses parâmetros estão elevados, porém, indica a normalidade esperada para a condição de negatividade, apesar da suspeita clínica, enquanto os grupos positivizados demonstraram os mesmos valores diminuídos.

Com base na técnica utilizada, considerou-se que o SNAP 4DX Plus® demonstrou resultados satisfatórios na triagem de animais com suspeita clínica de hemoparasitos, quando associado aos resultados hematológicos. A escolha desse método foi fundamentada na necessidade de uma técnica que apresentasse resultados rápidos, otimizando o diagnóstico nas clínicas veterinárias e de fácil interpretação para a detecção de anticorpos no soro, em detrimento de outras técnicas que demandam laboratório equipado, mão de obra especializada e ainda minimizam as limitações relacionadas à subjetividade do observador. Convém ainda ressaltar que o teste não diferencia as espécies de erliquia (*ewingii* ou *canis*) e anaplasma (*phagocytophilum* ou *platys*), porém, mesmo considerando que as espécies de *E. canis* e *A. platys* sejam frequentemente relatadas no Brasil, em relação às outras, optou-se por destacar apenas o gênero.

Em estudo realizado por Stillman et al. ⁽³³⁾, o teste apresentou no geral valores acima de 89,0% de sensibilidade e especificidade para todos os agentes detectáveis pela técnica. Ressalta-se que *A. phagocytophilum* é intimamente relacionado ao *A. platys*, apontando deste modo a possibilidade da existência de reação cruzada ⁽³⁴⁾. Do mesmo modo, é importante destacar que o teste negativo não é indicativo da ausência do micro-organismo. Alguns fatores, tais como a produção tardia de anticorpos em decorrência da fase da infecção e a inabilidade imunológica do animal em produzir anticorpos suficientemente detectáveis, podem acarretar resultados falso-negativos ⁽³⁵⁾.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que a avaliação sorológica associada a métodos laboratoriais que permitam caracterização do estágio da infecção é essencial na caracterização das hemoparasitoses em cães, agregando valor e permitindo uma efetiva consolidação do diagnóstico relacionado a essas enfermidades. A disponibilidade de testes sorológicos rápidos permite ao médico veterinário a instituição da terapêutica mais adequada em tempo hábil.

Agradecimentos

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à Fauna Consultório Veterinário por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Referências

1. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL. Parasitologia Veterinária. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p. Portuguese.
2. Labarthe N, Pereira MC, Barbarini O, Mckee W, Coimbra CA, Hoskins J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Veterinary Therapeutics*. 2003; 4(1):67- 75.
3. Silva JN, Almeida ABPF, Boa Sorte, EC, Freitas AG, Santos LGF, Aguiar DM, Sousa VRF. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2010; 19(2):108-111. <http://dx.doi.org/10.4322/rbvpv.01902008>. Portuguese.

4. Harrus S, Alleman AR, Bark H, Mahan SM, Waner T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*. 2002; 86:361-368. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00022-6).
5. Shipov A, Klement E, Reuveni-Tager L, Waner T, Harrus S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*. 2008; 153(1-2):131-138. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.009>
6. Grindem CB, Neel JA, Juopperi TA. Cytology of bone marrow. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2002; 32:1313-1374.
7. Müller DCM, Pippi NL, Basso PC, Olsson DC, Santos Junior EB, Guerra ACO. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. *Ciência Rural*. 2009; 39(7):2243-2251. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000153>. Portuguese.
8. Bain BJ. Bone marrow aspiration. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54(9):657-663.
9. Grindem CB, Tyler RD, Cowell RD. A Medula Óssea. In: Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola D B. *Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos*. 3ª Ed. São Paulo: MedVet; 2009. p. 423-451. Portuguese. Portuguese.
10. Raskin, RE, Messick JB. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2012; 42(1):23-42. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.10.001>
11. Thrusfield MV. *Epidemiologia Veterinária*. 2nd ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p. Portuguese
12. Sampaio IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia; 1998. 221p. Portuguese.
13. Ribeiro CM, Matos AC, Azzolini T, Bones ER, Wasnieski EA, Richini-Pereira VB, Lucheis SB, Vidotto O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017; 37(2):129-136. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2017000200006>
14. Witter R, Vecchi SN, Pacheco TA, Melo ALT, Borsa A, Sinkoc AL, Mendonça AJ, Aguiar DM. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. *Semina: Ciências Agrárias*. 2013; 34(6):3811-3822. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3811>. Portuguese
15. Ramos CAN, Ramos RAN, Araújo FR, Guedes Jr, DS, Souza, IIF, Ono TM, Vieira AS, Pimentel DS, Rosas EO, Faustino MAG, Alves LC. Comparação de nested-pCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2009; 81:58- 62. <http://dx.doi.org/10.4322/rbvp.018e1011>. Portuguese
16. Vieira, RFC, Biondo AW, Guimarães AMS, Santos AP, Santos RP, Dutra LH, Diniz PPVP, Morais HA, Messick JB, Labruna MB, Vidotto O. (2011). Ehrlichiosis in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2011; 20(1):1-12. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000100002>
17. Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica*. 2011; 117(1):51-55. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.006>
18. Moreira SM, Machado R, Passos LF. Detecção de *Ehrlichia canis* em aspirados de medula óssea de cães experimentalmente infectados. *Ciência Rural*. 2005; 35(4):958-960. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000400038>. Portuguese
19. Harvey JW. *Anaplasma platys* infection (Thrombocytotropic Anaplasmosis). In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2012. p 256-258. English.

