



DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO
DE MEDICINA VETERINÁRIA**

Área de Patologia Clínica em Pequenos Animais

Acadêmico: Luciana de Carvalho Firmino

Orientador: Prof. Msc. Ricardo Sampaio Marques

Supervisores: Prof. Msc. Adilson Donizeti Damasceno

**Brasília – DF
Junho, 2007**



DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO
DE MEDICINA VETERINÁRIA

Elaborado por:

Luciana de Carvalho Firmino

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA.

Orientador

Prof. Msc Ricardo Sampaio Marques

MV Msc Daniel

MV Luiz Felipe

Junho de 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado todos os meus passos e me conduzido para um caminho de luz, superando cada obstáculo que a mim foram competidos até o presente momento.

Ao meu pai, por confiar na minha capacidade de crescimento e permitir a realização de grandes sonhos. A minha mãe, por toda a paciência, dedicação e auxílio na superação de algumas difíceis passagens da minha vida.

Ao meu irmão com quem sempre pude contar de forma pessoal e também no decorrer do meu aprendizado, tanto a nível acadêmico quanto sentimental. A minha irmã que mesmo á distancia transmite força para correr atrás dos meus objetivos, acreditando sempre em meu potencial.

Ao amor incondicional da minha cachorrinha Bia quem sempre me recepcionou de forma calorosa depois de um dia cansativo de estudos.

Ao meu orientador Ricardo Sampaio Marques pela transmissão de conhecimentos, auxílio na elaboração de cada etapa desse trabalho e por ser, em parte, responsável pela descoberta da minha paixão pela patologia clínica.

Ao meu supervisor Adilson Donizete Damasceno e aos amigos conquistados durante o estágio supervisionado pela introdução de novos conceitos e incansável apoio na minha evolução profissional.

Aos meus amigos por me proporcionarem momentos inesquecíveis de felicidade e por serem ombros de apoio quando precisei.

Aos mestres que me acompanharam ao longo do curso como verdadeiros companheiros, dando incentivo e auxiliando na vitória de cada etapa concretizada.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
1. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	6
2. INTRODUÇÃO	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Hepatozoonose canina	17
3.2. Eriquiose monocítica canina	23
3.3. Babesiose canina	32
4. DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÃO	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - As setas apontam o gametócito do *Hepatozoon canis* em neutrófilos encontrado na visualização do esfregaço sangüíneo ao aumento de 100 X.21
- Figura 2 - A seta aponta mórula de *Ehrlichia sp.* encontrada em linfócito, na visualização do esfregaço sangüíneo de cão, ao aumento de 100 X...29
- Figura 3 - A seta aponta mórula de *Ehrlichia sp.* encontrada em monócito, na visualização do esfregaço sangüíneo de cão, ao aumento de 100 X...30
- Figura 4 – No centro da imagem pode-se observar dois merozoítos de *Babesia sp.* encontrado em eritrócitos, na visualização do esfregaço sangüíneo de cão, ao aumento de 100 X.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número total de exames realizados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.	7
Tabela 2 - Outros exames de rotina realizados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.	7
Tabela 3 - Análises bioquímicas realizadas durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.	9
Tabela 4 - Hemogramas realizados para cada espécie durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.	9
Tabela 5 - Perfil hematológico dos pacientes relacionado com a quantidade encontrada durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 à 27 de abril de 2007.	10
Tabela 6 - Quantidade de leucogramas que apresentaram alteração do número total de leucócitos realizados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.	11
Tabela 7 - Quantidade de alterações no leucograma sem visualização de aumento ou redução no número total de leucócitos, realizados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.	11
Tabela 8 - Quantidade absoluta e relativa dos hemogramas realizados na rotina em comparação com os positivos para hemoparasitoses analisados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.	12

Tabela 9 - Demonstração da correlação entre os achados do leucograma com o número total de hemoparasitoses diagnosticadas durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.12

Tabela 10 - Demonstração da correlação entre os achados do leucograma com o número total de hemoparasitoses diagnosticadas durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.13

1. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O estágio supervisionado em Medicina Veterinária foi realizado na área de Patologia Clínica no laboratório do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás (UFG), em Goiânia, o qual se localiza dentro da Escola de Medicina Veterinária, Campus Samambaia (Campus II).

