

LUCILENE DOS SANTOS SILVA

Erliquiose e anaplasrose canina em Teresina, Piauí

TERESINA/PI

2010

LUCILENE DOS SANTOS SILVA

Erliquiose e anaplasrose canina em Teresina, Piauí

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

TERESINA/PI

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

S586e Silva, Lucilene dos Santos.

Eriquiose e anaplasrose canina em Teresina, Piauí
[manuscrito] / Lucilene dos Santos Silva. – 2010.

92 f.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2010.

“Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa
Silva”.

LUCILENE DOS SANTOS SILVA

Erliquiose e anaplasmosose canina em Teresina, Piauí

Dissertação aprovada em: 16/04/2010

Banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva – CCA/UFPI

Orientadora

Prof. Dr. Fábio Henrique Evangelista de Andrade – CCA/UEMA

Examinador Externo

Prof.^a. Dr.^a. Maria do Socorro Pires e Cruz – CCA/UFPI

Examinadora Interna

DEDICO

“Ao meu pai, João de Sousa, “in memoriam”, exemplo de força, luta, dignidade e determinação, sentir sua presença a meu lado me encoraja a seguir em frente”.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, meu alicerce e meu refúgio.

Aos cães que fizeram parte desta pesquisa sem os quais a mesma não teria sido desenvolvida.

À minha orientadora, prof^a. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva, por despertar meu interesse por pesquisa, pela orientação, visão crítica e seu exemplo de determinação.

À prof^a. Dr^a. Socorro Pires, pelo auxílio e orientações referentes à biologia molecular, imprescindíveis para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, pelo apoio e pelos momentos de descontração que o seu humor proporciona.

Ao Dr. João Pessoa Araújo Júnior, por ter gentilmente cedido os controles positivos usados nas reações e nos orientado quanto ao oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

À prof^a. Dr^a. Ana Maria Quessada, pelo apoio, conselhos, carinho e por me incluir em suas orações nos momentos difíceis que enfrentei.

Ao prof. Antonio Francisco de Sousa pelo auxílio na realização dos bioquímicos.

Ao prof. Dr. João Macedo de Sousa pelo apoio nas coletas do HVU.

Aos professores Dr. João Batista Lopes e João Batista Teles pelo auxílio na parte referente à estatística.

Aos colegas do Setor de Patologia Animal/CCA/UFPI: Aline, Ana Lys, Chico Leite, Edson, Fernando, Geórgia, Gustavo, Karina, Kleverton, Larissa, Luciano, Nilton, Prianti, Sammya e Simone, pelos bons momentos de convivência e, agradeço especialmente à meus colaboradores Ciro, Flaviane, Lidiany e Juliana, essas garotas, de tanto auxílio e dias e noites de convivência hoje são mais que colaboradoras, são minhas amigas.

Agradeço especialmente à amiga Flaviane por sempre me socorrer no que estiver ao seu alcance, você é o maior exemplo de coragem e determinação que conheço.

A minha adorável mãe, pelas suas orações e pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu Pai (“in memoriam”), por entender minha ausência em momentos em que eu deveria estar presente.

Aos meus amados, esposo Welington Marques pelo amor, cooperação e aceitação e, meus filhos Mateus e Marina, pela compreensão em suportar os inúmeros dias e diversas noites de ausência para realização desta pesquisa.

Aos meus queridos irmãos, Cruz, Vera, Célia, Júnior, Gorete, Gardel e Nayara pelo apoio, carinho e pelos momentos de descontração.

Aos meus cunhados, sogros, sobrinhos e amigos pelo apoio e incentivo.

A Emilia Batista, serei eternamente grata por ser a segunda mãe de meus filhos em minha ausência todos esses anos.

As amigas Etelvina Nunes, sempre disposta a ouvir, aconselhar, a rir e chorar comigo, se necessário e Mercilane Mota, que mesmo à distância sempre me apoia.

Aos amigos Caroline Fernanda, Roney, Juliana Moura e Nilton Andrade, pelo imenso apoio prestado nas coletas realizadas nas clínicas veterinárias.

A toda a equipe que forma o Hospital Veterinário Universitário da UFPI, diretor, médicos veterinários, graduandos, estagiários, equipe da Patologia Clínica e demais funcionários, pelo apoio e amizade, especialmente aos enfermeiros Sanatiel e James, pela ajuda prestada e pelos vários momentos de descontração que me proporcionaram durante as coletas.

Aos professores e funcionários da Pós-graduação em Ciência Animal da UFPI, e aos funcionários do Setor de Patologia Animal/UFPI.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro, fundamental para realização desta pesquisa.

A todos que, de algum modo contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

“As coisas que queremos e parecem impossíveis só podem ser conseguidas com uma teimosia pacífica”

Mahatma Gandhi

“Vai dar certo, se não der certo, é porque ainda não chegou o fim”

João de Sousa

SILVA, Lucilene S.; PINHO, Flaviane A.; PIRES, Lidiany V.; BRAGA, Juliana F. V.; SOUSA, Antonio F.; CRUZ, Maria S. P.; COSTA, Francisco A. L.; ARAÚJO JÚNIOR, João P.; SILVA, Silvana M. M.S. Erliquiose e anaplasrose canina em Teresina, Piauí [Canine ehrlichiose and anaplasmosis in Teresina, Piauí] *Veterinary Parasitology*.

Poucos são os estudos relacionados à epidemiologia da erliquiose e anaplasrose caninas no nordeste do Brasil. No Piauí, particularmente em Teresina, ainda não se tem dados concretos sobre a prevalência dessas afecções. Os agentes dessas doenças são *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*. A erliquiose destaca-se na clínica veterinária por ser mais patogênica ao animal e por ser uma zoonose. Os sinais clínicos variam com a severidade da infecção, a resposta imune do hospedeiro e a presença de co-infecção com outros patógenos. Assim, buscamos avaliar em 270 animais, atendidos no HVU-UFPI e clínicas particulares da cidade de Teresina, Piauí, Brasil, a frequência de erliquiose e anaplasrose caninas independente dos sinais clínicos, sexo, raça, idade e suspeita clínica. Em todos os animais foram realizados exame clínico e colhidas amostras sanguíneas para exames hematológico, bioquímico, parasitológico e molecular. Dos 270 cães avaliados, a *E. canis* teve o DNA amplificado em 29,63% (80/270) das amostras, e destas 30% (24/80) estavam mono-infectados com *E. canis*. No caso de *Anaplasma platys* houve amplificação de DNA em amostras sanguíneas de 41,48% (112/270) dos cães, sendo que ocorreu mono-infecção por *A. platys* em 42,86% (48/112) destes. Foram visualizadas mórulas sugestivas de *E. canis* no exame parasitológico de 4,44% (12/270) dos animais, sendo cinco destes nPCR negativos. Quanto às mórulas de *A. platys*, foram observadas em 2,22% (6/270) dos animais, sendo todos eles nPCR positivos. A concordância entre o parasitológico e a nPCR foi baixa em ambas as infecções. Nos cães infectados por *A. platys*, a linfadenopatia foi o único achado associado significativamente à positividade pela nPCR. A trombocitopenia foi a alteração hematológica associada à positividade pela nPCR nos cães infectados por *E. canis*. Dos cães estudados, 73,33% (198/270) apresentaram mono ou co-infecção pelos microrganismos *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* ou *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo o diagnóstico de infecção por *E. canis* e *A. platys* realizado por meio de nPCR e de infecção por *Leishmania (L.) chagasi* através de exame parasitológico para observação de formas amastigotas. Concluímos que *E. canis* e *A. platys* são agentes infecciosos importantes em cães na cidade de Teresina, Piauí. E, que ainda existem dificuldades no diagnóstico diferencial com outras parasitoses endêmicas nessa região. Portanto, destacamos aqui a relevância dos estudos voltados a epidemiologia e melhoria dos testes diagnósticos para prevenção e controle dessas doenças.

Palavras-chave: erliquiose, anaplasrose, cão, Reação em Cadeia da Polimerase.

SILVA, Lucilene S.; PINHO, Flaviane A.; PIRES, Lidianny V.; BRAGA, Juliana F. V.; SOUSA, Antonio F.; CRUZ, Maria S. P.; COSTA, Francisco A. L.; ARAÚJO JÚNIOR, João P.; SILVA, Silvana M. M. S. Canine ehrlichiose and anaplasmosis in Teresina, Piauí [Erlíquiose e anaplasmosse canina em Teresina, Piauí] Veterinary Parasitology.

There are few studies regarding the epidemiology of canine ehrlichiosis and anaplasmosis in northeastern Brazil. In Piauí, particularly in Teresina, there is still no concrete data about the prevalence of these diseases. These distemper are caused by *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*. The ehrlichiosis stands out in veterinary clinic to be more pathogenic to animals and being a zoonosis. Clinical signs can change with severity of infection, host immune response and presence of co-infection with other pathogens. Thus, we sought to evaluate in 270 animals, independent of clinical signs, attended at HVU-UFPI and private clinics in Teresina-Piauí-Brazil, the frequency of canine ehrlichiosis and anaplasmosis, regardless of gender, breed, age and clinical suspicion. From all animals, clinical exams and blood samples were collected for hematological, biochemical, parasitology and molecular examination. From 270 dogs examined, *E. canis* DNA was amplified in 29.63% (80/270) of them, among which only 30% (24/80) were mono-infected by *E. canis*. *Anaplasma platys* was detected in blood samples of 41.48% (112/270) of dogs, and mono-infection by *A. platys* occurred in 42.86% (48/112) of these animals. Morulae suggestive of *E. canis* were seen on parasitologic examination of 4.44% (12/270) of animals, five of which were negative by nPCR. Morulae of *A. platys* were observed in 2.22% (6/270) of animals, all them positive by nPCR. The agreement between parasitologic and nPCR examinations was low in both infections. In dogs infected by *A. platys*, lymphadenopathy was the single clinical sign significantly associated with animals positive on nPCR. Thrombocytopenia was the only hematological change associated with dogs infected by *E. canis* at nPCR. Among the dogs sampled, 73.33% (198/270) of the animals presented mono or co-infection by *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* or *Leishmania (Leishmania) chagasi*. While the diagnosis of infection by *E. canis* and *A. platys* was performed by nPCR, *Leishmania (L.) chagasi* infection was confirmed by parasitological examination with observation of amastigotes. We conclude that *E. canis* and *A. platys* are important infectious agents in dogs in the city of Teresina, Piauí and there are still some difficulties on differential diagnosis with other parasitic diseases endemic in this region. Therefore, we highlight the relevance of studies on the epidemiology and improvement of diagnostic tests for more effective prevention and control of these diseases.

Keywords: erlichiosis, anaplasmosis, dog, Polimerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Análise dos produtos de nPCR utilizando *primers* específicos para a região 16S rRNA de *Ehrlichia canis* visualizada em gel de agarose a 1,5%. Tamanho do produto de amplificação 390 pb. Amostras 1E-2E; 4E-6E; 8E; 10E; 12E-13E animais positivos35
- FIGURA 2 - Análise dos produtos de nPCR utilizando *primers* específicos para a região 16S rRNA de *Anaplasma platys* visualizada em gel de agarose a 1,5%. Tamanho do produto de amplificação 384 pb. Amostras 1A-2A; 4A-6A; 8A; 10A; 12A-13A animais positivos35
- FIGURA 3 - Mórula de *Ehrlichia sp* em monócito observada em esfregaço de sangue periférico de cão naturalmente infectado. Aumento: 100x36
- FIGURA 4 - Mórulas de *Anaplasma platys* em plaquetas observadas em esfregaço de sangue periférico de cão naturalmente infectado. Aumento: 100x.....37
- FIGURA 5 - Frequência dos sinais clínicos em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*39
- FIGURA 6 - Linfonodo poplíteo. Linfadenopatia em cão da raça Pastor Alemão naturalmente infectado por *Ehrlichia canis*.....39
- FIGURA 7 - Apatia e epistaxe em cão da raça Pastor alemão naturalmente infectado por *Ehrlichia canis*40
- FIGURA 8 - Frequência dos sinais clínicos em cães naturalmente infectados por *Anaplasma platys*41
- FIGURA 9 - Cão da raça Fila naturalmente infectado por *Anaplasma platys* apresentando infestação por *Rhipicephalus sanguineus*41
- FIGURA 10 - Cão da raça Fila naturalmente infectado por *Anaplasma platys* com mucosa oral hipocorada42
- FIGURA 11 - Co-infecção por *Leishmania sp* e *Ehrlichia canis* em cão naturalmente infectado. Formas amastigotas de *Leishmania sp* observados em aspirado de medula óssea esternal. Aumento: 100x.....46
- FIGURA 12 - Co-infecção por *Toxoplasma gondii* e *Ehrlichia canis* em cão naturalmente infectado. Formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* observados em aspirado de medula óssea esternal. Aumento: 100x47

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Faixa etária de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 200938
- TABELA 2 - Raças de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 200938
- TABELA 3 - Alterações hematológicas em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 200943
- TABELA 4 - Associação entre alterações hematológicas e a positividade pela nPCR para *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 200944
- TABELA 5 - Alterações bioquímicas em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Teresina, Piauí, no período de março de 2008 a novembro de 200945
- TABELA 6 - Distribuição segundo o tipo de infecção de cães de população hospitalar em Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 200945

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP – Alanina Amino Transferase

AST - Aspartatoaminotransferase

CCA - Centro de Ciências Agrárias

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DCCV – Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

DMV – Departamento de Morfofisiologia Veterinária

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-ácetico

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)

EMC – Erliquiose Monocítica Canina

FA – Fosfatase Alcalina

HIV – Vírus da Imunodeficiência adquirida

HVU – Hospital Veterinário Universitário

IFI – Imunofluorescência Indireta

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

µL – Microlitros

nPCR – Nested Polimerase Chain Reaction

pb – Pares de bases

PCR – Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PT – Proteínas Totais

SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear

SRD – Sem Raça Definida

TCC – Trombocitopenia Cíclica Canina

TCLE – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TGP – Transaminase Pirúvica

UEMA – Universidade Estadual do Maranhão

UFPI – Universidade Federal do Piauí

µg – microgramas

UV – Ultravioleta

χ^2 – Qui-quadrado

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 | ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA..... | 18 |
| 2.2 | ANAPLASMOSE CANINA (TROMBOCITOPENIA CICLICA CANINA) | 23 |
| 3 | CAPÍTULO I: “Frequência, avaliação clínica e laboratorial de cães infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> no Piauí, Brasil” | 26 |
| 3.1 | ABSTRACT..... | 27 |
| 3.2 | INTRODUÇÃO..... | 28 |
| 3.3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 3.3.1 | AMOSTRAS..... | 30 |
| 3.3.2 | COLETA DE SANGUE E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 30 |
| 3.3.3 | PREPARO DE ESFREGAÇO SANGUÍNEO PARA PESQUISA DE <i>Ehrlichia sp</i> , <i>Anaplasma platys</i> e outros parasitos... | 31 |
| 3.3.4 | AVALIAÇÃO CLÍNICA..... | 31 |
| 3.3.5 | ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS..... | 31 |
| 3.3.6 | ANÁLISE DOS ESFREGAÇOS..... | 31 |
| 3.3.7 | EXTRAÇÃO DE DNA..... | 32 |
| 3.3.8 | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E NESTED-PCR (n-PCR)..... | 32 |
| 3.3.8.1 | OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES..... | 32 |
| 3.3.8.2 | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E NESTED-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE <i>E. canis</i> | 32 |
| 3.3.8.3 | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E NESTED-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE <i>A. platys</i> | 33 |
| 3.3.9 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 34 |
| 3.4 | RESULTADOS..... | 34 |
| 3.5 | DISCUSSÃO..... | 47 |
| 3.6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 57 |
| 4 | CONCLUSÕES | 69 |
| 5 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA | 70 |
| | ANEXO | 79 |
| | APÊNDICE | 81 |

1 INTRODUÇÃO

O estudo das doenças infecciosas que acometem canídeos envolve uma série de fatores que por vezes podem dificultar o diagnóstico definitivo. Entre esses, o principal é a escassez de técnicas diagnósticas presente ainda em boa parte do Brasil, que força os clínicos veterinários a se basearem em achados laboratoriais e nas manifestações clínicas para determinação da terapêutica adequada a seus pacientes. No entanto, em muitas enfermidades, os sinais clínicos manifestados pelo animal numa fase inicial são inespecíficos, tais como apatia, anorexia, emagrecimento e febre, como ocorre na erliquiose canina, na leishmaniose visceral canina e em outras enfermidades.

Erliquiose e anaplasose são doenças infecciosas causadas por bactérias Gram negativas, pertencentes à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, que foram reclassificados em 2001 com base em descobertas de similaridades entre diversos organismos rickettsiais e em informações referentes aos genes 16S rRNA e groESL (DUMLER et al., 2001).

Infecções riquetsiais já foram consideradas espécie-específicas, no entanto, hoje se sabe que podem acometer mais de uma espécie. Além da *Ehrlichia canis*, a *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys* e *Neorickettsia risticii* podem infectar canídeos (MACHADO, 2004), sendo a *E. canis* e *A. platys* as principais espécies apontadas como causadores de erliquiose canina e as mais descritas no Brasil. Entretanto, *E. canis* é a mais comum e causa quadro clínico mais grave (WANER et al., 1995).

Poucos são os estudos relacionados à prevalência da erliquiose e anaplasose caninas no Brasil. Embora sejam seus agentes os mais relatados em infecções caninas, ainda não se sabe ao certo a extensão dessas doenças nos diferentes estados brasileiros e quais regiões são endêmicas para essas enfermidades. No Piauí, particularmente em Teresina, uma região favorecida pelo clima para a reprodução do vetor de *E. canis* e *A. platys*, não existem dados concretos sobre a prevalência dessas afecções, o que torna importante nosso estudo em analisar o foco e distribuição dessas doenças em nossa cidade, até porque a erliquiose pode trazer graves conseqüências ao animal quando não tratado, sobretudo quando há co-infecção com anaplasose.

Vale ressaltar que as descobertas da erliquiose granulocítica humana, da *Ehrlichia sennetsu* (“febre sennetsu”) e o isolamento da *Ehrlichia chaffeensis* em seres humanos, mostraram que a erliquiose não é apenas um problema médico veterinário (McDADE, 1990; ANDERSON et al., 1991; RIKIHISA, 1991; ANDERSON et al., 1993; BAKKEN et al.,

1994; CHEN et al., 1994; FISHBEIN et al., 1994). De acordo com Nicholson et al (2010) cães e humanos estão expostos e são susceptíveis a infecção por muitos patógenos bacterianos da ordem Rickettsiales transmitidos por carrapatos, incluindo *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Rickettsia rickettsii* e *R. conorii*.

Frente à grande importância da erliquiose e anaplasmoses, tanto na clínica veterinária como também, por serem consideradas zoonoses, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre os aspectos que envolvem a cadeia epidemiológica desses parasitas com o objetivo de buscar ferramentas para o controle da doença e garantir a qualidade da saúde pública.

Outra problemática que dá respaldo ao estudo dessas afecções e que torna mais complexa a análise clínica dos animais suspeitos é quando a doença ocorre em regiões endêmicas para outras enfermidades com quadro clínico semelhante e que tem grande relevância tanto na saúde animal como na humana, como por exemplo, a leishmaniose visceral canina (LVC). Teresina é palco dessa zoonose, uma enfermidade grave e que promove manifestações clínicas semelhantes, principalmente em cães infectados por *E. canis*. Logo, conhecer a prevalência dessas afecções e quais manifestações clínicas são importantes para o diagnóstico diferencial entre as mesmas, possibilita ao médico veterinário um diagnóstico seguro e precoce, portanto, levando a um prognóstico satisfatório.