20. Albernaz AP, Miranda FJB, Melo Jr OA, Machado JA, Fajardo HV. Erliquiose canina em Campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. 2007; 8(4): 799-806. Portuguese
21. Dagnone AS, Morais HSA, Vidotto MC, Jojima FS, Vidotto O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2003; 117(4):285-290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.001>
22. Bulla C, Takahira RK, Araújo Jr JP, Trinca LA, Lopes RS, Wiedmeyer CE. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*. 2004; 35:141–146. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003038>
23. Nakaghi ACH, Machado RZ, Costa MC. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*. 2008; 38(3):766-770. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300027>.
24. Ueno TEH, Aguiar DM, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Ribeiro MG, Paes AC, Megid J, Labruna MB. *Ehrlichia canis* em cães atendidos no hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2009; 18(3):57-61. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01803010>. Portuguese
25. Sousa VRF, Bomfim TCB, Almeida ABPF, Barros LA, Sales KG, Justino CHS, Dalcin L. Coinfecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cães diagnosticada pela PCR. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2009; 37(3): 281-283. Portuguese
26. Castro MB, Machado RZ, Aquino LPCT, Alessi AC, Costa MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*. 2004; 119:73-86. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.012>
27. Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sanchez JL, Goldsmith CS, Wilson KH, Duntley CW. Isolation and Characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29(12):2741-2745.
28. Costa MP. Avaliação Hematológica de Sangue e Medula Óssea e Bioquímica Sérica de Cães Infectados Naturalmente por Hemoparasitos. 2014. 83f. Dissertação – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SMOC9MVGFN/disserta_o_mariana_d_e_p_dua_costa.pdf?sequence=1. Portuguese
29. Moreira SM, Bastos CV, Araújo RB, Santos M, Passos LMF. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2003; 55(2):141-147. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352003000200003>. Portuguese
30. Gaunt SD, Beall MJ, Stillman BA, Lorentzen L, Diniz PPVP, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*. 2010; 3:33. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-33>.
31. Kallick CA. Ehrlichia and bone marrow cells: could ehrlichial infection explain the unsuspected etiology of some diseases of the immune system? *Medical Hypotheses*. 2011; 77(3):374-379. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.05.019>
32. De Tommasi AS, Baneth G, Breitschwerdt EB, Dantas-Torres F, Otranto D, de Caprariis D. *Anaplasma platys* in bone marrow megakaryocytes of young dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014; 52: 2231-2234. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00395-14>
33. Stillman BA, Monn M, Liu J, Thatcher B, Foster P, Andrews B, Little S, Eberts M, Breitschwerdt E, Beall M, Chandrashekar R. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 2014; 245:80–86. <https://doi.org/10.2460/javma.245.1.80>

34. Chandrashekar R, Mainville CA, Beall MJ, O'Connor T, Eberts MD, Alleman AR, Gaunt SD, Breitschwerdt EB. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. American Journal of Veterinary Research. 2010; 71(12):1443–50. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.12.1443>
35. Suksawat J, Xuejie Y, Hancock SI, Hegarty BC, Nilkumhang P, Breitschwerdt EB. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector borne pathogens in dogs from Thailand. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2001; 15(5):453-462. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2001.tb01574.x>