O início do estágio se deu no dia 12 de fevereiro e o término no dia 27 de abril, somando um total de 520 horas. As atividades foram desenvolvidas juntamente com os técnicos laboratoriais Helton e Maria, e o biomédico Wesley Francisco Neves, sob a supervisão do prof. Ms. Adilson Donizetti Damasceno e a orientação do prof. Ricardo Sampaio Marques. A rotina se iniciava às oito horas da manhã e terminava às 18:00 horas, sendo normalmente estendida, e tinha frequência de segunda-feira à sexta-feira.

O laboratório possui um computador com impressora e acesso a internet, uma bancada com duas pias, um destilador, um espectrofotômetro simples e outro de chama, um homogenizador de sangue, um contador automático de células com impressora, um analisador de bioquímica líquida, uma microcentrífuga, duas macrocentrífuga, dois banhos-marias, um refratômetro, quatro estufas, microscópios ópticos, duas geladeiras com congelador, vidrarias para os diferentes métodos de exames de fezes, para raspado de pele, urinálises, hemogramas e bioquímicas sangüíneas.

As amostras eram em sua maioria de animais atendidos no próprio hospital e eram encaminhadas através de um óculo lateral juntamente com a solicitação dos exames. Após o processamento do material, os resultados eram anotados em cadernos de hemogramas de pequenos animais e outro de grandes animais, urinálise, bioquímicos de pequenos animais e de grandes animais

separadamente, parasitológicos e de fluidos corpóreos. Em cada caderno era identificada a data, espécie, sexo, idade, nome do animal, proprietário e médico veterinário responsável pelo atendimento, além do tipo de material analisado.

O total de exames realizados durante os aproximados três meses de estágio estão relacionados na Tabela 1 de uma forma generalizada.

Tabela 1 - Número total de exames realizados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

Exames	Fevereiro	Março	Abril	Total
Hemograma	114	237	172	523
Bioquímico	202	461	391	1054
Outros ¹	62	112	70	244
Total	377	809	633	1819

1 - Urinálise, raspado de pele, exame de fezes, líquido.

O material para exame dos raspados de pele eram encaminhados em placas de petri esterilizadas e misturava-se ao material coletado hidróxido de sódio para clarificação dos pêlos facilitando assim a procura por ácaros, hifas de fungos e macroconídeos.

O material para urinálise era encaminhado em seringas e coletados por cistocentese, no caso das fêmeas, ou cateterização quando se tratava de machos. A urina era transportada para tubos cônicos, feita a análise física e a química com fitas reagentes comerciais, e centrifugada para a realização da sedimentoscopia de forma qualitativa.

Os resultados eram repassados para os cadernos específicos, permitindo a visualização destes pelos médicos veterinários e demonstrada a quantidade desenvolvida na Tabela 2.

Tabela 2 - Outros exames de rotina realizados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

Exames	Fevereiro	Março	Abril	Total
Urinálise	46	62	45	153
Fezes	2	6	5	13

Raspado de pele	14	43	20	77
Líquor	0	1	0	1
Total	62	112	80	244

Os tubos sem EDTA eram encaminhados para bioquímica sérica, permanecendo durante a parte da manhã em banho-maria para facilitar na retração do coágulo. Na parte da tarde eram centrifugados para a obtenção do soro e posteriormente analisados no aparelho de bioquímica líquida. As bioquímicas eram realizadas apenas nesse período, pois o aparelho permanecia a disposição de projetos de pesquisa durante toda a manhã.