Assim, buscamos avaliar em 270 cães atendidos no HVU-UFPI e clínicas particulares da cidade de Teresina, Piauí, independente das suspeitas clínicas, a frequência de erliquiose e anaplasmoses caninas e avaliar clinicamente os animais infectados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) causada pela espécie *Ehrlichia canis* foi primeiramente descrita em 1935, na Argélia por Donatien e Lestoquard (1935) onde, analisando esfregaços sanguíneos de cães febris e anêmicos infestados por *Rhipicephalus sanguineus*, observaram a presença de pequenos organismos semelhantes a rickettsias no interior de monócitos, denominando-os de *Rickettsia canis*. Em 1945, a espécie foi renomeada por Moshkovsky para *Ehrlichia canis* em homenagem a Paul Ehrlich, um famoso bacteriologista alemão (McDADE, 1990). Durante a guerra do Vietnã ocorreu um surto de erliquiose em cães da Armada Americana vitimando cerca de 300 cães que desenvolveram enfermidade hemorrágica fatal então denominada de Pancitopenia Tropical Canina (HUXSOLL et al., 1970), fato que tornou enfermidade reconhecida mundialmente como uma doença infecciosa importante de cães e outros membros da família *Canidae* (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978).

Há muito tempo, a EMC já recebeu diversas denominações, tais como: Pancitopenia Tropical Canina (HUXSOLL et al., 1970; SMITH et al., 1976; KELCH, 1984), Riquetsiose canina, Tifo do carrapato canino, Febre Hemorrágica Canina, Afecção hemorrágica de Nairóbi (WANER; HARRUS, 2000), Síndrome Hemorrágica Idiopática, Moléstia do cão rastreador (GREENE; HARVEY, 1990).

A EMC é uma doença descrita mundialmente, principalmente em áreas de clima tropical e subtropical (WANER et al., 2001; MYLONAKIS; KOUTINAS; BILINIS, 2003), onde é comum a presença do vetor, o *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como carrapato vermelho do cão (COHN, 2003).

No Brasil, a presença de *E. canis* foi relatada pela primeira vez em Belo Horizonte (COSTA et al., 1973), posteriormente, por Carrillo et al. (1978) em cães militares do Rio de Janeiro e em 1978 por Maregati, em Jaboticabal-SP (citado por KAVINSKI et al., 1988). Desde então, a EMC vem sendo relatada em vários estados, acometendo aproximadamente 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003). No Piauí, os estudos relacionados a erliquiose canina são escassos. Acredita-se que a ocorrência desta enfermidade no Estado seja alta, visto que o clima é muito favorável à proliferação dos carrapatos. No entanto, o diagnóstico desta enfermidade ainda é apenas presuntivo, baseado somente nos sinais clínicos

e alterações hematológicas. Pires et al. (2008), avaliando 65 cães enfermos com sintomatologia sugestiva de erliquiose em Teresina, observou a presença de mórulas intracitoplasmáticas em monócitos sugestivas de *Ehrlichia* sp. em 13,8% dos animais.

Os principais animais acometidos por *E. canis* são os membros da família *Canidae*, que inclui os cães, lobos e chacais (RIKIHISA, 2000) e a infecção pode ser fatal, tanto para os cães domésticos, quanto para os outros canídeos (WANER; HARRUS, 2000). De acordo com Elias (1991), todas as raças e idades podem ser atingidas, entretanto, a raça Pastor Alemão é considerada mais susceptível.

A transmissão de *E. canis* ocorre durante o parasitismo por ninfas e/ou adultos do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, embora existam alguns relatos de transmissão da *E. canis* pelo *Amblyomma americanum* (ANZIANI et al., 1990), e transmissão experimental bem sucedida por *Dermacentor variabilis* (JOHNSON et al., 1998). Além disso, esse organismo está entre os mais comuns na transmissão por transfusão sanguínea (REINE, 2004; NYSSA, 2004).

O carrapato infecta-se no momento do repasto sanguíneo, ao se alimentar em um cão contaminado (McDADE, 1990), e mantém a bactéria por transmissão transtadial, não ocorrendo transmissão transovariana de *E. canis* em carrapatos, portanto, as larvas de *R. sanguineus* não são importantes diretamente na transmissão, porém podem se infectar pelo agente, mantendo-o até o estágio adulto. Em estudo experimental, o referido autor, demonstrou que machos adultos de *R. sanguineus*, sem a presença da fêmea, podem se infectar e transmitir (transmissão intraestadial) a doença a diferentes cães de um mesmo local.

O ciclo da *E. canis* se inicia quando esse agente é inoculado por um carrapato infectado durante o repasto sanguíneo. A bactéria penetra nas células mononucleares sob a forma de corpúsculos elementares (SANTARÉM, 2003) que são as formas individuais do parasito. Uma vez inoculados na circulação, entram nos monócitos. Ao contrário das riquetsias, as *Ehrlichias* se replicam dentro de fagossomos da célula hospedeira, a fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, permitindo aos corpúsculos elementares, crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo nas células hospedeiras infectadas por divisão binária. As inclusões intracelulares formadas pelas *Ehrlichias* no hospedeiro são denominadas de mórulas e são observadas nos leucócitos na fase aguda da infecção, em pequeno número e por curto período de tempo. Cada mórula contém vários corpos elementares, os quais são liberados com o rompimento da célula e irão infectar outras células iniciando um novo ciclo (McDADE, 1990).

O desenvolvimento da EMC compõe-se em três fases: aguda, subclínica e crônica, no entanto, numa infecção natural normalmente essas fases não são bem distinguíveis. A fase aguda inicia-se 1 a 3 semanas após a infecção e dura 2 a 4 semanas (NELSON; COUTO, 2001). Nesta fase as células mononucleares infectadas atingem outros órgãos, via corrente sanguínea, principalmente pulmões, rins e meninges e aderem-se ao endotélio vascular, levando a vasculite e a infecção tecidual subendotelial (BREITSCHWERDT, 2004). Os sinais clínicos, embora inespecíficos (MORAES et al., 2004; ORIÁ; PEREIRA; LAUS, 2004), são sugestivos e importantes, uma vez que em muitos locais esses sinais associados as alterações hematológicas ainda são a única ferramenta para se chegar ao diagnóstico. As alterações clínicas mais observadas incluem febre, letargia, anorexia, depressão, perda de peso, linfadenomegalia (BREITSCHWERDT, 2004), descarga óculo nasal, dispnéia e ataxia (WANER; HARRUS, 2000), além edema de membros, diáteses hemorrágicas, poliúria e/ou polidipsia e artrite (OLIVEIRA et al., 2000; NAKAGHI et al., 2004). Após a fase aguda o animal pode se curar ou entrar na fase subclínica, onde os sinais clínicos desaparecem, mas o agente se mantém no organismo. Esta fase pode persistir por anos.

Os microorganismos podem ser eliminados nos cães imunocompetentes (BREITSCHWERDT, 2004), enquanto que os cães com respostas imunológica insuficiente entrarão na fase crônica da doença. Esta pode variar de leve a severa. Quando severa, ocorre comprometimento da medula óssea com pancitopenia (MYLONAKIS et al., 2004). O animal pode apresentar depressão, apatia, perda de peso crônica, membranas mucosas pálidas, febre, e edema periférico, principalmente nas patas e bolsa escrotal, tendências a sangramentos, pneumonia intersticial, insuficiência renal e poliartrite (WANER; HARRUS, 2000). Outros sinais como linfadenopatia e esplenomegalia podem estar presentes (UENO et al., 2009). Os sinais clínicos presentes na erliquiose geralmente são devido à hiperplasia linforreticular disseminada e das alterações hematológicas, muitas vezes com hipoplasia medular na fase crônica (MOREIRA et al., 2003; MORAES et al., 2004).

As alterações hematológicas mais observadas na erliquiose canina são anemia não regenerativa, trombocitopenia e leucopenia (ALMOSNY et al., 2000), sendo que a trombocitopenia ocorre frequentemente em qualquer uma das fases da erliquiose e é considerada um bom indicador de infecção (BULLA et al., 2004), podendo ser decorrente de mecanismos diversos, como vasculite e aumento do consumo de plaquetas, presença de um fator inibidor da migração plaquetária, seqüestro de plaquetas pelo baço, além de supressão da medula óssea e trombocitopenia imunomediada (HARRUS et al., 1997b; WANER et al., 2001). Segundo Lewis (2000) em consequência à trombocitopenia persistente,

pode ocorrer diáteses hemorrágicas na erliquiose crônica grave. O número de leucócitos comumente varia durante a fase aguda, podendo diminuir em decorrência da indução ao seqüestro destes por mecanismos imunológicos (MOREIRA et al., 2003).

As alterações bioquímicas comumente encontradas são hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia e posterior hipoalbuminemia (CASTRO et al., 2004; WATANABE et al., 2005). Também podem estar presente elevações das atividades de aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e alaninaminotransferase (ALT) e discreta elevação dos níveis séricos de bilirrubina com suave icterícia (ALMOSNY, 2002), além de um aumento nas concentrações séricas de uréia, creatinina e fósforo (TROY; FORRESTER, 2006).

Alterações histológicas incluem infiltração perivascular generalizada de plasmócitos, mais pronunciada na fase crônica, além de meningoencefalite não supurativa e multifocal, pneumonia intersticial e glomerulonefrite (FRY; McGAVIN, 2009).

O diagnóstico da erliquiose canina é comumente realizado pela identificação direta de estruturas morfológicamente compatíveis com mórulas em amostras de sangue periférico, aliada a exames hematológicos (NAKAGHI et al., 2008). A presença de mórulas de *E. canis* é também evidenciada em esfregaços corados de punção aspirativa da medula óssea em cães naturalmente e experimentalmente infectados (SILVA, 2001; MOREIRA; MACHADO; PASSOS, 2005). Entretanto, embora a pesquisa de mórula seja uma técnica de baixo custo e rápida, as mórulas praticamente só são encontradas na fase aguda (CASTRO et al., 2004), o que limita bastante o diagnóstico e pode acarretar um elevado número de falso-negativos.

Diversos testes sorológicos na detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis*, tais como a Imunofluorescência têm sido utilizados no diagnóstico de *E. canis* (OLIVEIRA et al., 2000; HARRUS et al., 2002; ORIÁ; PEREIRA; LAUS, 2004; NAKAGHI et al., 2004) e *A. platys* (TAKAHIRA et al., 2003). No Brasil a Imunofluorescência Indireta (IFI) tem sido o método mais utilizado (ORIÁ; PEREIRA; LAUS, 2004; TAKAHIRA et al., 2003; NAKAGHI et al., 2004). Entretanto há resultados falso-negativos durante a janela de soro conversão (WEISIGER; RISTIC; HUXOLL, 1975) e falso-positivos, nos animais recém tratados, devido aos títulos continuarem altos por muito tempo após o tratamento (WEN et al., 1997). De acordo com Oliveira et al. (2000), tanto a IFI quanto o ELISA (Ensaio imunoenzimático) são qualitativamente eficientes na detecção de anticorpos anti-*E. canis*. Porém, diversos autores afirmam que o problema em comum dos testes sorológicos é que eles não possibilitam diferenciar a manutenção da resposta imune de uma re-exposição ao agente; além disso, são

observadas reações cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* (BARTSCH; GREENE, 1996; WEN et al., 1997; MUTANI; KAMINJOLO, 2001).

O re-isolamento de *E. canis* de células mononucleares do sangue e de tecidos é o teste mais sensível, entretanto, a cultura é uma técnica demorada, de alto custo e exige equipamento adequado para o cultivo celular (ANDEREG; PASSOS, 1999). Atualmente, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tem sido utilizada na pesquisa de *Ehrlichia* em sangue total. É uma técnica sensível e específica podendo ser empregada no diagnóstico a partir de amostras de sangue, necropsia ou material de biopsia (IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA, 1994). A PCR permite a detecção precoce da infecção (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). Variações desta técnica com o uso de uma reação de duas fases (nested-PCR) causam um aumento na sensibilidade e têm se mostrado também bastante específicas. Um estudo comparando nested-PCR e IFI, demonstrou que a primeira é muito sensível e específica e que sua importância é a possibilidade de diagnóstico para acompanhamento terapêutico, uma vez que o diagnóstico pode ser feito inclusive em animais recém-tratados (WEN et al., 1997). Além disso, o diagnóstico molecular utilizando a nested-PCR é capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia* (DAGNONE et al., 2003).

Duas espécies da família Anaplasmataceae têm sido descritas com causadoras de erliquiose humana, a *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum* (DAWSON et al., 2001) e a presença de *E. chaffeensis* em cães já foi demonstrada extensivamente por meio do diagnóstico pela técnica da PCR (KORDICK et al., 1999; BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998). Recentemente a espécie *E. ewingii* foi considerada um agente zoonótico emergente (THOMAS et al., 2007). Amostras de uma sub-espécie ou cepa de *E. canis* foram isoladas de humanos na Venezuela, sendo sugerido pelos autores o alto potencial de transmissão desse agente do cão para o homem (UNVER et al., 2001). Estudos afirmam que a erliquiose humana também pode ser causada por *E. canis* e *A. platys*, além das espécies já citadas (TAMÍ; TAMÍ-MAURY, 2004). Alguns autores afirmam que quase todas as espécies de *Ehrlichia* podem afetar os humanos e causar alguma sintomatologia (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Ainda não existe vacina contra a EMC (MACHADO, 2004) e o prognóstico depende da fase da doença, sendo favorável quando o animal é tratado adequadamente nas fases aguda e subclínica, exceto nos casos em que há hipoplasia da medula óssea (COUTO, 2003). Por outro lado a enfermidade pode ser potencialmente fatal em cães (WANER; HARRUS, 2000), o tratamento na fase crônica é difícil, em muitos casos necessita hospitalização prolongada, e

até transfusões sanguíneas (MYLONAKIS et al., 2004) e mesmo com todos esses cuidados o resultado é pouco satisfatório (SHIPOV et al., 2008).

Desta forma a prevenção da doença tem um caráter de suma importância, sobretudo nos cães e nos locais em grandes concentrações de animais e é realizada por meio do tratamento dos animais doentes e do controle do agente transmissor da doença. A utilização de produtos acaricidas no ambiente e nos animais é eficaz, desde que seja realizado o manejo correto (CORREA; CORREA, 1992). Além disso, os cães doadores de sangue deverão passar por triagem com testes sorológicos ou moleculares (REINE, 2004).

2.2 ANAPLASMOSE CANINA (TROMBOCITOPENIA CÍCLICA CANINA)

A anaplasmoose canina, também denominada Trombocitopenia Cíclica Canina (TCC), é causada pelo *Anaplasma platys*, um microorganismo intracelular obrigatório, que parasita unicamente plaquetas de cães, não sendo encontradas inclusões em megacariócitos ou qualquer outra célula precursora na medula óssea durante a parasitemia (ALMOSNY; MASSARD, 2002).

O primeiro relato da doença foi descrito por Harvey em 1978, na Florida, após observar a presença de estruturas basofílicas em plaquetas de animais trombocitopênicos. Assim como a *E. canis*, a *A. platys* forma inclusões semelhantes a mórulas (HARRUS et al., 1997b).

A. platys já foi descrito nos EUA, na Grécia, França, Itália, Israel, China, Japão, Tailândia e Venezuela (BROWN et al., 2001) e em várias regiões do Brasil (MACHADO, 2004). No Piauí, este agente ainda não foi relatado, pela dificuldade no diagnóstico, uma vez que a ferramenta mais utilizada é a pesquisa no esfregaço sanguíneo, e esta é pouco sensível para detecção desse parasita. No entanto, acreditamos que essa afecção possa ser prevalente em nossa região, baseados nas suspeitas constantes de infecção erliquial na rotina veterinária local, e em estudos que afirmam ser comum a co-infecção por *A. platys* e *E. canis* em regiões endêmicas (BREITSCHWERDT, 2004), sendo inclusive o *R. sanguineus* apontado por diversos autores como o transmissor também de *A. platys* (COHN, 2003; SUKSAWAT et al., 2001; SPARAGANO et al., 2003). Alguns estudos já detectaram o DNA de *A. platys* através da PCR tanto em *R. sanguineus* (INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000) quanto em carrapatos de outras espécies como *Ixodes ovatus* e *Haemophysalis flava* (INOKUMA et al., 2003).

A transmissão natural da anaplasmosose ocorre quando um carrapato infectado se alimenta em um animal susceptível transmitindo os microrganismos por meio das secreções salivares durante o momento da picada (PREZIOSI; COHN, 2002).

Estudos afirmam que esses organismos podem aparecer isolados, em pares ou em grupos, dentro de vacúolos. Através da realização de fissões binárias sucessivas formam inclusões caracterizando as mórulas (HIBLER; HOSKINS; GREENE, 1986; TROY; FORRESTER, 2006). Inokuma et al. (2002) observaram que nas plaquetas de cães infectados podem ser observados diferentes estádios de desenvolvimento de *A. platys*. Os mesmos autores, demonstraram através de microscopia eletrônica que o lisossomo se localizava próximo ao vacúolo contendo mórulas de *A. platys*, mas não tinha contato com as mesmas, indicando que a infecção por *A. platys* também impede a fusão dessas estruturas como já foi verificado na infecção por outras espécies de *Ehrlichia*.

A TCC é considerada como uma doença benigna sem graves sinais clínicos, embora alguns autores tenham relatado casos com sinais clínicos mais graves, similares na severidade aos associados com a infecção por *E. canis* (CHANG; PAN, 1996; INOKUMA et al., 2002). O período de incubação da doença varia de oito a 15 dias (WOODY; HOSKINS, 1991).

Durante a fase aguda da infecção há uma alta porcentagem de plaquetas infectadas no sangue circulante. Em alguns dias ocorre um decréscimo do número de plaquetas circulantes e a contagem pode chegar a valores até inferiores a 20.000 plaquetas/ μ L, neste momento, tornam-se mínimas as chances de visualização do parasita. Após o desaparecimento dos microrganismos, a plaquetometria volta ao normal em três ou quatro dias. Sete a quatorze dias após o primeiro episódio ocorre outra parasitemia na qual, novamente, o número de plaquetas decresce. Esta natureza cíclica das trombocitopenias e das parasitemias tende a diminuir com o tempo e com a cronificação da doença, o que resulta em esporádicas aparições do parasito e trombocitopenias moderadas (HIBLER; HOSKINS; GREENE, 1986; TROY; FORRESTER, 2006; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1989; WOODY; HOSKINS, 1991).

De acordo com Breitschwerdt (2004), em cães experimentalmente infectados foi observado trombocitopenia cíclica em intervalos de aproximadamente 10 a 14 dias, discreta anemia normocítica normocrômica arregenerativa, leucopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia.

Os métodos de diagnóstico laboratoriais mais utilizados para *A. platys* também são a pesquisa de mórulas em esfregaço sangüíneo, detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta e amplificação de DNA através da PCR. Técnicas essas que apresentam as mesmas

vantagens e desvantagens observadas no diagnóstico de *E. canis* (BREITSCHWERDT, 2004).

O prognóstico da TCC normalmente é favorável, visto que *A. platys* não é um microrganismo considerado patogênico. No entanto, vários autores afirmam que a infecção se agrava nos casos de co-infecção com outros organismos (por exemplo, *E. canis* e *Babesia canis vogeli*), que são comuns no Brasil (DANTAS-TORRES; FAUSTINO; ALVES, 2004; CASTRO et al., 2004; LABRUNA et al., 2007).