Ao término do dia os resultados obtidos eram anotados no caderno de bioquímicos e as amostras encaminhadas fora do horário de processamento eram centrifugadas para obtenção do soro, o qual era repassado para um frasco tipo ependorfe com auxílio de uma pipeta e congelado para ser processado no dia seguinte com as novas amostras. Após a execução dos exames no período de estágio foram anotados todos os resultados de cada bioquímico individualmente, os quais estão demonstrados e totalizados na Tabela 3.

Os tubos de ensaios contendo EDTA eram encaminhados para hemograma completo e logo levados ao homogenizador, onde permaneciam por dois minutos antes de ser feita a leitura no contador de células que era previamente calibrado de acordo com a espécie a ser analisada e fornecia os resultados impressos. Enquanto estava sendo feita a leitura, confeccionavam-se as lâminas que eram coradas com panóptico rápido após secarem.

As lâminas confeccionadas eram observadas em microscópio óptico para contagem total de leucócitos, visualização da morfologia das células e pesquisa de hemoparasitas. Esse processo era feito pelo biomédico Wesley Francisco Neves, quem era responsável por concluir o exame e copiar os resultados para os cadernos, disponibilizado para os médicos veterinários do hospital.

O número total de hemogramas realizados para cada espécie está disposto na Tabela 4 e os resultados da série vermelha se encontram na Tabela 5, demonstrando os diferentes tipos de anemias e morfologia das hemácias.

Tabela 3 - Análises bioquímicas realizadas durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

Bioquímicos	Fevereiro	Março	Abril	Total
Uréia	30	44	38	112
Creatinina	54	132	94	280
Fosfatase Alcalina	32	79	62	173
Proteína Total	11	15	22	48
CK ¹	1	4	4	9
ALT ²	59	140	92	291
AST ³	6	28	30	64
GGT ⁴	2	5	12	19
Glicose	4	3	8	15
Albumina	0	9	10	19
Bilirrubina	3	7	11	21
Cálcio	0	0	4	4
Fósforo	0	0	4	4
Total	202	461	391	1054

1 – Creatinina quinase.

2 – Alano amino transferase.

3 – Aspartato amino transferase.

4 – Gama glutamil transpeptidase.

Tabela 4 - Hemogramas realizados para cada espécie durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

Meses	Canino	Felino	Bovino	Eqüino	Ovino	Total
Fevereiro	104	8	2	0	0	114
Março	218	11	0	8	0	237
Abril	148	6	6	10	2	172
Total	470	25	8	18	2	523

Tabela 5 - Perfil hematológico dos pacientes relacionado com a quantidade encontrada durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 à 27 de abril de 2007.

Perfil hematológico	Quantidade de exames	Valores relativos
Anemia normocítica normocrômica	192	26.81%
Anemia macrocítica normocrômica	4	0.56%
Anemia microcítica normocrômica	4	0.56%
Anemia microcítica hipocrômica	2	0.28%
Policitemia relativa	3	0.42%
Policitemia absoluta	6	0.84%
Anisocitose leve	36	5.03%
Anisocitose moderada	66	9.22%
Anisocitose intensa	1	0.14%
Trombocitopenia	105	14.66%
Trombocitose	3	0.42%
Macroplaquetas	6	0.84%
Policromasia	4	0.56%
Presença de eritroblastos	10	1.40%
Leve hipocromia	9	1.26%
Sem alterações	265	37%
Total	716	100%

A contagem e diferenciação de cem leucócitos durante a visualização da lâmina conferiam o número relativo de cada célula branca encontrada e depois era calculado o valor absoluto para uma melhor interpretação do leucograma.

Todos os resultados obtidos durante o período do estágio supervisionado estão expostos nas Tabelas 6 e 7. Tais conclusões foram baseadas nos valores absolutos encontrados em cada leucograma analisado.