O carrapato *R. sanguineus* também é transmissor de outros hemoparasitas, sendo possível encontrar infecções mistas, com *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*, *Bartonella vinsonii* e *Hepatozoon canis* ou associada a outras espécies de *Ehrlichia* (BREITSCHWERDT et al., 2002). A erliquiose e anaplasmoze caninas podem ainda estar associadas a enfermidades que não sejam sabidamente veiculadas por carrapatos. Dentre estas, existe a possibilidade de co-infecção natural entre erliquiose e leishmaniose visceral canina (CORTESE et al., 2006). Ambas podem provocar distúrbios como epistaxe, hematúria e diáteses hemorrágicas (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; BULLA et al., 2004). Diversos sinais clínicos inespecíficos, tais como anorexia, emagrecimento, e linfadenopatia são observados tanto na erliquiose (HARRUS et al., 1997b), quanto na leishmaniose (BARBIÉRI, 2006; IKEDA et al., 2007), o que pode dificultar o diagnóstico em áreas endêmicas para LVC, como ocorre em Teresina.

Assim, como a LVC, provavelmente a erliquiose e anaplasmoze caninas são endêmicas no Piauí. Entretanto, ainda não se tem estudos que forneçam subsídios sobre a prevalência destas no Estado. Sendo, portanto, relevante para definir a situação destas enfermidades em nosso estado. Assim, esse estudo objetivou avaliar a frequência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães enfermos de Teresina, Piauí e avaliar clinicamente os animais infectados.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: uma introdução geral, revisão de literatura e objetivos, capítulo I contendo abstract, artigo completo, intitulado “**Frequência, avaliação clínica e laboratorial de cães infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* no Piauí, Brasil**” a ser encaminhado para publicação na Veterinary Parasitology estruturados de acordo com as normas da revista.

3 CAPÍTULO I

Frequência, avaliação clínica e laboratorial de cães infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* no Piauí, Brasil

Lucilene S. Silva¹, Flaviane A. Pinho¹, Lidiany V. Pires¹, Juliana F. V. Braga¹, Antonio Francisco de Sousa¹, Maria S. P. Cruz², Francisco A. L. Costa¹, João P. Araújo Júnior³,
Silvana M. M. S. Silva^{1*}

¹Departamento de Clínica e cirurgia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Campus Socopo – S/N, Teresina, Piauí, Brasil

²Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Campus Socopo – S/N, Teresina, Piauí, Brasil

³Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil

Endereço para correspondência:

*Silvana M. M. S. Silva, Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Setor de Patologia Animal. Campus da Socopo S/N, 64.049-550, Teresina-Piauí, Brasil

Tel. +55-86-3215-5760

Fax. +55-86-3215-5753

E-mail: silvanammss@ufpi.edu.br

3.1 Abstract

Studies related to epidemiology of canine ehrlichiosis and anaplasmosis do not exist in Teresina, Piauí, despite the high frequency of clinical suspicion and weather conditions propitious to vector tick. To evaluate the frequency of canine ehrlichiosis and anaplasmosis in this city, clinical exams and blood samples were collected for hematological, biochemical, parasitological and molecular examination from 270 animals, independent of clinical signs, gender, breed, age and clinical suspicion, attended at Hospital Veterinário Universitário of Universidade Federal do Piauí and private clinics in the city of Teresina-Piauí-Brasil. From 270 dogs studied, *E. canis* DNA was amplified in 29.63% (80/270) of blood samples, among which only 30% (24/80) were monoinfected with *E. canis*. In 41.48% (112/270) of dogs, *Anaplasma platys* DNA was detected and monoinfection by this agent occurred in 42.86% (48/112) of animals. In dogs infected by *A. platys*, lymphadenopathy was the only sign significantly associated to those animals positive at nPCR. Thrombocytopenia was the unique hematological change with significant association in dogs infected by *E. canis*. In this study, mono or co-infection by *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* or *Leishmania (Leishmania) chagasi* microorganisms was present in 73.33% (198/270) of animals. *E. canis* and *A. platys* diagnosis was performed by nPCR, while *Leishmania (L.) chagasi* infection was demonstrated by parasitological examination for observation of amastigotes. We conclude that *E. canis* and *A. platys* are significant infectious agents in dogs in the city of Teresina, Piauí and there are still some difficulties in differential diagnosis with other endemic parasitic diseases in this region. Moreover, we highlight the necessity of studies on epidemiology and improvement of diagnostic tests for more effective prevention and control of these diseases.

Keywords: erlichiosis, anaplasmosis, dog, co-infection, PCR

3.2 Introdução

A maioria dos cães encaminhados para atendimento clínico veterinário apresenta-se acometido por doenças infecciosas. Dentre essas, no Brasil, a erliquiose e anaplasmoze caninas vem merecendo atenção pelo grande número de animais suspeitos. A *Ehrlichia canis*, agente da Erliquiose Monocítica Canina (EMC), é uma bactéria gram-negativa pertencente à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (Torres et al., 2002). Outro agente pertencente a esta família que se destaca é *Anaplasma platys*, rickettsia intracelular obrigatória, que parasita unicamente plaquetas de cães (Almosny e Massard, 2002) e causa a Trombocitopenia Cíclica Canina (Dumler et al., 2001), atualmente denominada Anaplasmoze canina. Esses agentes possuem um vetor comum, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Dumler et al., 2001; Dagnone et al., 2003), o qual apresenta prevalência e intensidade de infestação crescentes em cães do país (Labruna, 2004), aumentando, assim, a possibilidade de co-infecção por esses agentes (Suksawat et al., 2001).

A EMC caracteriza-se pelas manifestações clínicas inespecíficas na fase aguda (Neer, 2002), incluindo febre, letargia, anorexia, depressão, perda de peso, linfadenomegalia (Breitschwerdt, 2004). As principais alterações hematológicas são anemia, trombocitopenia e leucopenia (Nakaghi et al., 2008; Almosny e Massard, 2002). Na fase subclínica os sinais clínicos desaparecem, mas a bactéria se mantém no organismo, esta fase pode persistir por anos e os cães imunocompetentes podem eliminar o microorganismo (Breitschwerdt, 2004). Os títulos de anticorpos estão elevados, entretanto, as alterações hematológicas são mais discretas (Andereg e Passos, 1999; Nakaghi et al., 2004) e na fase crônica, pode haver desenvolvimento de sintomas de comprometimento sistêmico e ocorrência de pancitopenia (Mylonakis et al., 2004).

A Anaplasmosose é considerada uma doença benigna sem graves sinais clínicos, embora haja relatos de maior gravidade quando associada com a infecção por *E. canis* (Chang e Pan, 1996; Inokuma et al., 2002a). Os sinais clínicos da doença são febre, depressão e anorexia (Rikihisa, 1991). Tanto na EMC como na Anaplasmosose, o principal achado clínico é a trombocitopenia (Harrus et al., 1997a,b).

As técnicas de diagnóstico utilizadas são as mesmas para todas as espécies conhecidas até o momento (Dagnone et al., 2001) e baseiam-se na pesquisa de mórulas em esfregaços sanguíneos (Moreira et al., 2005), além de testes sorológicos (Oriá et al., 2004; Machado, 2004) e diagnóstico molecular, utilizando-se principalmente o nested-PCR (Dagnone et al., 2003).

Co-infecção entre esses dois agentes tem sido relatadas e esse fato intensifica o curso clínico da erliquiose causada por *E. canis* (Breitschwerdt, 2004). É comum a co-infecção entre essas espécies e outros patógenos veiculados por carrapatos, tais como *Babesia canis* (Hua et al., 2000; Suksawat et al., 2001), além de *Hepatozoon canis*, e *Mycoplasma haemocanis* (Moreira et al., 2003). Por outro lado, são raros os estudos sobre co-infecção entre esses microrganismos e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, protozoário responsável pela Leishmaniose Visceral nas Américas, embora essa co-infecção seja uma suspeita frequente entre veterinários em áreas de clima favorável para infecção por esses patógenos, como é o caso de Teresina, PI e de praticamente todo o nordeste do Brasil.

Sabe-se que a cidade apresenta clima tropical e estações meteorológicas bem definidas (Medeiros, 2004), condições estas favoráveis ao desenvolvimento de *Rhipicephalus sanguineus*. Apesar disso, não há relatos de estudos que revelam a atual situação de infecção por *E. canis* e *Anaplasma platys* em cães desta cidade, embora seja comum a observação de cães infestados pelo carrapato vetor.

O aparecimento freqüente de animais no HVU e em clínicas veterinárias de Teresina com um quadro clínico sugestivo de erliquiose, a freqüente ocorrência de cães infestados por *R. sanguineus*, aliado a ausência de pesquisas sobre o comportamento biológico destas enfermidade no Piauí, motivaram o desenvolvimento deste estudo, o qual objetivou confirmar a infecção natural por *E. canis* e *A. platys* em cães de Teresina, Piau e realizar avaliação clínica e laboratorial dos cães infectados por esses agentes.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Amostras

Foram utilizados 270 cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí (HVU-UFPI) e clínicas particulares da cidade de Teresina, PI, no período de março de 2008 a novembro de 2009, independente de sexo, raça, idade e suspeita clínica, excetuando os cães que vinham apenas para vacinação, mediante protocolo aprovado pelo Comitê de Ética por nº 004/09 da Universidade Federal do Piauí.

3.3.2 Coleta de sangue e preservação das amostras

De cada animal foram colhidas três amostras sanguíneas, por venopunção jugular, duas em tubos a vácuo de polipropileno com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), uma para análise hematológica e outra armazenada em freezer a – 20° C para posterior extração de DNA e realização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). A terceira amostra era colhida em tubos à vácuo sem anticoagulante, para realização das análises bioquímicas.

A coleta das amostras biológicas foi realizada mediante a autorização dos proprietários por intermédio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) devidamente assinado (apêndice 2).

3.3.3 Preparo de esfregaço para pesquisa de *Ehrlichia* sp, *Anaplasma platys*, e outros parasitos de identificação por método direto

Dos cães inclusos neste estudo, foram confeccionados três esfregaços de sangue periférico obtidos pela perfuração de capilares da orelha dois esfregaços de medula óssea esternal e dois de aspirados de linfonodo poplíteo, os quais foram fixados em álcool metílico, corados com Giemsa e secados em temperatura ambiente para a pesquisa de mórulas de *Ehrlichia* sp em leucócitos, *Anaplasma platys* em plaquetas e de outros possíveis parasitos.

3.3.4 Avaliação clínica

Os cães eram submetidos a exame clínico detalhado e os dados referentes à procedência, raça, sexo, idade e sinais clínicos observados foram descritos em uma ficha clínica (apêndice 1).

3.3.5 Análises hematológicas e bioquímicas

As análises hematológicas e as bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HVU-UFPI. Para o hemograma utilizou-se a técnica automatizada em equipamento Vet ABC, e a contagem diferencial de leucócitos realizada a partir da observação de esfregaço sanguíneo corado com método de May-Grunwald-Giemsa. As dosagens bioquímicas para determinação das concentrações séricas de TGP/ALT, uréia, creatinina, proteína total, albumina e globulina foram realizadas utilizando kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), conforme recomendações do fabricante.

3.3.6 Análises dos esfregaços

As lâminas de esfregaço de sangue periférico, aspirados de linfonodo poplíteo e de medula óssea esternal foram analisadas no Setor de Patologia Animal/UFPI, através de

microscopia de luz, utilizando objetiva com aumento 100x para avaliação da presença de mórulas em leucócitos e plaquetas, e de outros parasitos detectados por pesquisa direta.

3.3.7 Extração de DNA

Para extração de DNA das amostras de sangue, utilizou-se o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, etapa essa realizada no Setor de Patologia Animal CCA/UFPI.

3.3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR (nPCR)

3.3.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para a realização do “nested” PCR. As seqüências estavam de acordo com Wen et al. (1997). Para detecção de *E. canis*, as seqüências utilizadas na primeira fase da reação (PCR) foram “EC1 sense” 5’ AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC 3’ e o “EC1 antisense” 5’ CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 3’ e para a segunda fase da reação (nPCR), o “EC2 sense” 5’ CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA 3’ e o “EC2 antisense” 5’ TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT 3’. A reação de PCR para obtenção do DNA de *Anaplasma platys* foi processada também em duas fases, a primeira seguindo as mesmas condições descritas para *E. canis* (Wen et al., 1997). Na segunda fase os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: A1 sense 5’ TTTTGTTCGGAGCTTGCTATGATA 3’ e o A2 antisense 5’ TGTGGGTACCGTCATTATCTTCCCCA 3’ (INOKUMA et al., 2002).

3.3.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR (nPCR) para amplificação de *E. canis*

Foram utilizadas para uma reação com volume total de 25µL, uma mistura de 0,625U de enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, EUA), 1,5mM MgCL₂, 1x Taq buffer, 0,2mM de dNTP (Invitrogen®, EUA), 400 nM de primers e 15,05 de água Milli Q autoclavada por reação. A amplificação foi realizada em termociclador automático (Bioer Gene pro®) utilizando as seguintes etapas: 94°C por cinco minutos, posteriormente uma seqüência de 40 ciclos: 94°C por um minuto, de 60°C por um minuto e de 72°C por um minuto e, um ciclo final de cinco minutos a 72°C. Os ciclos das reações foram semelhantes para as duas fases, com diferença apenas pelos pares de oligonucleotídeos iniciadores que foram “EC1 sense” e “EC1 antisense” para a primeira fase e “EC2 sense” e “EC2 antisense” para o “nested” PCR (Wen et al., 1997).

3.3.8.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR (nPCR) para amplificação de *A. platys*

Para amplificação do DNA de *A. platys*, foram utilizadas para um volume final de 25µL, uma mistura de 400nM de primers, 0,6U de enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, EUA), 2mM MgCL₂, 1x Taq buffer, 0,1mM de dNTP (Invitrogen®, EUA), e 15,05 de água Milli Q autoclavada por reação. A amplificação foi realizada em termociclador automático (Bioer Gene pro®), sob as mesmas condições realizadas para amplificação da *E. canis* nas duas etapas. Os ciclos das reações foram semelhantes para as duas fases, sendo na primeira utilizados os mesmos primers “EC1 sense” e “EC1 antisense” e na segunda, os primers específicos A1 sense e A2 antisense (Inokuma et al., 2002b).

Os produtos obtidos da amplificação tanto de *E. canis* como de *A. platys* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e examinados comparativamente com marcadores de DNA de 100 pares de bases (bp). Foram considerados positivos para *E. canis* os de tamanho aproximado de 390 pares de bases (pb) e

para *A. platys* os de 384 pb. As leituras foram visualizadas em transluminador UV (BioAgency) e fotografadas em fotodocumentador (Bio- Imaging Systems) no Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Patologia Animal CCA/UFPI.

3.3.9 Análise estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada com base na associação entre os achados clínicos, exames laboratoriais e PCR. Calculou-se como medida de associação o teste do Qui-quadrado (χ^2) pelo software GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA) com intervalo de confiança de 95%. O teste Kappa foi realizado para avaliar a concordância entre o diagnóstico por meio da detecção de mórulas em esfregaços sanguíneos e a PCR.

3.4 Resultados

Dos 270 cães avaliados, 73,33% (198/270) apresentaram mono ou co-infecção, principalmente pelos microrganismos *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* ou *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo o diagnóstico da infecção por *E. canis* e *A. platys* realizado por meio de nPCR e infecção por *Leishmania (L.) chagasi* confirmada por meio do exame parasitológico pela observação de formas amastigotas deste protozoário nas lâminas confeccionadas.

A *E. canis* teve o DNA amplificado em 29,63% (80/270) das amostras (Figura 1), e destas, 30% (24/80) estavam mono-infectados por *E. canis*. No caso de *Anaplasma platys* houve amplificação de DNA em amostras sanguíneas de 41,48% (112/270) dos cães (Figura 2), sendo que ocorreu mono-infecção por *A. platys* em 42,86% (48/112) dos casos.

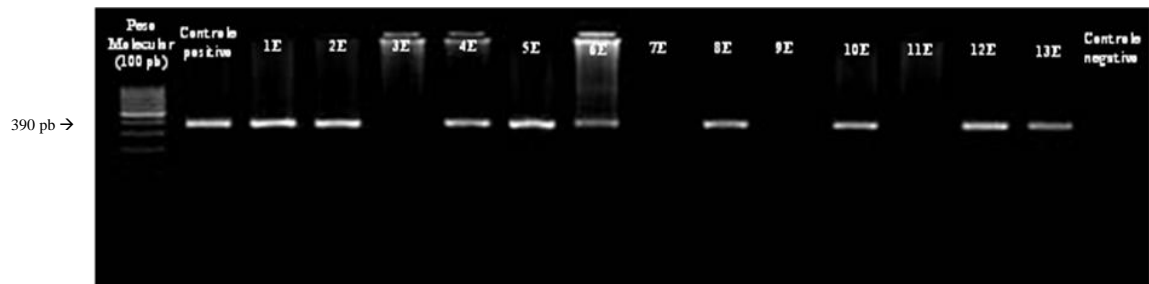


Figura 1. Análise dos produtos de nPCR utilizando *primers* específicos para a região 16S rRNA de *E. canis* visualizados em gel de agarose a 1,5%. Tamanho do produto de amplificação 390 pb. Amostras 1E-2E; 4E-6E; 8E; 10E; 12E-13E animais positivos.

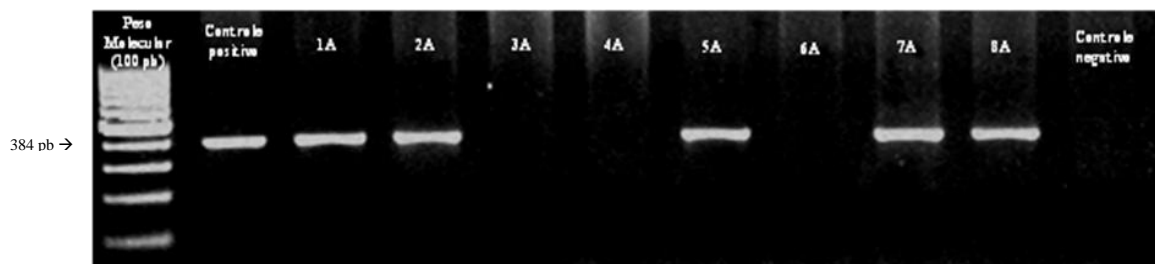


Figura 2. Análise dos produtos de nPCR utilizando *primers* específicos para a região 16S rRNA de *A. platys* visualizados em gel de agarose a 1,5%. Tamanho do produto de amplificação 384 pb. Amostras 1A-2A; 4A-6A; 8A; 10A; 12A-13A animais positivos.

Na análise dos esfregaços de sangue periférico e de medula óssea, foram visualizadas inclusões intraleucocitárias sugestivas de mórulas de *E. canis* em 4,44% (12/270) dos cães, sendo que 58,33% (7/12) destas mórulas foram observadas em esfregaços de sangue periférico (Figura 3) e 41,67% (5/12) em aspirado de medula óssea. No entanto, dos 80 animais positivos na nPCR para *E. canis*, apenas em 8,75% (7/80) foi observado mórulas no exame parasitológico. O teste Kappa demonstrou baixa concordância entre a pesquisa de mórulas e o resultado da nPCR ($k = 0,08$).

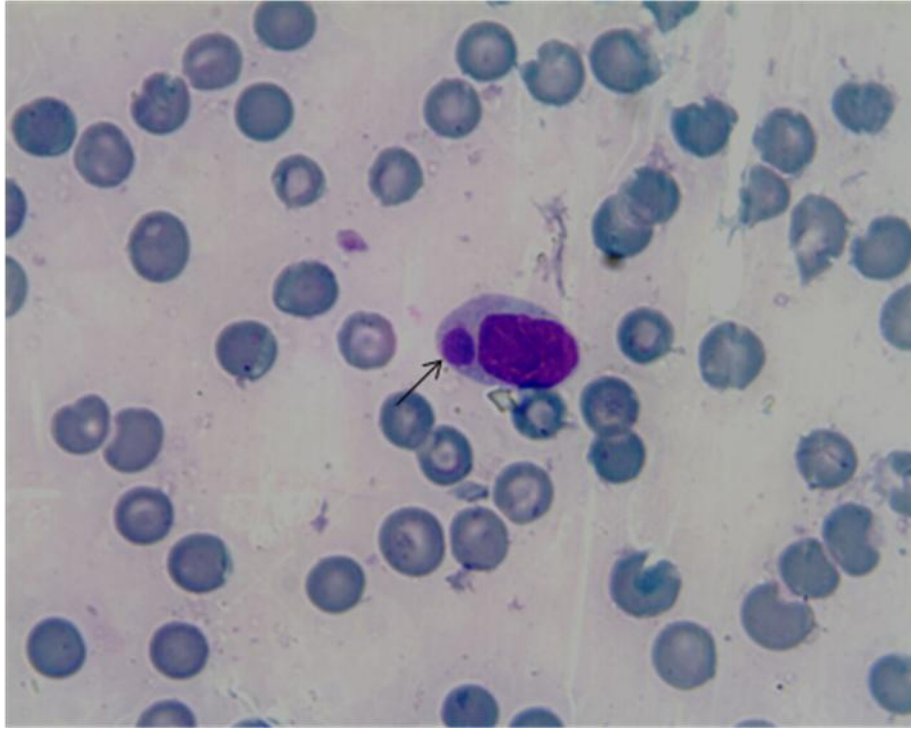


Figura 3. Mórula de *Ehrlichia sp* (→) em monócito observada em esfregaço de sangue periférico de cão naturalmente infectado. Aumento: 100x

Inclusões sugestivas de mórulas de *A. platys*, foram visualizadas em esfregaços de sangue periférico de 2,22% (6/270) dos animais avaliados (Figura 4), sendo todos também positivos na nPCR. Assim, o teste Kappa, revelou baixa concordância entre a pesquisa de mórulas e o resultado da nPCR ($k= 0,06$).

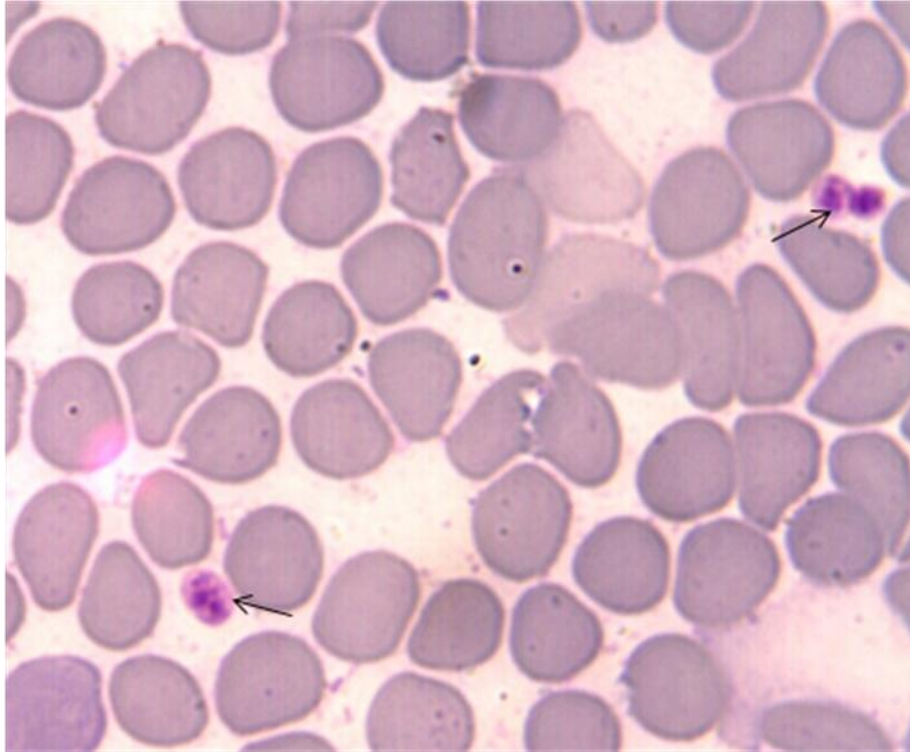


Figura 4. Mórulas de *A. platys* (→) em plaquetas observadas em esfregaço de sangue periférico de cão naturalmente infectado. Aumento: 100x

Entre os animais mono-infectados por *E. canis*, 66,67% (16/24) eram machos e 33,33% (8/24) fêmeas, não havendo associação significativa ($P > 0,05$) entre o sexo e a positividade para *E. canis* na nPCR. No momento da avaliação clínica, 83,33% (20/24) dos cães encontrava-se na faixa etária entre 25 e 48 meses ou acima de 48 meses (Tabela 1), ocorrendo nessas faixas, uma associação com a positividade por nPCR para *E. canis* ($\chi^2 = 4,47$ e $P = 0,03$). Quanto à raça, destacaram-se cães SRD, 54,17% (13/24), e da raça Pastor Alemão, 20,83% (5/24) (Tabela 2).

Dos 48 cães mono-infectados por *A. platys*, a distribuição por sexo, idade e raça foram mais próximas, onde 52,08% (25/48) dos cães eram machos e 47,92% (23/48) fêmeas. A maioria dos animais acometidos tinha de 12 a 24 meses e acima de 48 meses, com 29,17% (14/48) dos cães em cada uma dessas faixas etárias (Tabela 1). Além disso, predominaram animais SRD, 45,83% (22/48), seguidos das raças Poodle, 14,58% (7/48), Pit Bull, 10,42%

(5/48) e Pastor Alemão, 8,33% (4/48) (Tabela 2). Entretanto, entre os animais mono-infectados por *A. platys*, não houve associação significativa ($P>0,05$) entre nenhuma dessas variáveis e a positividade pela nPCR.

Tabela 1. Faixa etária de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 2009

| | <i>E. canis</i> n = 24 | | <i>A. platys</i> N = 48 | |
|----------------------|---------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | Nº | % | Nº | % |
| Menores que 12 meses | 1 | 4,17 | 12 | 25,00 |
| Entre 12 e 24 meses | 3 | 12,50 | 14 | 29,17 |
| Entre 25 e 48 meses | 10 | 41,67 | 8 | 16,66 |
| Acima de 48 meses | 10 | 41,67 | 14 | 29,17 |

Tabela 2. Raças de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Teresina, Piauí no período de março de 2008 à novembro de 2009

| RAÇA | <i>E. canis</i> n = 24 | | <i>A. platys</i> n = 48 | |
|-----------------|---------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | Nº | % | Nº | % |
| SRD | 13 | 54,17 | 22 | 45,83 |
| Pastor Alemão | 5 | 20,83 | 4 | 8,33 |
| Poodle | 2 | 8,33 | 7 | 14,58 |
| Pit bull | 1 | 4,17 | 5 | 10,42 |
| Rottweiler | 1 | 4,17 | 3 | 6,25 |
| Cocker Spaniel | 1 | 4,17 | 1 | 2,08 |
| Fila Brasileiro | - | - | 2 | 4,17 |
| Dalmata | - | - | 1 | 2,08 |
| Sharpei | - | - | 1 | 2,08 |
| Weimaraner | - | - | 1 | 2,08 |
| Lhasa-apso | - | - | 1 | 2,08 |
| Dachsund | 1 | 4,17 | 1 | 2,08 |

Avaliando os sinais clínicos dos 24 animais mono-infectados com *E. canis* (Figura 5), os principais achados foram: linfadenopatia, 50% (12/24) (Figura 6); algum tipo de alteração dermatológica, 45,83% (11/24); apatia, 37,5% (9/24) (Figura 7); presença ou histórico anterior de infestação por carrapatos, 37,5% (9/24); mucosas hipocoradas, 33,33% (8/24); anorexia/hiporexia, 25,00% (6/24); emagrecimento e onicogribose, 20,83% (5/24); hipertermia, 16,67% (4/24); vômito e secreção ocular, 12,50% (3/24). No entanto, sem haver

associação significativa ($P>0,05$) entre essas manifestações clínicas e a positividade pela nPCR.

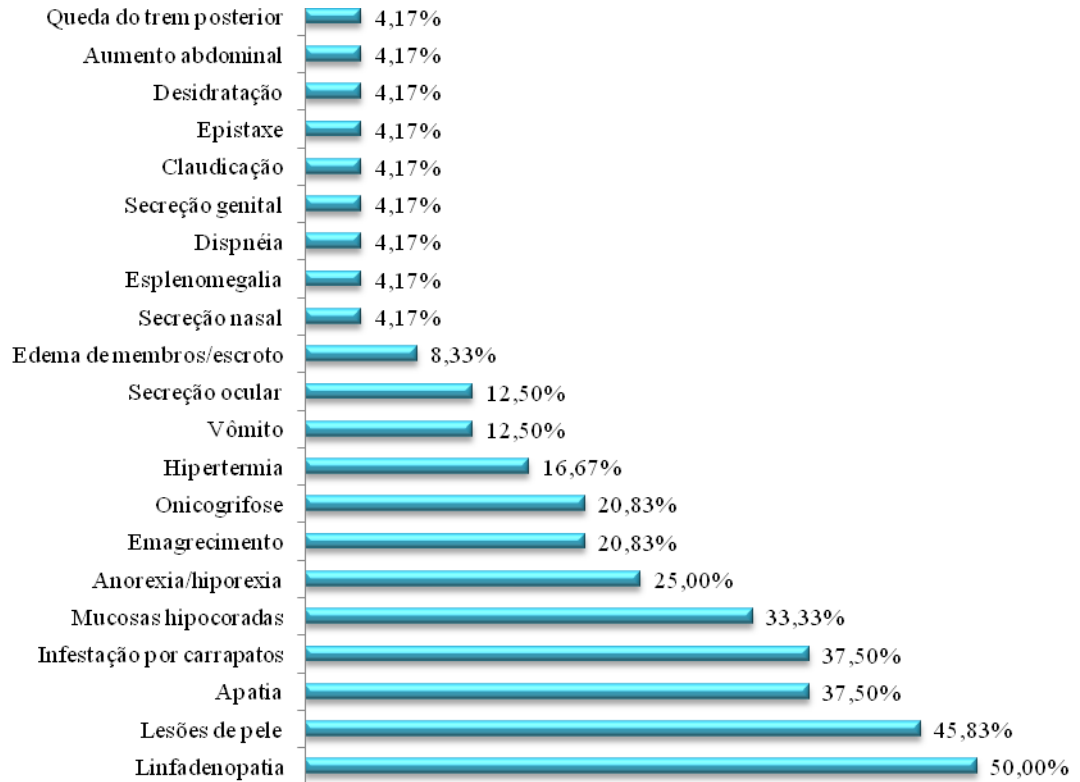


Figura 5. Frequência dos sinais clínicos em cães naturalmente infectados apenas por *E. canis*.



Figura 6. Linfonodo poplíteo. Linfadenopatia em cão da raça Pastor Alemão naturalmente infectado por *Ehrlichia canis*.



Figura 7. Apatia e epistaxe em cão da raça Pastor Alemão naturalmente infectado por *Ehrlichia canis*.

Nos 48 cães mono-infectados por *A. platys*, os principais sinais clínicos observados (Figura 8) foram: linfadenopatia, 72,92% (35/48); infestação por carrapatos, 54,17% (26/48) (Figura 9); lesões de pele 43,75% (21/48); anorexia/hiporexia, 29,17% (14/48); secreção ocular, 22,92% (11/48); hipertermia e mucosas hipocoradas, 16,67% (8/48) (Figura 10); apatia e emagrecimento, 14,58% (7/48). Sendo que, foi observado associação significativa apenas entre linfadenopatia e a positividade pela nPCR ($\chi^2 = 7,13$, $P = 0,007$).

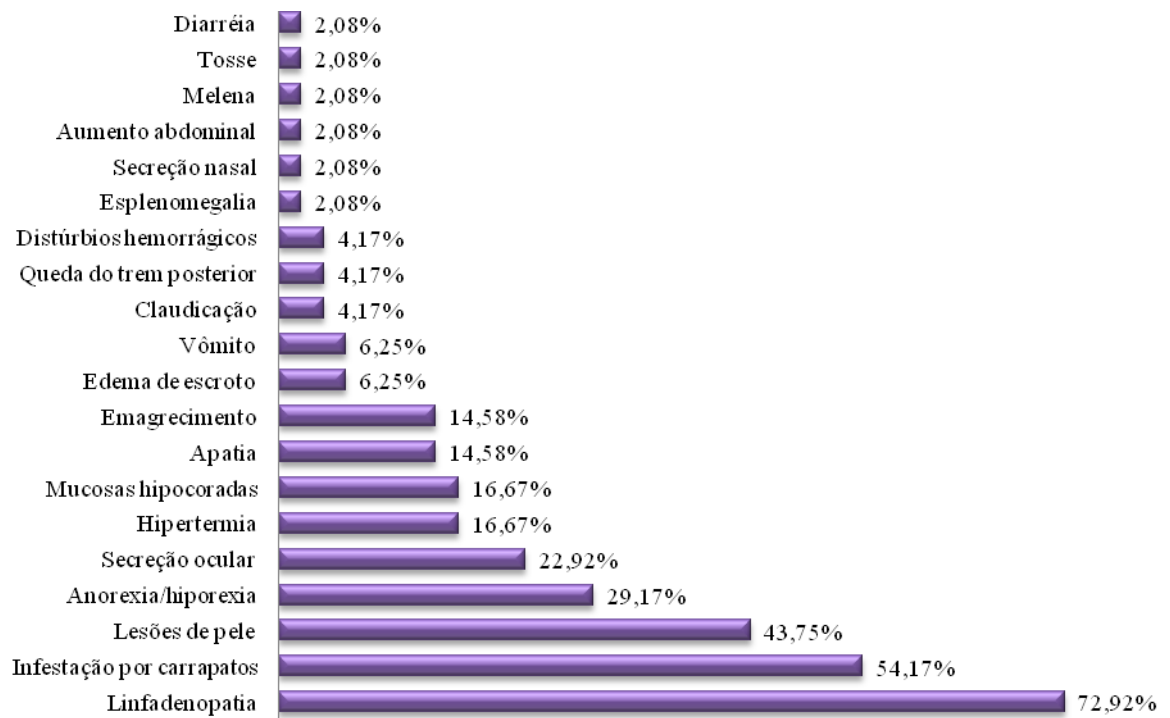


Figura 8. Frequência dos sinais clínicos em cães naturalmente infectados apenas por *A. platys*.



Figura 9. Cão da raça Fila naturalmente infectado por *Anaplasma platys* apresentando infestação por *Rhipicephalus sanguineus*.



Figura 10. Cão da raça Fila naturalmente infectado por *Anaplasma platys* com mucosa oral hipocorada.

Nos cães mono-infectados por *E. canis*, os principais achados hematológicos foram: trombocitopenia, 75% (18/24), e anemia, 62,50% (15/24), sendo esta distribuída principalmente entre os tipos normocítica normocrômica e microcítica normocrômica, com 29,17% (7/24) de cada tipo. Ocorreu neutrofilia em 33,33% (8/24) dos cães e leucocitose em 20,83% (5/24) (Tabela 3). No entanto, houve associação significativa apenas entre trombocitopenia e a positividade pela nPCR ($\chi^2 = 7,31$; $P = 0,0259$) (Tabela 4). As principais alterações bioquímicas nestes cães mono-infectados por *E. canis* foram hiperproteinemia, 91,67% (22/24), hiperglobulinemia, 87,50% (21/24), aumento de uréia e hipoalbuminemia, 25,00% (6/24) em cada uma (Tabela 5).

Nos animais nPCR positivos mono-infectados por *A. platys*, as alterações hematológicas foram mais variadas, ocorrendo trombocitopenia em 41,67% (20/48) dos cães, anemia em 37,50% (18/48), predominando o tipo microcítica normocrômica em 18,75%

(9/48) e normocítica normocrômica em 16,67% (8/48). Observou-se leucocitose com neutrofilia em 27,08% (13/48) dos animais (Tabela 3). Entretanto, não houve associação significativa ($P>0,05$) entre nenhuma variável hematológica e a positividade pela nPCR (Tabela 4). Quanto aos parâmetros bioquímicos analisados, as alterações mais comumente encontradas nos positivos mono-infectados por *A. platys* foram hiperproteinemia 81,25% (39/48), hiperglobulinemia, 70,83% (34/48), hiperalbuminemia, 43,75% (21/48), aumento nas concentrações séricas de uréia e creatinina, 31,25% (15/48) e hipoalbuminemia, 18,75% (9/48) (Tabela 5).

Tabela 3. Alterações hematológicas em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 2009

| ALTERAÇÕES HAMATOLÓGICAS | <i>E. canis</i> n = 24 | | <i>A. platys</i> n = 48 | |
|---------------------------------|---------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | Nº | % | Nº | % |
| Anemia normocítica normocrômica | 7 | 29,17 | 8 | 16,67 |
| Anemia normocítica hipocrômica | - | - | 1 | 2,08 |
| Anemia macrocítica normocrômica | 1 | 4,17 | - | - |
| Anemia microcítica normocrômica | 7 | 29,17 | 9 | 18,75 |
| Leucopenia | 2 | 8,33 | 2 | 4,17 |
| Leucocitose | 5 | 20,83 | 13 | 27,08 |
| Neutropenia | 1 | 4,17 | 2 | 4,17 |
| Neutrofilia | 8 | 33,33 | 13 | 27,08 |
| Eosinopenia | 1 | 4,17 | 4 | 8,33 |
| Eosinofilia | 2 | 8,33 | 6 | 12,5 |
| Linfopenia | 3 | 12,5 | 2 | 4,17 |
| Linfocitose | 3 | 12,5 | 4 | 8,33 |
| Monocitose | 1 | 4,17 | 2 | 4,17 |
| Trombocitopenia | 18 | 75 | 20 | 41,67 |
| Trombocitose | 2 | 8,33 | 2 | 4,17 |

Tabela 4. Associação entre alterações hematológicas e a positividade pela PCR para *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 2009

| Parâmetros Hematológicos | Total | PCR Positivos <i>Ehrlichia canis</i> | | | | PCR Positivos <i>Anaplasma platys</i> | | | |
|--------------------------|-------|--------------------------------------|--------|----------------|---------|---------------------------------------|-------|----------------|--------|
| | | +(n=24) | % | X ² | P | +(n=48) | % | X ² | P |
| Hemácias | | | | | | | | | |
| < 5.500 | 139 | 15 | 10,79 | 0.5447,1 | 0,4605 | 18 | 12,95 | | |
| 5.500-8.500 | 112 | 9 | 8,03 | | | 30 | 26,78 | 7.677,1 | 0,0056 |
| HT | | | | | | | | | |
| < 37 | 164 | 16 | 97,76 | 0.02067,1 | 0,8857 | 25 | 15,24 | | |
| 37-55 | 87 | 8 | 9,19 | | | 23 | 26,43 | 4.605,1 | 0,0319 |
| Hemoglobina | | | | | | | | | |
| < 12 | 139 | 15 | 10,79 | 0.6200,2 | 0,7334 | 20 | 14,38 | | |
| 12-18 | 111 | 9 | 8,12 | | | 28 | 25,22 | 4.923,2 | 0,0853 |
| > 18 | 1 | 1 | 100,00 | | | 0 | 0,00 | | |
| Plaquetas | | | | | | | | | |
| < 200 | 111 | 18 | 16,22 | 12.52,2 | 0,0019* | 20 | 18,02 | 1.312,2 | 0,5188 |
| 200-500 | 128 | 4 | 3,12 | | | 27 | 21,10 | | |
| > 500 | 12 | 2 | 16,66 | | | 1 | 8,33 | | |
| Leucócitos | | | | | | | | | |
| < 6.000 | 23 | 2 | 8,69 | 0.5465,2 | 0,7609 | 2 | 8,69 | 1.817,2 | 0,4032 |
| 6000-17000 | 161 | 17 | 10,55 | | | 33 | 20,49 | | |
| > 17.000 | 67 | 5 | 7,46 | | | 13 | 19,40 | | |
| Neutrófilos | | | | | | | | | |
| < 3000 | 12 | 1 | 8,33 | 0.3377,2 | 0,8446 | 1 | 8,33 | 1.069,2 | 0,5861 |
| 3000-11000 | 168 | 15 | 8,93 | | | 34 | 20,23 | | |
| > 11000 | 71 | 8 | 11,27 | | | 13 | 18,31 | | |
| Linfócitos | | | | | | | | | |
| < 1000 | 6 | 0 | 0,00 | 0.6505,2 | 0,7224 | 0 | 0,00 | 2.480,2 | 0,2894 |
| 1000-5000 | 214 | 21 | 9,81 | | | 44 | 20,56 | | |
| > 5000 | 31 | 3 | 9,67 | | | 4 | 12,90 | | |
| Monócitos | | | | | | | | | |
| < 100 | 6 | 0 | 0,00 | 0.7198,2 | 0,6977 | 1 | 16,66 | 1.818,2 | 0,403 |
| 100-1300 | 237 | 23 | 9,70 | | | 44 | 18,56 | | |
| > 1300 | 8 | 1 | 12,50 | | | 3 | 37,40 | | |
| Eosinófilos | | | | | | | | | |
| < 100 | 29 | 3 | 10,34 | 0.9860,2 | 0,6108 | 4 | 13,79 | | |
| 100-1200 | 203 | 18 | 8,87 | | | 37 | 18,23 | 4.495,2 | 0,1057 |
| > 1200 | 16 | 3 | 18,75 | | | 7 | 43,75 | | |

Tabela 5. Alterações bioquímicas em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 2009

| ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS | <i>E. canis</i> n = 24 | | <i>A. platys</i> n = 48 | |
|------------------------|---------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | Nº | % | Nº | % |
| Aumento de uréia | 6 | 25 | 15 | 31,25 |
| Diminuição de uréia | 1 | 4,17 | 4 | 8,33 |
| Aumento de creatinina | 3 | 12,5 | 15 | 31,25 |
| Aumento de ALT | 1 | 4,17 | 1 | 2,08 |
| Hiperproteinemia | 22 | 91,67 | 39 | 81,25 |
| Hipoproteinemia | 1 | 4,17 | 1 | 2,09 |
| Hiperalbuminemia | 4 | 16,67 | 21 | 43,75 |
| Hipoalbuminemia | 6 | 25 | 9 | 18,75 |
| Hiperglobulinemia | 21 | 87,5 | 34 | 70,83 |
| Hipoglobulinemia | 1 | 4,17 | 1 | 2,08 |

Houve um percentual relevante de cães co-infectados (Tabela 6), com dois ou três agentes distribuídos conforme o tipo de infecção em: 8,89% (24/270) dos animais co-infectados com *E. canis* e *A. platys*; 6,30% (17/270) dos cães co-infectados com *E. canis* e *Leishmania (L.) chagasi*; 5,18% (14/270) dos animais co-infectados com *E. canis*, *A. platys* e *Leishmania (L.) chagasi* e 9,26% (25/270) co-infectados por *A. platys* e *Leishmania (L.) chagasi*.

Tabela 6. Distribuição segundo o tipo de infecção de cães de população hospitalar em Teresina, Piauí no período de março de 2008 a novembro de 2009

| TIPO DE INFECÇÃO | N | % |
|---|-----|--------|
| <i>E. canis</i> | 24 | 8,89 |
| <i>A. platys</i> | 48 | 17,78 |
| <i>Leishmania (L.) chagasi</i> | 45 | 16,67 |
| <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i> | 24 | 8,89 |
| <i>E. canis</i> e <i>Leishmania (L.) chagasi</i> | 17 | 6,30 |
| <i>E. canis</i> , <i>A. platys</i> e <i>Leishmania (L.) chagasi</i> | 14 | 5,18 |
| <i>A. platys</i> e <i>Leishmania (L.) chagasi</i> | 25 | 10,41 |
| <i>E. canis</i> , <i>A. platys</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> | 1 | 0,37 |
| Outras patologias não estudadas | 72 | 26,67 |
| Total | 270 | 100,00 |

No presente trabalho observou-se formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* em esfregaços de sangue periférico, medula óssea esternal (Figura 11) e/ou linfonodos de 37,40% (101/270) dos animais avaliados. Em 44,55% (45/101), destes foi observada apenas monoinfecção por *Leishmania (L.) chagasi*. Ocorreu ainda, um cão co-infectado com *E. canis*, *A. platys* e *Toxoplasma gondii*, protozoário este identificado pela visualização de taquizoítos em esfregaço de medula óssea (Figura 12).

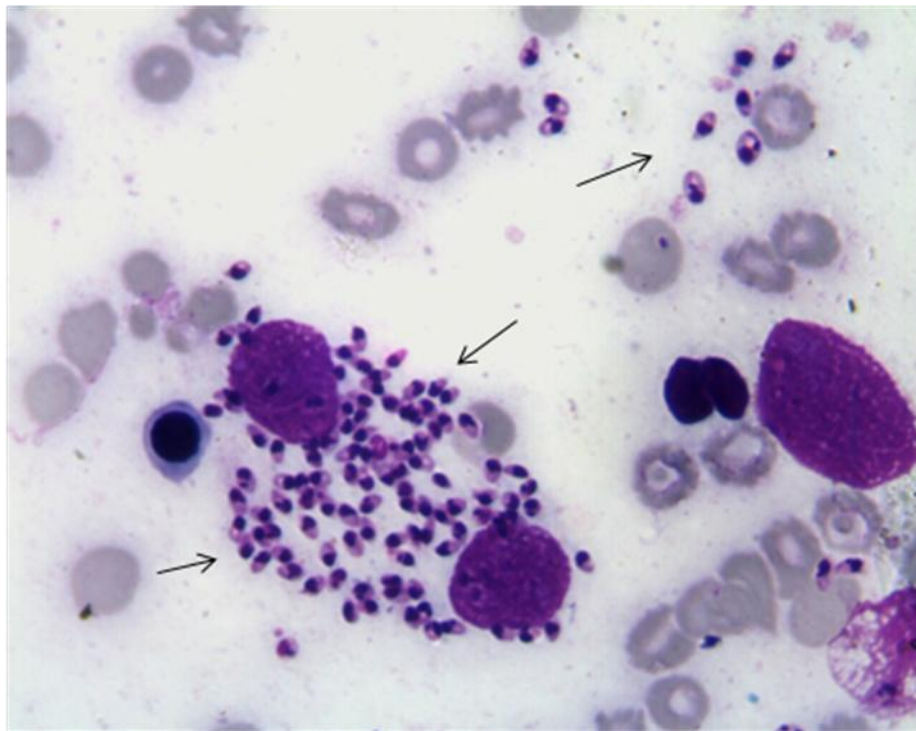


Figura 11. Co-infecção por *Leishmania sp* e *Ehrlichia canis* em cão naturalmente infectado. Formas amastigotas de *Leishmania sp* (→) observadas em aspirado de medula óssea esternal. Aumento: 100x

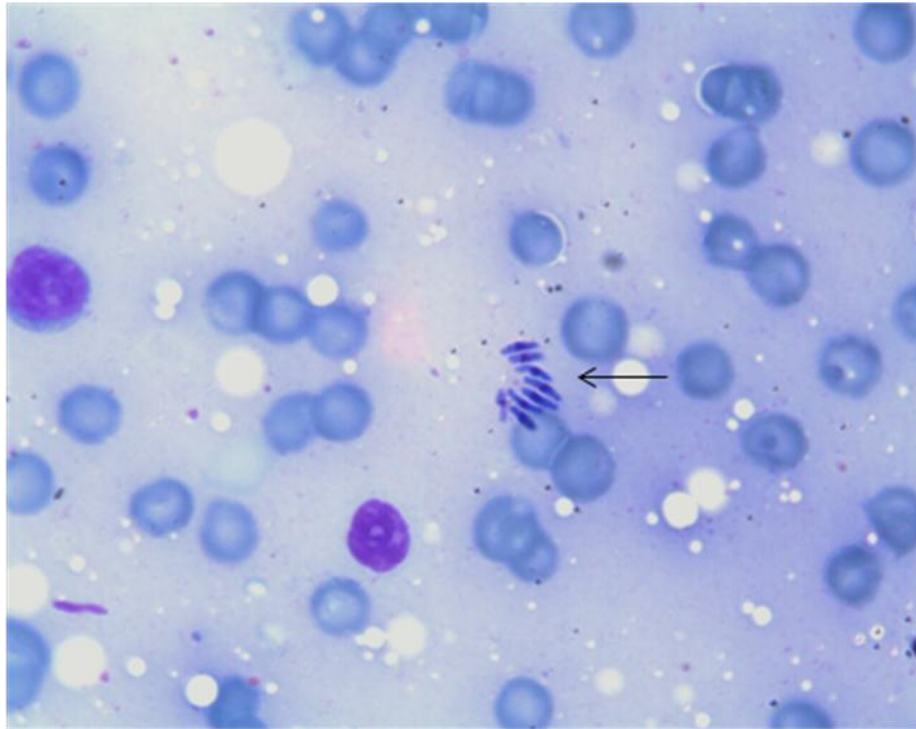


Figura 12. Co-infecção por *Toxoplasma gondii* e *Ehrlichia canis* em cão naturalmente infectado. Formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (→) observadas em aspirado de medula óssea esternal. Aumento: 100x

3.5 Discussão

Erliquiose e anaplasmose caninas são enfermidades que vêm sendo alvo de diversos estudos em regiões de clima favorável ao desenvolvimento de carrapatos, onde é comum a ocorrência de cães infestados por esses artrópodes e com sintomatologia sugestiva de infecção por esses microrganismos. Entretanto, em muitos locais a escassez de diagnóstico ainda se torna um problema para confirmação dessas infecções, este é o caso de Teresina, localizada no norte do Piauí, nordeste do Brasil. Uma cidade com clima tropical, com temperaturas variando de 19-36°C e a umidade relativa do ar de 40-80% (Medeiros, 2004), sendo, portanto, uma região propícia à reprodução de carrapatos.

Diversos autores vêm destacando a suscetibilidade de humanos e caninos expostos a carrapatos serem acometidos por patógenos da ordem Rickettsiales (Nicholson et al., 2010; Dagnone et al., 2001). Tamí e Tamí-Maury (2004) observaram na Venezuela, uma frequência de 13,8% de *Ehrlichia* em pacientes humanos portadores do Vírus da Imunodeficiência

Humana (HIV), detectado por meio de visualização de organismos semelhantes a mórulas em plaquetas. Também na Venezuela já foi isolado amostra de uma cepa de *E. canis* em humanos (Unver et al., 2001). Desta forma, a confirmação do potencial zoonótico desses microorganismos é preocupante numa região onde é comum a ocorrência do vetor *R. sanguineus*.

Em nossa região, é freqüente a suspeita de cães infectados por *E. canis* e *A. platys*, no entanto, só há confirmação nos poucos casos em que se observa inclusões sugestivas de mórulas em esfregaços sanguíneos, mesmo assim, não se pode afirmar a espécie. Esse fato nos incentivou a realizar este estudo no intuito de confirmar a presença e estudar a freqüência desses agentes em nossa região através da técnica de nPCR e descrever as manifestações clínicas e laboratoriais dos cães infectados.

No presente trabalho, a técnica de nPCR constatou por amplificação de DNA de caninos, a presença de *E. canis* e *A. platys* em grande parte dos cães avaliados. Estes resultados revelam que possivelmente estamos diante de duas enfermidades endêmicas no Estado do Piauí. Estudos recentes realizados no Brasil utilizando a mesma técnica apontaram percentuais de positividade variados na infecção por *E. canis*, tais como: 21,7% de positividade encontrados por Dagnone et al. (2003) em Londrina no Paraná. No estado de São Paulo, estudos demonstraram percentuais de 30,9% (Bulla et al., 2004) a 40% em Botucatu (Ueno et al., 2009); 38,9% em Ribeirão Preto (Santos et al., 2009) e 53,3% em Jaboticabal (Nakaghi et al., 2008), em Pernambuco, estudo conduzido por Ramos et al. (2009) revelou um percentual de 57%, já na Bahia, foi observado 7,8% (Carvalho et al., 2008). No tocante à infecção por *A. platys*, Santos et al. (2009) encontraram em Ribeirão Preto-SP, 14,93%; no Rio de Janeiro-RJ, o percentual observado foi de 15,84% (Ferreira et al., 2007) e em Recife-PE, houve 55% de positividade para esse agente (Ramos et al., 2009). Podemos observar que

nas diferentes regiões do país há uma variação na prevalência dessas afecções, mas em média, os nossos resultados são semelhantes.

Embora não existam dados sobre frequência desses agentes em nossa região, os resultados encontrados eram esperados uma vez que é comum a suspeita clínica dessas infecções em nossos cães.

A introdução de técnicas como a PCR tem aumentado a habilidade para diagnosticar doenças infecciosas, principalmente no que se refere à identificação de espécie de um determinado agente etiológico (Chang e Pan, 1996). Tanto na erliquiose como na anaplasmoze, as semelhanças dos sinais clínicos com outras enfermidades (Rikihisa, 2000), a baixa bacteremia (Harrus et al., 1997a,b) e reações sorológicas cruzadas entre espécies relacionadas (Rikihisa et al., 1994), têm dificultado o diagnóstico. Assim, ferramentas moleculares como a nPCR, têm sido otimizadas para o diagnóstico eficiente dessas bactérias em cães (Wen et al., 1997; Martin et al., 2005).

Os resultados da pesquisa direta de *E. canis* e *A. platys* nas lâminas demonstraram baixa sensibilidade. A literatura descreve percentuais mais elevados, variando entre 7,1% (Ueno et al. 2009) a 9% para *E. canis* (Ramos et al. 2009) e de 14,85% (Ferreira et al., 2007) a 21% (Ramos et al. 2009) para *A. platys*. Essa diferença possivelmente deve-se ao fato de que os referidos trabalhos utilizaram cães com suspeita clínica da infecção por *E. canis* e *A. platys*, enquanto na pesquisa aqui desenvolvida, os cães foram testados independente da suspeita clínica. Sabe-se que o diagnóstico direto, embora fácil e rápido, apresenta baixa sensibilidade (Mylonakis et al., 2003), e as mórulas praticamente só são encontradas na fase aguda da infecção (Castro et al., 2004). De acordo com Elias (1991), a baixa sensibilidade e especificidade desta técnica, provavelmente devem-se a flutuação parasitêmica do microrganismo e a possibilidade de encontrar outras inclusões intracitoplasmáticas não relacionadas a *E. canis*.

Tanto na infecção por *E. canis*, quanto por *A. platys*, observou-se baixa concordância ao compararmos os resultados entre a pesquisa direta e o nPCR em virtude do reduzido número de amostras em que foi observado mórulas, esse fato sugere que muitos dos animais positivos encontrava-se na fase subclínica ou crônica, onde é rara a detecção de mórulas. Além disso, Mylonakis et al. (2003) estudando a pesquisa de mórula de *E. canis* em diferentes materiais, como sangue periférico, capa leucocitária, aspirados de medula óssea e linfonodo observaram uma menor sensibilidade no sangue periférico quando comparado com os demais.

Houve cinco animais que foram positivos na pesquisa direta e negativos na nPCR para *E. canis*, sugerindo que podem ser falsos positivos pelo exame direto. Isto pode ocorrer uma vez que inclusões intracitoplasmáticas podem ser encontradas em infecções por outros agentes da família Anaplasmataceae que infectam cães, como *Anaplasma phagocytophilum*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (Rikihisa, 2000; Ferreira et al., 2007), ou mesmo podem estar presentes corpúsculos de inclusão em células sanguíneas decorrentes da ativação celular ocasionada por processos inflamatórios que podem ser confundidos com mórulas de *E. canis* e *A. platys* (Mylonakis et al., 2003; Ferreira et al., 2007). Por outro lado, a PCR negativa nesses cães pode ser em decorrência da fase clínica em que os mesmos possivelmente se encontrariam, haja visto que o DNA foi extraído de sangue total, que não é tão adequado para avaliar animais na fase subclínica, onde de acordo com Meneses et al. (2008), ocorre baixa bacteremia. Segundo Harrus et al. (1998) amostras esplênicas aumentam a sensibilidade da PCR comparadas a amostras de sangue e medula óssea por ser o baço o órgão que alberga o parasito antes da eliminação do organismo.

Não foi observada diferença significativa quanto a sexo, seja avaliando o total de animais positivos na nPCR para *E. canis* e *A. platys*, ou apenas os mono-infectados. Entretanto, ao avaliarmos os dois grupos de animais com mono-infecção por esses agentes, observamos resultados que diferem de Moreira et al. (2003) e Borin et al. (2009) que

encontraram maior percentual de fêmeas infectadas. Em nosso estudo, embora sem diferença significativa, observou-se maior percentual de machos infectados por *E. canis* e *A. platys*, o que se justifica por serem machos a maioria dos cães deste estudo.

Quanto a faixa etária, em ambas as infecções predominaram animais adultos, nos mono-infectados por *E. canis*, houve associação significativa com a positividade pela nPCR e as faixas etárias entre 25 e 48 meses ou acima de 48 meses, concordando com Baneth et al., (1996), que afirma que essa faixa etária apresenta maior tempo de exposição aos vetores.

Quanto às raças, entres os mono-infectados com *E. canis* e *A. platys* predominaram cães SRD, provavelmente também por serem SRD a maioria dos animais avaliados. Um dado interessante foi que os cães da raça Pastor Alemão tiveram um alto percentual de positividade para *E. canis* quando comparado às outras raças, concordando com Elias (1991) e Harrus et al. (1997b). Segundo Waner et al. (2001), esta raça é mais suscetível à infecção.

Ao avaliarmos o perfil clínico dos animais infectados por *E. canis* e *A. platys* observamos uma variação na severidade e no tipo de sinal clínico. Isto não diferiu dos relatos da literatura (Harrus et al., 1997 a,b). No entanto, autores citam as características da erliquiose em cada fase na infecção experimental de cães e afirmam que não é fácil distinguí-las nos cães naturalmente infectados (Harrus et al., 1997b).

Nos cães mono-infectados por *E. canis*, embora alguns sinais tenham sido frequentes, não foi observado associação entre nenhum deles e a positividade pela nPCR, o que concorda com a literatura consultada que afirma que os sinais manifestados nesta infecção são inespecíficos (Moraes et al., 2004; Oriá et al., 2004), Isso também pode está relacionado ao fato dos animais avaliados serem oriundos de população hospitalar, podendo serem portadores de diversas patologias e manifestar os mais variados sinais. Diferindo da nossa pesquisa, um estudo realizado por Ueno et al. (2009) em Botucatu-SP, apontou a diarreia como a única manifestação clínica associada significativamente a infecção por *E. canis*.

A anaplasmosose é considerada como uma doença benigna sem graves sinais clínicos, embora haja relatos de maior gravidade quando associada com a infecção por *E. canis*. Os sinais clínicos da doença são febre, depressão e anorexia (Rikihiisa, 1991). Entretanto, existem relatos de anaplasmosose em cães manifestando sintomatologia mais severa, como anorexia, letargia, perda de peso, linfadenopatia, febre, palidez de mucosas e descarga nasal (Harrus et al., 1997a). Nos animais aqui estudados a linfadenopatia demonstrou associação significativa com a positividade na nPCR para *A. platys*. O alto percentual de cães infectados com *A. platys* manifestando linfadenopatia pode estar relacionado patologias concomitantes, sejam as observadas neste estudo, ou outras, haja visto que os animais avaliados eram oriundos de população hospitalar.

Como mencionado anteriormente, os sinais clínicos dos animais eram inespecíficos e, em alguns casos, sem maior gravidade. No entanto, os cães que estavam infectados apenas por *E. canis* e naqueles do grupo de co-infecção entre *E. canis* e *Leishmania*, apresentaram sinais clínicos mais severos, levando três casos (21,43%) a óbito.

Anemia e trombocitopenia foram as principais alterações hematológicas presentes tanto nos animais infectados por *E. canis* e *A. platys*. Entretanto, nos cães mono-infectados por *E. canis*, apenas trombocitopenia foi associada com a positividade pela nPCR. Diversos estudos confirmam que a trombocitopenia está entre as principais alterações presentes na infecção por *E. canis* (Dagnone et al., 2003; Bulla et al., 2004; Castro et al., 2004; Brandão, 2005; Hasewaga, 2005; Macieira et al., 2005; Sousa, 2006; Albernaz et al., 2007; Nakaghi et al., 2008; Meneses, 2008; Ueno et al., 2009).

Estudos afirmam que na infecção por *E. canis* ocorre aderência das células infectadas aos capilares e sua migração pelo endotélio vascular (Hibler et al., 1986) e de acordo com Hasewaga (2005), isso pode ter envolvimento na gênese da trombocitopenia observada simultaneamente ao aparecimento dos sintomas gerais.

Para Bulla et al. (2004) a trombocitopenia na erliquiose canina pode está relacionada além da destruição imune, ao consumo aumentado de plaqueta ou a sua meia vida diminuída, ao seqüestro pelo sistema mononuclear fagocitário ou pode ser secundário às concentrações aumentadas do fator circulante inibidor da migração plaquetária. Por outro lado, Sousa (2006) descreve que a hipoplasia megacariocítica e decréscimo na meia vida plaquetária resultante de processos imunológicos e consuntivos também contribuem para a trombocitopenia na infecção por *E. canis* e cita que o mecanismo de trombocitopenia associado à infecção por *A. platys*, embora ainda não esteja bem compreendido, também deve ter envolvimento imunológico. Já Russel e Grindem (2000) afirmam que o decréscimo na produção de plaquetas não está comprovado, já que *A. platys* não foi encontrado em megacariócitos, e estas células estão em número elevado nos cães infectados. A vasculite pode ser outro fator responsável pela trombocitopenia observada na infecção por *E. canis* por provocar o aumento do consumo de plaquetas no endotélio vascular. Essa vasculite, de acordo com Breitschwerdt (2004), deve-se ao fato de, na fase aguda da infecção por *E. canis* as células mononucleares infectadas atingirem outros órgãos , via corrente sanguínea, principalmente pulmões, rins e meninges, e aderirem-se ao endotélio vascular.

Na infecção por *A. platys*, não houve associação significativa entre nenhuma variável hematológica e a positividade pela nPCR, observou-se entre os mono-infectados, que a maioria apresentou valores dentro da faixa de normalidade, sugerindo tratar-se realmente de uma infecção mais branda.

Em cães infectados com *A. platys* a trombocitopenia pode está ausente em decorrência da fase da infecção em que o animal se encontra. Breitschwerdt (2004) observou trombocitopenia cíclica em intervalos de aproximadamente 10 a 14 dias na infecção por *A. platys*. Também Troy e Forrester (2006) e Woody e Hoskins (1991) afirmam que esta natureza cíclica das trombocitopenias e das parasitemias tende a diminuir com o tempo e com

a cronificação da doença, o que resulta em esporádicas aparições do parasito e trombocitopenias moderadas.

Muito embora a trombocitopenia seja uma característica importante na infecção por *E. canis* e/ou *A. platys*, alguns estudos tem demonstrado que existem outras patologias que podem levar a esse quadro como neoplasias, doenças imunomediadas, drogas, pseutrombocitopenia (Kelly e Lucas, 2009). Mas, quando se trata de uma região endêmica, Bulla et al. (2004) afirmam que erliquiose deve ser a principal suspeita como causa dessa alteração.

O número de leucócitos comumente varia durante a fase aguda da infecção, podendo diminuir em decorrência da indução ao seqüestro destes por mecanismos imunológicos (Moreira et al., 2003). Nos cães avaliados neste estudo, os resultados do leucograma variaram desde valores normais à leucopenia e leucocitose. Fato esperado quando se trata de uma população de animais enfermos. Essa variação ocorreu também nos animais nPCR positivos para *E. canis* e *A. platys* e nos grupos de co-infectados, entretanto, houve predominância de animais com leucograma dentro da normalidade, concordando com os valores encontrados por Davoust et al. (1993), Kanayama et al. (2002), Hasewaga (2005), Mendonça et al. (2005) e Borin et al. (2009) na infecção erliquial e diferindo dos observados por Stiles (2000), Oliveira et al. (2000), Moreira et al. (2003) e Meneses (2008) que observaram principalmente leucopenia.

Observou-se ainda um percentual relevante de animais positivos para *E. canis* e *A. platys* mono ou co-infectados com esses agentes e *Leishmania (L) chagasi* apresentando leucocitose com neutrofilia. Essas variações no leucograma podem está relacionadas a fatores como raça, idade, variações nas fases da doença. Enquanto a leucocitose, como foi proposto por Latimer et al. (2003) e Swanson et al. (2004) pode está relacionada tanto a infecções secundárias, quanto a co-infecções com outros agentes não estudados.

Sabe-se que os sinais clínicos da erliquiose e anaplasmosose são inespecíficos e, para chegar a alguma conclusão é necessário que o veterinário associe os achados clínico-hematológicos, a epidemiologia e o método diagnóstico. Mas, outras alterações, como as bioquímicas, são pouco utilizadas como parâmetros no diagnóstico dessas parasitoses, pois são escassos os relatos que abordam esses fenômenos (Santarém et al., 2008).

Dentre as principais alterações bioquímicas descritas em cães infectados por *E. canis* incluem inicialmente hiperproteinemia (Harrus et al. 1998) com hipergamaglobulinemia (Harrus et al., 1996; Harrus et al., 1998; Harrus et al., 1999; Castro et al., 2004) e posterior hipoalbuminemia (Harrus et al., 1996; Harrus et al., 1998; Harrus et al., 1999; Castro et al., 2004; Watanabe et al., 2005), além de aumento nas concentrações séricas de uréia, creatinina e fósforo (Troy e Forrester, 2006). Em casos de infecção por *A. platys* é descrita ocorrência de hipergamaglobulinemia e redução dos níveis de ferro sérico (Baker et al., 1988).

Ao avaliarmos o perfil bioquímico observamos que em ambas as infecções a hiperproteinemia, hiperglobulinemia e aumento de uréia foram frequentes. Nesse caso, os animais infectados por *E. canis* poderiam estar ou na fase aguda ou subclínica, pois na fase crônica, de acordo com Almosny (1998), o achado mais freqüente é a hipoalbuminemia que é compensada pela hiperglobulinemia, levando a níveis normais de proteínas totais. A mesma literatura acrescenta que o aumento nos valores de uréia, sem aumento nos níveis séricos de creatinina, apontam para uma possível causa pré-renal, como desidratação em função de febre ou por um estresse sistêmico determinado pela doença, podendo levar ao aumento do catabolismo protéico e não por causa renal ou pós-renal. Na infecção por *A. platys* hiperalbuminemia e aumento de creatinina também foram achados freqüentes.

Existem diversos relatos de co-infecção entre patógenos que infectam caninos, a maioria destaca os agentes transmitidos por carrapatos (Hua et al., 2000; Meinkoth et al., 1998; Suksawat et al., 2001). No Brasil, há relatos de co-infecção principalmente por

hemoparasitos, sobretudo aqueles transmitidos pelo *R. sanguineus*, o qual é responsável pela transmissão de microrganismos dos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Babesia*, entre outros (Santos et al., 2009). Por outro lado, são poucos os relatos de co-infecção entre hemoparasitos e *Leishmania (L.) chagasi*. Nosso estudo apontou um percentual considerável de co-infecção entre os patógenos *E. canis*, *A. platys* e *Leishmania (L.) chagasi*, onde 29,62% dos cães (80/270) apresentaram co-infecção por esses agentes. Esse achado confirma uma suspeita freqüente entre veterinários de nossa região, por tratar-se de uma área com clima propício à proliferação dos carrapatos e onde a Leishmaniose Visceral Canina é uma doença endêmica.

Em nosso estudo foi observado ainda em um cão Husky Siberiano positivo na nPCR para *E. canis* e *A. platys*, co-infecção com *Toxoplasma gondii* confirmada pela visualização de taquizoítos deste protozoário em esfregaço de medula óssea. Esse microrganismo é considerado um agente oportunista na infecção em cães (Da Silva et al., 2005). Segundo Moretti et al. (2002) co-infecções envolvendo *Toxoplasma gondii* são mais relatadas em cães imunossuprimidos pelo vírus da cinomose. No entanto, existe relato de co-infecção no Brasil, por esse protozoário, o vírus da cinomose e *E. canis* (Moretti et al., 2006). Sabe-se que a infecção erliquial pode provocar imunossupressão, e com isso levar o animal a infecções secundárias ou mesmo a infecções por múltiplos patógenos, o que gera um agravamento do quadro clínico, muitas vezes levando o animal a óbito, como observado nesse caso.

O presente estudo demonstra que *E. canis* e *A. platys* são agentes infecciosos frequentes em cães na cidade de Teresina-Piauí, e que existem dificuldades no diagnóstico diferencial com outras parasitoses endêmicas nessa região, principalmente com a Leishmaniose Visceral Canina. Destacamos aqui a relevância da utilização do hemograma para confirmação de trombocitopenia, bem como estudos voltados à epidemiologia e melhoria dos testes diagnósticos para uma prevenção e controle mais eficazes destas enfermidades.

3.6 Referências bibliográficas

Albernaz, A.P., Miranda, F.J.B., Melo, O.A.J., Machado, A., Fajardo, V., 2007. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciên. Anim. Bras.* 8, 799-806.

Almosny, N.R.P., 1998. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 202f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro.

Almosny, N.R.P., Massard, C.L., 2002. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: Almosny, N.R.P. (1st Ed.), Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. L.F. Livros de Veterinária, Rio de Janeiro, pp. 13-56.

Andereg, P.I., Passos, L.M.F., 1999. Erliquiose canina: revisão. *Clin. Vet.* 4, 31-38.

Baker, D.C., Gaunt, S.D., Babin, S.S., 1988. Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1014-1016.

Baneth, G., Waner, T., Koplak, A., Weinstein, S., Keysary, A., 1996. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. *Vet. Rec.* 138, 257-259.

Borin, S., Crivelenti, L.Z., Ferreira, F.A., 2009. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61, 566-571.

Brandão, L.P., 2005. Envolvimento da resposta imune humoral no desenvolvimento da anemia e das alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas na erliquiose canina experimental. 2005. 77f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Breitschwerdt, E.B., 2004. The Riquetsioses. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. (5th Ed.), Tratado de Medicina Interna Veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 422-429.

Bulla, C., Takahira, R.K., Araújo Jr, J.P., Trinca, L.A., Lopes, R.S., Wiedmeyer, C.E., 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. Vet. Res. 35, 141-146.

Carvalho, F.S., Wenceslau, A.A., Carlos, R.S.A., Albuquerque, G.R., 2008. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. Genet. Mol. Res. 7, p. 657-662.

Castro, M.B., Machado, R.Z., Aquino, L.P.C.T., Alessi, A.C., Costa, M.T., 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet. Parasitol. 119, 73-86.

Chang, W.L., Pan, M.J., 1996. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by Two-Step PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 3142-3146.

Da Silva, A.V., Pezerico, S.B., De Lima, V.Y., D'arc Moretti, L., Pinheiro, J.P., Tanaka, E.M., Ribeiro, M.G., Langoni, H., 2005. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Vet. Parasitol.* 127, 23-27.

Dagnone, A.S., Morais, H.S.A., Vidotto, M.C., 2001. Erliquiose nos animais e no homem. *Semina: Ci. Agrárias.* 22, 191-201.

Dagnone, A.S., Morais, H.S.A., Vidotto, M.C., Jojima, F.S., Vidotto, O., 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. *Vet. Parasitol.* 117, 285-290.

Davoust, B., 1993. Canine ehrlichiosis. *Point Vét.* 25, 43-51.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophyla*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145-2165.

Elias, E., 1991. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *J. Small Anim. Pract.* 33, 540-543.

Ferreira, R.F., Cerqueira, A.M.F., Pereira, A.M., Guimarães, C.M., Sá, A.G., Abreu, F.S., Massard, C.L., Almosny, N.R.P., 2007. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *J. Appl. Res. Vet. Med.* 5, 113-119.

Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M., Bark, H., 1998. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 36, p. 73-76.

Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., Cornelissen, A.W.C.A., 1999. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2745–2749.

Harrus, S., Waner, T., Avidar, Y., Bogin, E., Peh, H., Cark, H., 1996. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.* 66, 241-249.

Harrus, S., Aroch, I., Lavy, E., Bark, H., 1997a. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet. Rec.* 141, 247-250.

Harrus, S., Waner, T., Bark, H., 1997b. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 19, 431-444.

Hasewaga, M.Y., 2005. Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular. 2005. 136f. Tese

(Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Hibler, S., Hoskins, J.D., Greene, C.E., 1986. Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 8, 106-114.

Hua, P., Yuhai, M., Shide, T., Yang, S., Bohai, W., Xiangrui, C., 2000. Canine Ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. *Microbiol. Immunol.* 44, 737-739.

Inokuma, H., Fugii, K., Matsumoto, K., Okuda, M., Nakagome, K., Kosugi, R., Hirakawa, M., Onishi, T., 2002a. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions on peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet. Parasitol.* 110, 145-152.

Inokuma, H., Fuji, K., Okuada, M., Onishi, T., Beaufils, J.P., Raoult, D., Brougui, P., 2002b. Determination of the nucleotide sequence of heat shock Operon *groESL* and citrate synthase gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 19, 1132-1136.

Kanayama, M.S., Cabral, D.D., Mundim, A.V., 2002. Achados hematológicos e bioquímicos em cães com erliquiose canina atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia-MG. *Rev. Horiz. Cien.* 1, 1-11.

Kelly, P.J., Lucas, H., 2009. Failure to demonstrate *Babesia*, *Anaplasma* or *Ehrlichia* in thrombocytopenic dogs from St Kitts. J. Infect. Dev. Ctries. 3, 561-563.

Labruna, M.B., 2004. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, 123-124.

Latimer, K.S., Mahaffey, E.A., Prasse, K.W. (1st Ed.), 2003. Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology. Iowa State Press, Ames, 468pp.

Machado, R.Z., 2004. Erliquiose canina. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, 53-57.

Macieira, D.B., Messick, J.B., Cerqueira, A.M., Freire, I.M., Linhares, G.F., Almeida, N.K., Almosny, N.R., 2005. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. Vet. Clin. Pathol. 34, 44-48.

Martin, A.R., Brown, G.K., Dunstan, R.H., Roberts, T.K., 2005. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. Exp. Parasitol. 109, 176-180.

Medeiros, R.M. (1st Ed.), 2004. Estudo Agrometeorológico para o Estado do Piauí. Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado do Piauí, Teresina, 113pp.

Meinkoth, J.H., Ewing, S.A., Cowell, R.L., Dawson, J.E., Warner, C.K., Mathew, J.S., Bowles, M., Thiessen, A.E., Panciera, R.J., Fox, C., 1998. Morphologic and molecular evidence of a dual species Ehrlichial infection in a dog presenting with inflammatory central nervous system disease. *J. Vet. Int. Med.* 12, 389-393.

Mendonça, C.S., Mundim, A.V., Costa, A.S., Moro, T.V., 2005. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. *Biosc. J.* 21, 167-174.

Meneses, I.D.S., Souza, B.M.P.S., Teixeira, C.M.M., Guimarães, J.E., 2008. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. *Rev. Bras. S. Prod. Anim.* 9, 770-776.

Moraes, H.A., Hoskins, J., Almosny, N.R.P., Labarthe, N., 2004. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia* spp. *Clín. Vet.* 48, 28-30.

Moreira, S.M., Bastos, C.V., Araújo, R.B., Santos, M., Passos, L.M.F., 2003. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55, 141-147.

Moreira, S.M., Machado, R., Passos, L.F., 2005. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Ciê. Rur.* 35, 958-960.

Moretti, L.D., Da Silva, A.V., Ribeiro, M.G., Paes, A.C., Langoni, H., 2006. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and Ehrlichiosis *rickettsia* - case report. Ver. Inst. Med. Trop. 48, 359-363.

Moretti, L.D., Ribeiro, M.G., Aguiar, D.M., Paes, A.C., Pezerico, S.B., Silva, A.V., 2002. Toxoplasmose em cães coinfectados com o vírus da cinomose. Sem: Ciên. Agrár. 23, 85-92.

Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hergaty, B.A., Billinis, C.D., Leontides, L.S., Kontos, V.S., 2004. Chronic canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 40, 174-184.

Mylonakis, M., Koutinas, A., Bilinis, C., 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Vet. Microbiol. 91, 197-204.

Nakaghi, A.C.H. et al. Estudo comparativo entre a PCR baseada no gene *dsb* e a nested PCR no diagnostico da erliquiose canina. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 13., 2004, Ouro Preto. Anais...Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Parasitologia Veterinária, 2004.

Nakaghi, A.C.H., Machado, R.Z., Costa, M.T., André, M.R., Baldani, C.D., 2008. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. Ciên. Rur. 38, 766-770.

Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T., Lappin, M.R., 2002. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. J. Vet. Int. Med. 18, 309-315.

Nicholson, W.L., Allen, K.E., McQuiston, J.H., Breitschwerdt, E., Little, S. E., 2010. Zoonoses of people and pets in the USA: The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Trends Parasitol. 26, 205-212.

Oliveira, D., Nishimori, C.T., Costa, M.T., Machado, R.Z., Castro, M.B., 2000. *Ehrlichia canis* antibodies detection by "DOT ELISA" in naturally infected dogs. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 9, 1-6.

Oriá, A.P., Pereira, P.M., Laus, J.L., 2004. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. Ciênc. Rural. 34, 1289-1295.

Ramos, C.A.N., Ramos, R.A.N., Araujo, F.R., Guedes Jr, D.S., Souza, I.I.F., Ono, T.M., Vieira, A.S., Pimentel, D.S., Rosas, E.O., Faustino, M.A.G., Alves, L.C., 2009. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18, 58-62.

Rikihisa, Y., 2000. Diagnosis of emerging ehrlichial diseases of dogs, horses, and humans. J. Vet. Int. Med. 14, 250-251.

Rikihisa, Y., 1991. The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases. Clin. Microbiol. 4, 286-308.

Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Fox, J.C., 1994. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. J. Clin. Microbiol. 32, 2107-2212.

Russel, K.E., Grindem, C.B, 2000. Secondary thrombocytopenia. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (1st Ed.), Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 487-495.

Santarém, V.A., José, M.D.; Braga, C., 2008. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrlichiose. Ciên. Agrár. 29, 845-852.

Santos, F., Coppede, J.S., Pereira, A.L.A., Oliveira, L.P., Roberto, P.G., Benedetti, R.B.R., Zucoloto, L.B., Lucas, F., Sobreira, L., Marins, M., 2009. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. Vet. J. 179, 145-148.

Sousa, V.R.F., 2006. Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*. 2006. 46f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

Stiles, J., 2000. Canine rickettsial infections. Vet. Clin. N. Am. 30, 1135-1149.

Suksawat, J., Pitulle, C., Arraga-Alvarado, C., Madrigal, K., Hancock, S.I., Breitschwerdt, E.B., 2001. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S Ribosomal DNA secondary Structure. J. Clin. Microbiol. 39, 90-93.

Swanson, K.S., Kuzmuk, K.N., Schook, L.B., Fahey Jr., G.C., 2004. Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. J. An. Scien. 82, 1713-1724.

Tamí, I.D.C.D., Tamí-Maury, I.M., 2004. Identificación morfológica de *Ehrlichia sp.* Em las plaquetas de pacientes com infección por virus de la inmunodeficiencia humana, em Venezuela. Rev. Pan. Sal. Pub. 16, 345-349.

Torres, H.M., Massard, C.L., Figueiredo, M.J., Ferreira, T., Almosny, N.R.P., 2002. Isolamento e propagação da *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. Rev. Bras. Ciênc. Vet. 9, 77-82.

Troy, G.C., Forrester, S. D., 2006. Canine ehrlichiosis. In: Greene, C.E (3th Ed.). Infectious diseases of the dog and cat. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 404-418.

Ueno, T.E.H., Aguiar, D.M., Pacheco, R.C., Richtzenhain, L.J., Ribeiro, M.G., Paes, A.C., Megid, J., Labruna, M.B., 2009. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18, 57-61.

Unver, A.; Perez, M.; Orellana, N.; Huang, H.; Rikihisa, Y. 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J. Clin. Microb.* 39, p.2788-2793.

Waner, T., Harrus, S., Jonjegan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, A.W.C.A., 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.* 95, 1-15.

Watanabe, M., Oikawa, T., Hiraoka, H., Kaneko, N., Itamoto, K., Mizuno, T., Okuda, M., Inokuma, H., 2005. Experimental inoculation of beagle dogs with *Ehrlichia* species detected from *Ixodes ovatus*. *Vet. Parasitol.* 136, 147–154.

Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Hyung-Yong, K., Zhi, N., Couto, G.C., Unver, A., Bartsch, R., 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1852–1855.

Woody, B.J., Hoskins, J.D., 1991. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21, 75-98.

4 CONCLUSÕES

- ➔ Erliquiose e anaplasrose caninas são enfermidades freqüentes em Teresina-PI
- ➔ A mono-infecção mais frequente em cães de Teresina-PI é a anaplasrose
- ➔ A nPCR demonstrou ser uma técnica mais eficiente no diagnóstico de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* quando comparada a pesquisa direta.
- ➔ Trombocitopenia tem associação com a infecção por *Ehrlichia canis*
- ➔ Linfadenopatia tem associação com a infecção por *Anaplasma platys*
- ➔ A co-infecção entre *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e/ou *Leishmania (L) chagasi* apresenta uma freqüência relevante para a rotina clínica veterinária em Teresina-PI

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

- 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. 202f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, 1998.
- ALMOSNY, N. R. P. et al. Avaliação hematológica de cães infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, p. 111-112, 2000.
- ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, 2002. p. 13-56.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v. 4, p. 31-38, 1999.
- ANDERSON, B. E. et al. *Amblyoma americanum*: a potencial vector of human ehrlichiosis. **American Journal of Medical Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 239-244, 1993.
- ANDERSON, B. E. et al. *Ehrlichia chaffeensis*: a new species associated with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.12, p.2838-2842, 1991.
- ANZIANI, O. S.; EWING, S. A.; BARKER, R. W. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 929–931, 1990.
- BAKKEN, J. S. et al. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States: a new species emerging? **Journal of American Medical Association**, v. 272, n. 3, p. 212-218, 1994.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006.
- BARTSCH, R. C.; GREENE, R. T. Post-Therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: Follow-Up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxyclyline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, p. 271-274, 1996.

BREITSCHWERDT, E. B. et al. Molecular evidence supporting *Ehrlichia-canis* infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 642-649, 2002.

BREITSCHWERDT, E. B. The Riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 422-429.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2645–2651, 1998.

BROWN, G. K. et al. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, p. 554-558, 2001.

BULLA, C. et al. The relation ship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146, 2004.

CARRILLO, J. M.; GREEN, R. A. A case report of Canine Ehrlichiosis: Neutrophilic Strain. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 14, p. 100-104, 1978.

CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 73-86, 2004.

CHANG, W. L.; PAN, M. J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimen by two-step PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 3142-3146, 1996.

CHEN, S. M. et al. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 589-595, 1994.

CIARAMELLA, P. et al. Retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 863-884, 2003.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 477- 486.

CORTESE, L. et al. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 546–548, 2006.

COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COUTO, C. G., Doenças Rickettsiais. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, E. G., **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**. 2 ed. São Paulo: Roca. 2003, p. 138-140.

DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 22, p. 191-201, 2001.

DANTAS-TORRES, F., FAUSTINO, M. A. G., ALVES, L. C. Coinfection by *Anaplasma platys*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in a dog from Recife, Pernambuco, Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 13, p. 371, 2004.

DAWSON, J. E. et al. Tissue diagnosis of *Ehrlichia chaffeensis* in patients with fatal ehrlichiosis by use of immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 603-609, 2001.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses filiales de l'Ouest- Africain et de Madagascar, Siege de la société** : Institut Pasteur, Paris, Masson & Cie., Éditeurs, Libraires de L'Académie de Medicine, p.418-419, 1935.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophyla*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E.canis*. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, p. 540-543, 1991.

FISHBEIN, D. B.; DAWSON, J. E.; ROBINSON, L. E. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, p. 736-743, 1994.

FRY, M. M.; MCGAVIN, M. D. Médula Óssea, Células Sanguíneas e Sistema Linfático. In.: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 792-793.

GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W.B. Saunders. 1990, p. 545-561.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997a.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **The Veterinary Record**, v.141, p.247-250, 1997b.

HARRUS, S. 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.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, p. 182-188, 1978.

HIBLER, S.; HOSKINS, J. D.; GREENE, C. E. Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **The Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian**, v. 8, n. 2, p.106-114, 1986.

HUXSOLL, D. L. et al. Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 157, p. 1627-1632, 1970.

IKEDA, F. A. et al. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 5-11, 2007.

INOKUMA, H. et al. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions on peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 145-152, 2002.

- INOKUMA, H. et al. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 343-348, 2003.
- 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, p. 4219-4221, 2000.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Compararison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p.1658-1662, 1994.
- JOHNSON, E. M. et al. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 277-288, 1998.
- KAVINSKI, L. C. et al. Ocorrência de um caso de erliquiose canina em Curitiba- PR. **Revista Set Ciências Agrárias**, v. 10, p. 217-219, 1988.
- KELCH, W. J. The canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia) epizootic in Vietnam and its implications for the veterinary care of military working dogs. **Military Medicine**, v. 149, p. 327-331, 1984.
- KORDICK, S. K. et al. Coinfection with multiple tick-borne pathogens a Walker Hound Kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2631-2638, 1999.
- KOUTINAS, F. 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.
- LABARTHE, N. et al. A. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, p. 67-75, 2003.
- LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 189-195, 2007.
- LEWIS, D. C. Immune-mediated thrombocitopenia. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinaary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Wilkins, 2000. p. 807-814.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004. Suplemento.

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

MORAES, H. A. et al. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia* spp. **Clínica Veterinária**, v. 9, p. 28-30, 2004.

MOREIRA, S. M. et al. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 141-147, 2003.

MOREIRA, S. M.; MACHADO, R.; PASSOS, L. F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, v. 35, p. 958-960, 2005.

MUTANI, A.; KAMINJOLO, J. S. The value of *in vitro* cell culture of granulocytes in the detection of *Ehrlichia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 377-380, 2001.

MYLONAKIS, M. E. et al. Chronic canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, p. 174-184, 2004.

MYLONAKIS, M.; KOUTINAS, A.; BILINIS, C. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v. 91, p. 197-204, 2003.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, p. 766-770, 2008.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Estudo comparativo entre a PCR baseada no gene *dsb* e a nested PCR no diagnóstico da erliquiose canina. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 13., 2004, Ouro Preto. **Anais...Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2004.

NELSON, R. W.; COUTO, G. E.; Doenças riquetsianas polissistêmicas. In: NELSON, R. W.; COUTO, G. E. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1006-1011.

NICHOLSON, W. L. et al. Zoonoses of people and pets in the USA: The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, 2010.

NYSSA, J. R. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 19, p. 68-74, 2004.

OLIVEIRA, D. et al. *Ehrlichia canis* antibodies detection by "DOT ELISA" in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p.1-6, 2000.

ORIÁ, A. P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J. L. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1289-1295, 2004.

PIRES, L. V. et al. Ocorrência de Erliquiose Canina no Hospital Veterinário Universitário – UFPI. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais eletrônicos...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008. Disponível em: < <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0417-1.pdf>>. Acesso em: 12 março 2010.

PREZIOSI, D. E.; COHN, L. A. The increasingly complicated story of *Ehrlichia*. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, p. 277-288, 2002.

REINE, N. J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 19, p. 68-74, 2004.

RIKIHISA, Y. Diagnosis of emerging ehrlichial diseases of dogs, horses, and humans. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 250-251, 2000.

RIKIHISA, Y. The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 286-308, 1991.

SANTARÉM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos, e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis***. 2003. Quantidade folhas? Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2003.

SHIPOV, A. et al. Prognostic factors for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 131-138, 2008.

SILVA, V. L. D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental**. 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SMITH, R. D. et al. Development of ehrlichia canis, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 119-126, 1976.

SPARAGANO, O. A. E. et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 527-534, 2003.

SUKSAWAT, J. et al. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 90-93, 2001.

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**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1989. p. 277-281.

TAKAHIRA, R. K. et al. Detecção de anticorpos contra *Ehrlichia platys* e *Ehrlichia canis* em cães. **Revista Nosso Clínico**, v. 6, p. 34-38, 2003.

TAMÍ, I. D. C. D.; TAMÍ-MAURY, I. M. Identificación morfológica de *Ehrlichia sp.* Em las plaquetas de pacientes com infección por virus de la inmunodeficiencia humana, em Venezuela. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 16, p. 345-349, 2004.

THOMAS, L. D. et al. Human ehrlichiosis in transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, v. 7, p. 1641-1647, 2007.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006. p. 404-418.

UENO, T. E. H. et al. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

- UNVER, A. et al. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2788-2793, 2001.
- WANER, T. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 177-82, 1995.
- WANER, T. et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 1-15, 2001.
- WANER, T.; HARRUS, S. Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In: CARMICHAEL, L.E. (Ed.) **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**, International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/waner/ivis.pdf Consultado em: 04/07/2009.
- WATANABE, M. et al. Experimental inoculation of beagle dogs with *Ehrlichia* species detected from *Ixodes ovatus*. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 147-154, 2005.
- WEISIGER, R. M.; RISTIC, M.; HUXOLL, D. L. Kinetics of antibody response to *E. canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. **American Journal of Veterinary**, v. 36, p. 689-694, 1975.
- WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; HYUNG-YONG, K.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1852-1855, 1997.
- WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, p. 75-98, 1991.

ANEXO

Valores de referência para hemograma

| Valores | Hem/mm³ | Hb(g/%) | VG(Ht) | VGM(fl) | CHGM% | Plq/mm3 | Leuc/mm3 | neutróf/mm3 | linfóc/mm3 | eosin./mm3 | monóc/mm3 |
|----------------|---------------------------|----------------|---------------|----------------|--------------|----------------|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Normais | 5.5 - 8.5 | 12 - 18 | 37 - 55 | 60 - 77 | 31 - 36 | 200 - 500 | 6000-17000 | 3000-11001 | 1000-5000 | 100-1200 | 100-1300 |

Segundo Garcia-Navarro, 1994.

Valores normais para bioquímico

| Valores | URÉIA(MG/dL) | CREAT(mg/dL) | ALT(UI/L) | PT(g/dL) | ALB(g/dL) | GLOB(d/dL) |
|----------------|---------------------|---------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Normais | 20 – 60 | ≤1,5 | ≤ 50 | 5,8-7,1 | 2,6 - 3,3 | 2,7 - 4,4 |

Segundo: Kaneko (1997), adaptado pelo Laboratório de Patologia Clínica- HVU/UFPI

APÊNDICE

FICHA DE EXAME CLÍNICO

Identificação

Animal nº _____ Proprietário: _____
 Sexo: Macho () Fêmea (); Cor: _____ Raça _____
 Peso: _____ Kg; Idade: _____
 Procedência: _____
 Suspeita clínica _____
 Resultado Parasitológico: _____ PCR: _____
 Data : ____/____/____

Exame clínico

Sem alterações clínicas: Sim () Não ()
 Anorexia/Hiporexia: Sim () Não ()
 Linfadenopatia: Sim () Não ()
 Esplenomegalia: Sim () Não ()
 Perda de peso: Sim () Não ()
 Claudicação(poliartrite): Sim () Não ()
 Edema: Sim () Não () local: _____
 Apatia: Sim () Não ()
 Febre: Sim () Não () T _____ °C
 Onicogribose: Sim () Não ()
 Mucosas pálidas: Sim () Não ()
 Poliúria Sim () Não ()
 Polidipsdia: Sim () Não ()
 Epistaxe: Sim () Não ()
 Petéquia: Sim () Não (), local: _____
 Conjuntivite: Sim () Não ()
 Alterações nervosas: _____
 Alterações oftálmicas: _____
 Alterações digestivas: _____
 Alterações respiratórias: _____
 Alterações urinárias: _____
 Alterações reprodutivas: _____
 Alterações dermatológicas:
 -Alopecia: Sim () Não (), local: _____
 -Lesões: Sim () Não (), local: _____
 -Úlceras: Sim () Não (), local: _____
 -Descamação furfurácea na pele (seborréia): Sim () Não ()
 -Hiperetarose: Sim () Não ()
 -Infestação por carrapatos: () Sim () Não; atual () anterior ()

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Erliquiose e Anaplasmoses Caninas em Teresina, Piauí

Pesquisador responsável: Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva (orientadora) e Lucilene dos Santos Silva (mestranda)

Telefone para contato: (86) 32155760 / (86) 3212 1060 / (86) 88073567

Instituição/Departamento: Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/Universidade Federal do Piauí

Local da coleta de dados: () Hospital Veterinário Universitário/UFPI

() Clínica Veterinária _____

Prezado(a) Senhor(a): _____

- Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda as informações e instruções que lhe foram repassadas
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes que você se decida a participar.
- Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Objetivo do estudo: Confirmar a presença e frequência de erliquiose e anaplasmoses caninas em Teresina, Piauí

Procedimentos: Sua participação nesta pesquisa consistirá apenas em autorizar a coleta de amostras de sangue para realização de hemograma, exames bioquímicos e extração de DNA, além de amostras de linfonodo poplíteo e de medula óssea esternal de seu cão, e de responder aos questionamentos sobre histórico e sinais que o seu animal está manifestando.

Benefícios: Esta pesquisa trará conhecimento sobre a situação dessas enfermidades em nosso estado, haja visto que ainda não se tem informações oficiais que confirmem a presença das

mesmas aqui, de modo que a partir dessa confirmação possa ser instituída uma terapêutica apropriada para essas infecções. A pesquisa não trará benefício direto para você.

Riscos: A participação nesta pesquisa não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para você. Nem riscos para seu animal, exceto um desconforto durante a realização da coleta caso o animal fique agitado.

Custos/ Reembolso para os participantes: Os participantes da pesquisa não arcarão com nenhum gasto decorrente da sua participação (questionário, exames laboratoriais e acesso ao resultado de seu animal). Assim como não receberão qualquer espécie de reembolso ou gratificação devido à participação na pesquisa.

Sigilo: As informações fornecidas por você serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os dados dos cães da pesquisa serão divulgados apenas em grupos, e no que se refere a sexo, raça e idade dos mesmos no final de pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG _____/CPF _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pela mestrandia Lucilene dos Santos Silva dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa e, portanto, autorizando a coleta das amostras de meu cão NOME: _____ IDADE: _____ SEXO: _____ e RAÇA _____. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Teresina, _____ de _____ de _____

Assinatura do responsável

Distribuição dos grupos por sexo

| GRUPOS | E. canis | | A. platys | | Leishmania | | G1 | | G2 | | G3 | | G4 | | G5 | | outras patologias | | TOTAL |
|---------------|----------|-----|-----------|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|-------|
| | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | |
| SEXO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MACHOS | 16 | 133 | 25 | 124 | 25 | 124 | 15 | 134 | 10 | 139 | 6 | 143 | 16 | 133 | 1 | 148 | 35 | 114 | 149 |
| FEMEAS | 8 | 113 | 23 | 98 | 20 | 101 | 9 | 112 | 7 | 114 | 8 | 113 | 9 | 112 | 0 | 121 | 37 | 84 | 121 |
| TOTAL | 24 | | 48 | | 45 | | 24 | | 17 | | 14 | | 25 | | 1 | | 72 | | 270 |

Distribuição dos grupos por idade

| GRUPOS | E. canis | | A. platys | | Leishmania | | G1 | | G2 | | G3 | | G4 | | G5 | | outras patologias | | TOTAL |
|-------------------|----------|-----|-----------|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|-------|
| | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | SIM | NÃO | |
| IDADE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| < que 12 meses | 1 | 45 | 12 | 34 | 7 | 39 | 3 | 43 | 4 | 42 | 3 | 43 | 5 | 41 | 0 | 45 | 11 | 35 | 46 |
| 12 e 24 meses | 3 | 64 | 14 | 53 | 7 | 60 | 6 | 61 | 7 | 60 | 7 | 60 | 5 | 62 | 0 | 67 | 18 | 49 | 67 |
| 25 e 48 meses | 10 | 48 | 8 | 50 | 16 | 42 | 4 | 54 | 3 | 55 | 1 | 57 | 4 | 54 | 0 | 58 | 12 | 54 | 58 |
| > 48 meses | 10 | 83 | 14 | 79 | 12 | 81 | 11 | 82 | 3 | 90 | 3 | 90 | 11 | 82 | 1 | 92 | 28 | 65 | 93 |
| Não identificados | 0 | 6 | 0 | 6 | 3 | 3 | 0 | 6 | 0 | 6 | 0 | 6 | 0 | 6 | 0 | 6 | 3 | 3 | 6 |
| TOTAL | 24 | | 48 | | 45 | | 24 | | 17 | | 14 | | 25 | | 1 | | 72 | | 270 |

G1: *E. Canis* e *A. platys*

G2: *E. Canis* e *Leishmania*

G3: *E. Canis*, *A. platys* e *Leishmania*

G4: *A. Platys* e *Leishmania*

G5: *E. Canis*, *A. platys* e *Toxoplasma*

Parâmetros hematológicos dos animais mono-infectados com *A. platys*

| Animais | Hem/mm ³ | Hb(g/%) | VG(Ht)% | VGM(μ/m3) | CHGM% | Plaq/mm3 | Leuc/mm3 | Neutróf | bast/mm3 | linfóc | eosin | monóc |
|---------|---------------------|---------|---------|-----------|-------|----------|----------|---------|----------|--------|-------|-------|
| 1 | 6,32 | 12,4 | 37,4 | 59 | 33,3 | 538 | 25500 | 22.185 | 0 | 3060 | 0 | 255 |
| 2 | 6,54 | 13,7 | 44,5 | 68 | 30,8 | 199 | 20000 | 13200 | 0 | 3600 | 2800 | 0 |
| 3 | 4,44 | 9,6 | 24,9 | 56 | 38,7 | 301 | 15200 | 10944 | 0 | 3344 | 608 | 304 |
| 4 | 4,46 | 9,1 | 24,7 | 55 | 37 | 263 | 15.400 | 11242 | 0 | 3080 | 616 | 462 |
| 5 | 4 | 10 | 26,3 | 66 | 37,9 | 47 | 18800 | 10904 | 0 | 4136 | 2632 | 1128 |
| 6 | 5,66 | 11 | 30,1 | 53 | 36,7 | 91 | 15600 | 10296 | 0 | 3744 | 936 | 624 |
| 7 | 5,83 | 13,4 | 35,5 | 61 | 37,7 | 110 | 15300 | 9486 | 0 | 4590 | 612 | 612 |
| 8 | 6,14 | 13,9 | 37,3 | 61 | 37,3 | 362 | 13300 | 9044 | 0 | 3192 | 665 | 459 |
| 9 | 6,08 | 13,1 | 34,5 | 57 | 38 | 316 | 16800 | 11592 | 0 | 3360 | 1512 | 336 |
| 10 | 6,14 | 13,7 | 36,6 | 60 | 37,4 | 501 | 12400 | 8928 | 0 | 2976 | 248 | 248 |
| 11 | 6,23 | 14,2 | 37,6 | 60 | 37,7 | 184 | 24300 | 17010 | 0 | 4860 | 1944 | 486 |
| 12 | 3,44 | 7,8 | 20 | 58 | 38,9 | 50 | 3200 | 1664 | 0 | 1344 | 0 | 192 |
| 13 | 5,72 | 12,3 | 33,2 | 58 | 37,1 | 182 | 13500 | 8910 | 0 | 3510 | 540 | 540 |
| 14 | 4,83 | 10,6 | 29,1 | 60 | 36,3 | 229 | 13100 | 8908 | 0 | 3144 | 786 | 262 |
| 15 | 4,2 | 8,8 | 24 | 57 | 36,4 | 47 | 8000 | 5600 | 0 | 1760 | 320 | 320 |
| 16 | 7,5 | 18,5 | 49,8 | 66 | 37,1 | 178 | 11400 | 6156 | 0 | 4104 | 798 | 342 |
| 17 | 7,15 | 15 | 41,1 | 57 | 36,5 | 170 | 16000 | 10720 | 0 | 4000 | 640 | 640 |
| 18 | 4,64 | 10,6 | 29,5 | 64 | 36 | 100 | 8000 | 5680 | 0 | 1920 | 160 | 240 |
| 19 | 1,87 | 3,6 | 12,1 | 64 | 30,1 | 64 | 5700 | 3648 | 0 | 1710 | 0 | 342 |
| 20 | 1,38 | 2,7 | 8,4 | 60 | 31,7 | 128 | 27400 | 21646 | 0 | 3288 | 822 | 548 |
| 21 | 6,43 | 15,5 | 42,3 | 66 | 36,7 | 261 | 9900 | 5742 | 0 | 3366 | 198 | 594 |
| 22 | 6,65 | 13,7 | 36,9 | 56 | 37 | 212 | 30300 | 21210 | 0 | 6666 | 909 | 909 |
| 23 | 5,97 | 15,6 | 40,5 | 68 | 38,5 | 289 | 12800 | 7808 | 0 | 2048 | 768 | 384 |
| 24 | 7,05 | 16,7 | 44,9 | 64 | 37,2 | 81 | 9900 | 4257 | 0 | 3366 | 1386 | 297 |
| 25 | 4,77 | 11,5 | 30,6 | 64 | 37,4 | 33 | 7400 | 4588 | 0 | 1628 | 444 | 296 |
| 26 | 3,84 | 8,2 | 22,1 | 57 | 37,2 | 89 | 9800 | 4214 | 0 | 2156 | 1078 | 294 |
| 27 | 6,04 | 14,4 | 38,9 | 64 | 36,9 | 345 | 12100 | 6171 | 0 | 3388 | 1694 | 484 |
| 28 | 7,82 | 18,7 | 49,5 | 63 | 37,8 | 283 | 11600 | 8816 | 0 | 1276 | 348 | 464 |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|------|------|------|----|------|-----|-------|-------|---|------|------|------|
| 29 | 4,78 | 10,8 | 29,5 | 62 | 36,6 | 114 | 13000 | 8060 | 0 | 3900 | 780 | 260 |
| 30 | 6,53 | 14,1 | 38,3 | 59 | 36,7 | 230 | 17200 | 11180 | 0 | 4816 | 860 | 344 |
| 31 | 8,05 | 13,9 | 39,4 | 49 | 35,3 | 337 | 14100 | 9588 | 0 | 3243 | 846 | 423 |
| 32 | 5,3 | 10,4 | 29,4 | 56 | 35,5 | 129 | 18600 | 12090 | 0 | 5394 | 744 | 372 |
| 33 | 5,82 | 13,9 | 37,8 | 65 | 36,9 | 265 | 10900 | 7848 | 0 | 2180 | 545 | 327 |
| 34 | 6,4 | 14,1 | 38,1 | 60 | 36,9 | 211 | 33400 | 22044 | 0 | 8016 | 2004 | 1336 |
| 35 | 4,36 | 6,8 | 18,5 | 42 | 36,6 | 293 | 5000 | 3350 | 0 | 1400 | 0 | 250 |
| 36 | 5,41 | 11,9 | 32,1 | 59 | 37 | 193 | 11300 | 6893 | 0 | 3729 | 226 | 452 |
| 37 | 6,08 | 13,8 | 37,7 | 62 | 36,6 | 426 | 23900 | 14340 | 0 | 3585 | 3107 | 717 |
| 38 | 5,04 | 11 | 30,3 | 60 | 36,5 | 127 | 20800 | 14144 | 0 | 5408 | 416 | 832 |
| 39 | 7,04 | 15 | 40,9 | 58 | 36,6 | 254 | 17400 | 13050 | 0 | 3480 | 696 | 174 |
| 40 | 6,21 | 13,9 | 37,9 | 61 | 36,6 | 129 | 7300 | 4672 | 0 | 2190 | 292 | 146 |
| 41 | 5,54 | 13,3 | 35,8 | 65 | 37,3 | 451 | 11400 | 7980 | 0 | 2736 | 228 | 456 |
| 42 | 7,94 | 17,6 | 47,3 | 60 | 37,2 | 227 | 15400 | 10780 | 0 | 3696 | 616 | 308 |
| 43 | 7,72 | 17,7 | 47,6 | 62 | 22,9 | 236 | 7800 | 4914 | 0 | 2418 | 156 | 312 |
| 44 | 4,86 | 10 | 27,7 | 57 | 36,3 | 308 | 13900 | 8896 | 0 | 4448 | 278 | 278 |
| 45 | 6,01 | 14,2 | 38,2 | 64 | 37 | 448 | 12000 | 8280 | 0 | 2880 | 600 | 240 |
| 46 | 4,3 | 9,6 | 24,8 | 66 | 38,6 | 286 | 15000 | 10500 | 0 | 3000 | 450 | 300 |
| 47 | 5,55 | 10,9 | 34,8 | 63 | 31,3 | 264 | 18700 | 11968 | 0 | 3553 | 2431 | 8228 |
| 48 | 6,88 | 13,9 | 44,4 | 65 | 31,4 | 241 | 11700 | 7956 | 0 | 2808 | 702 | 234 |

Parâmetros hematológicos dos animais mono-infectados com *E. canis*

| Animais | Hem/mm³ | Hb(g%) | VG(Ht)% | VGM(μ/m3) | CHGM% | Plaq/mm3 | Leuc/mm3 | neutróf | bast/mm3 | linfóc | eosin | monóc |
|----------------|---------------------------|---------------|----------------|------------------|--------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|--------------|--------------|
| 1 | 6,54 | 13,3 | 39,5 | 60 | 33,6 | 48 | 8400 | 5880 | 0 | 1176 | 672 | 672 |
| 2 | 3,67 | 9,5 | 24,3 | 66 | 39,3 | 35 | 8100 | 5589 | 0 | 2106 | 243 | 162 |
| 3 | 5,98 | 11,6 | 37,3 | 62 | 31,1 | 95 | 13100 | 6419 | 0 | 6157 | 262 | 262 |
| 4 | 2,27 | 4,3 | 13,2 | 58 | 32,8 | 34 | 3600 | 2520 | 0 | 1008 | 0 | 126 |
| 5 | 8,21 | 17,4 | 53,1 | 65 | 32,8 | 52 | 18700 | 15895 | 0 | 2057 | 374 | 374 |
| 6 | 8,42 | 16,7 | 45,4 | 54 | 36,8 | 563 | 20500 | 14350 | 0 | 4510 | 1230 | 410 |
| 7 | 3,49 | 7,2 | 19,4 | 55 | 37,2 | 328 | 6000 | 4440 | 0 | 1200 | 0 | 240 |
| 8 | 3,14 | 7,2 | 19,4 | 62 | 37,3 | 845 | 9400 | 6768 | 0 | 1880 | 564 | 188 |
| 9 | 3,57 | 7,7 | 21,3 | 60 | 35,9 | 257 | 15600 | 13884 | 0 | 1092 | 0 | 624 |
| 10 | 5,95 | 13,1 | 36,2 | 61 | 36,2 | 146 | 11800 | 8732 | 0 | 2124 | 708 | 236 |
| 11 | 4,4 | 10,2 | 27,7 | 63 | 36,9 | 100 | 14300 | 10296 | 0 | 3146 | 286 | 572 |
| 12 | 4,54 | 11,8 | 26,7 | 59 | 44,3 | 158 | 11000 | 6380 | 0 | 3520 | 660 | 440 |
| 13 | 4,71 | 10,8 | 28,9 | 62 | 37,2 | 73 | 18400 | 12880 | 0 | 4416 | 368 | 736 |
| 14 | 4,85 | 10,6 | 27,9 | 58 | 37,8 | 271 | 25400 | 18796 | 0 | 5334 | 762 | 508 |
| 15 | 2,71 | 7,8 | 21,3 | 79 | 36,8 | 137 | 34100 | 21142 | 0 | 8866 | 682 | 2046 |
| 16 | 7,47 | 17,5 | 48,2 | 64 | 36,4 | 188 | 7600 | 5624 | 0 | 1520 | 304 | 152 |
| 17 | 4,83 | 9,9 | 26,3 | 54 | 37,6 | 59 | 10300 | 8137 | 0 | 1545 | 206 | 412 |
| 18 | 4,09 | 9,9 | 26,6 | 65 | 37,1 | 122 | 43100 | 33618 | 0 | 7758 | 862 | 862 |
| 19 | 7,05 | 16,8 | 44,4 | 63 | 37,9 | 89 | 12200 | 8662 | 0 | 1708 | 1342 | 488 |
| 20 | 3,8 | 7,9 | 21,4 | 56 | 37,6 | 145 | 13800 | 8280 | 0 | 1656 | 3174 | 690 |
| 21 | 3,93 | 6,7 | 20,9 | 53 | 32,2 | 77 | 7700 | 6160 | 0 | 1155 | 154 | 231 |
| 22 | 7,01 | 15,4 | 40,9 | 58 | 37,6 | 118 | 7900 | 4554 | 0 | 2212 | 316 | 158 |
| 23 | 5,9 | 14,8 | 38,4 | 65 | 38,4 | 262 | 16900 | 12337 | 0 | 3549 | 676 | 338 |
| 24 | 5,08 | 12 | 31,3 | 62 | 38,4 | 72 | 5500 | 4125 | 0 | 1045 | 220 | 110 |

Parâmetros bioquímicos de cães mono-infectados com *E. canis*

| ANIMAIS | URÉIA | CREATININA | ALT | PT | ALBUMINA | GLOBULINA |
|----------------|--------------|-------------------|------------|-----------|-----------------|------------------|
| 1 | 58,8 | 0,8 | 9,6 | 10,71 | 3,37 | 7,34 |
| 2 | 21,6 | 0,7 | 65,5 | 10,26 | 2,03 | 8,23 |
| 3 | 115,8 | 1,4 | 8,7 | 7,74 | 2,74 | 5 |
| 4 | 54,5 | 1,6 | 46,8 | 8,42 | 3,64 | 4,78 |
| 5 | 21,3 | 2,4 | 29,9 | 8,66 | 3,01 | 5,65 |
| 6 | 30,1 | 1 | 6,7 | 7,91 | 2,59 | 5,32 |
| 7 | 48,8 | 1,3 | 1,4 | 8,62 | 1,15 | 7,47 |
| 8 | 29,6 | 0,1 | 4,9 | 7,82 | 1,28 | 6,54 |
| 9 | 249,9 | 3,8 | 1,4 | 5,62 | 1,4 | 4,22 |
| 10 | 13,6 | 1,1 | 6,7 | 7,99 | 2,84 | 5,15 |
| 11 | 80,6 | 0,3 | 31,8 | 11,74 | 1,31 | 10,43 |
| 12 | 28 | 1,5 | 2,4 | 7,46 | 2,61 | 4,85 |
| 13 | 30,1 | 0,5 | 8,7 | 9,83 | 2,99 | 6,84 |
| 14 | 122,5 | 0,5 | 2,4 | 9,96 | 2,86 | 7,1 |
| 15 | 139,4 | 3 | 34,7 | 10,64 | 2,23 | 8,41 |
| 16 | 38,3 | 1,4 | 16,9 | 8,02 | 3,53 | 4,49 |
| 17 | 40,9 | 0,8 | 12 | 7,97 | 2,64 | 5,33 |
| 18 | 34,3 | 1,3 | 72,3 | 8,15 | 1,71 | 6,44 |
| 19 | 40,5 | 1,4 | 9,6 | 7,87 | 2,84 | 5,03 |
| 20 | 31,1 | 0,6 | 12 | 10,19 | 2,53 | 7,66 |
| 21 | 23,8 | 1,4 | 8,7 | 6,16 | 5,04 | 1,12 |
| 22 | 69 | 0,8 | 6,7 | 9,86 | 2,34 | 7,52 |
| 23 | 23,8 | 1 | 12 | 9,73 | 2,79 | 6,94 |
| 24 | 32,4 | 0,5 | 18,3 | 9,75 | 3,65 | 6,1 |

ALT= ALANINO AMINOTRANSFERASE; PT= PROTEÍNAS TOTAIS

Parâmetros bioquímicos dos animais mono-infectados com *A. platys*

| Animais | URÉIA | CREATININA | ALT | PT | ALBUMINA | GLOBULINA |
|---------|-------|------------|------|-------|----------|-----------|
| 1 | 64,8 | 1,2 | 13,5 | 9,37 | 3,68 | 5,69 |
| 2 | 25,3 | 1,5 | 3,4 | 9,26 | 2,9 | 6,36 |
| 3 | 25,9 | 0,8 | 9,6 | 9,13 | 2,3 | 6,83 |
| 4 | 82,5 | 0,9 | 1,4 | 9,61 | 1,46 | 8,15 |
| 5 | 34,9 | 0,7 | 4,8 | 7,43 | 3,55 | 3,88 |
| 6 | 23,5 | 0,8 | 6,7 | 11,83 | 2,9 | 8,93 |
| 7 | 55,4 | 2,1 | 2,4 | 8,59 | 4,53 | 4,06 |
| 8 | 249,9 | 2,2 | 12 | 4,92 | 1,75 | 3,17 |
| 9 | 15,4 | 0,6 | 15,4 | 8,72 | 2,22 | 6,5 |
| 10 | 21,5 | 1,5 | 4,8 | - | - | - |
| 11 | 54,4 | 0,7 | 23,6 | 8,25 | 2,72 | 5,53 |
| 12 | 92,5 | 1,6 | 72,3 | 7,1 | 2,31 | 4,79 |
| 13 | 64 | 1,7 | 8,7 | 9,42 | 5,17 | 4,25 |
| 14 | 57,5 | 0,9 | 1,4 | 9,5 | 3,92 | 5,58 |
| 15 | 102,5 | 1,3 | 3,9 | 10,76 | 1,65 | 9,11 |
| 16 | 34 | - | 4,8 | - | - | - |
| 17 | 21 | 1,4 | 13,5 | 9,97 | 7,74 | 2,23 |
| 18 | 17,4 | 1,5 | 1,4 | 9,88 | 1,84 | 8,04 |
| 19 | 18,1 | 1 | 18,3 | 6,94 | 2,81 | 4,13 |
| 20 | 85,2 | 2,7 | 8,7 | 6,6 | 1,43 | 5,17 |
| 21 | 60,4 | 1,3 | 6,7 | 7,5 | 4,58 | 2,92 |
| 22 | 28,8 | 0,9 | 1,9 | 8,16 | 1,94 | 6,22 |
| 23 | 83,4 | 3,3 | 16,9 | 9,96 | 3,92 | 6,04 |
| 24 | 44 | 1,2 | 4,8 | 9,58 | 3,45 | 6,13 |
| 25 | 73,1 | 2,3 | 27,5 | 12,38 | 3,76 | 8,62 |
| 26 | 69,4 | 0,5 | 12 | 11,26 | 2,93 | 8,33 |
| 27 | 36,3 | 1,1 | 6,7 | 7,02 | 4,24 | 2,78 |
| 28 | 76,1 | 2,5 | 16,9 | 10,46 | 5,91 | 4,55 |
| 29 | 45,1 | 2,2 | 8,7 | 10,3 | 3,9 | 6,4 |
| 30 | 35,4 | 1,2 | 1,4 | 10,87 | 3,22 | 7,65 |
| 31 | 78,1 | 2,4 | 16,9 | 8,31 | 4,35 | 3,96 |
| 32 | 38,3 | 1,4 | 6,7 | 11,28 | 2,64 | 8,64 |
| 33 | 51,3 | 2,3 | 2,4 | 11,62 | 3,22 | 7,65 |
| 34 | 95 | 2,3 | 13,5 | 8,55 | 4,48 | 4,07 |
| 35 | 21,1 | 1,2 | 21,6 | 7,79 | 2,74 | 5,05 |
| 36 | 34,8 | 0,8 | 4,8 | 8,06 | 2,46 | 5,6 |
| 37 | 67,5 | 1,3 | 27,5 | 9,4 | 4,26 | 5,14 |
| 38 | 26,6 | 0,9 | 3,4 | 5,94 | 2,36 | 3,58 |
| 39 | 8,1 | 0,4 | 12 | 9,19 | 2,44 | 6,75 |
| 40 | 16,8 | 1,5 | 2,4 | 8,3 | 2,95 | 5,35 |
| 41 | 78,5 | 0,4 | 31,8 | 8,57 | 3,49 | 5,08 |
| 42 | 33,6 | 1,1 | 15,4 | 9,76 | 3,8 | 5,96 |
| 43 | 35,4 | 1,9 | 25 | 9,64 | 2,43 | 7,21 |

| | | | | | | |
|----|------|-----|------|-------|------|-------|
| 44 | 30 | 0,5 | 1,4 | 12,3 | 1,8 | 10,33 |
| 45 | 59,6 | 1 | 8,7 | 6,71 | 3,56 | 3,15 |
| 46 | 58,4 | 3,8 | 18,3 | 14,2 | 4,17 | 10,03 |
| 47 | 51,4 | 2,3 | 6,9 | 9,65 | 2,75 | 6,9 |
| 48 | 76,4 | 0,9 | 3,4 | 10,14 | 3,71 | 6,43 |