Tabela 6 - Quantidade de leucogramas que apresentaram alteração do número total de leucócitos realizados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

	Leucocitose	Leucopenia
Neutrofilia	43	----
Neutropenia	----	77
Eosinofilia	3	----
Eosinopenia	6	54
Linfocitose	1	----
Linfopenia	4	53
Monocitose	14	----
Monocitopenia	----	35
Desvio à esquerda	30	5

Tabela 7 - Quantidade de alterações no leucograma sem visualização de aumento ou redução no número total de leucócitos, realizados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

Alterações no leucograma	Quantidade encontrada
Neutrofilia	----
Neutropenia	12
Eosinofilia	5
Eosinopenia	47
Linfocitose	4
Linfocitopenia	50
Monocitose	3
Monocitopenia	7
Linfócitos atípicos	4
Plasmócitos	1
Desvio à esquerda	34
Leucogramas incontáveis	2
Sem alterações	219

Após a obtenção dos perfis hematológicos dos animais avaliados durante o estágio supervisionado, foi desenvolvida uma tabela com valores absolutos e relativos das hemoparasitoses encontradas, os quais estão dispostos na Tabela 8.

Além disso, as alterações no eritrograma e leucograma dos animais com hepatozoonose, erliquiose e babesiose, foram analisadas e descritas nas Tabelas 9 e 10, as quais serão discutidas posteriormente.

Tabela 8 - Quantidade absoluta e relativa dos hemogramas realizados na rotina em comparação com os positivos para hemoparasitoses analisados durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

	Número absoluto	Número relativo
Número total de hemogramas	523	100%
Hepatozoonose	1	0.19%
Erliquiose	9	1.72%
Micoplasmose	2	0.38%
Babesiose	10	1.91%

O presente trabalho visa enfatizar os hemoprotozoários mais encontrados na medicina veterinária, evidenciando os de maior incidência nos caninos. Sendo assim, foram confeccionadas tabelas que demonstram as diferenças nos hemogramas e leucogramas dos pacientes acometidos por hepatozoonose, erliquiose e babesiose, as quais serão discutidas posteriormente.

Tabela 9 - Demonstração da correlação entre os achados do leucograma com o número total de hemoparasitoses diagnosticadas durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

Eritrograma	Hepatozoonose	Erliquiose	Babesiose	Total
Anemia Normocítica Normocrômica	Ausente	8 (88.9%)	9 (90%)	17
Anemia microcítica hipocrômica	Ausente	Ausente	1 (10%)	1
Anisocitose leve	Ausente	Ausente	1 (10%)	1
Anisocitose moderada	Ausente	1 (11.1%)	4 (40%)	5
Hipocromia leve	Ausente	1 (11.1%)	1 (10%)	2
Trombocitopenia	Ausente	7 (77.8%)	2 (20%)	9
Macroplaquetas	Ausente	1 (11.1%)	1 (10%)	2
Presença de eritroblastos	Ausente	1 (11.1%)	1 (10%)	2
Sem alteração	1 (100%)	1 (11.1%)	Ausente	2

Tabela 10 - Demonstração da correlação entre os achados do leucograma com o número total de hemoparasitoses diagnosticadas durante o estágio supervisionado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de 12 de fevereiro de 2007 a 27 de abril de 2007.

Leucograma	Hepatozoonose	Erlíquiose	Babesiose	Total
Leucopenia por neutropenia	Ausente	7 (77.8%)	Ausente	7
Leucopenia por linfopenia	Ausente	Ausente	2 (20%)	2
Panleucopenia	Ausente	1 (11.1%)	1 (10%)	2
Leucocitose por neutrofilia	Ausente	Ausente	1 (10%)	1
Leucocitose por monocitose	Ausente	Ausente	1 (10%)	1
Desvio à esquerda	1 (100%)	Ausente	1 (10%)	2
Eosinopenia	Ausente	5 (55.5%)	2 (20%)	7
Linfopenia	Ausente	3 (33.3%)	2 (20%)	5
Monocitopenia	Ausente	3 (33.3%)	Ausente	3
Linfócitos atípicos	Ausente	2 (22.2%)	Ausente	2
Sem alteração	Ausente	1 (11.1%)	2 (20%)	3

2. INTRODUÇÃO

Os parasitas internos ou endoparasitas vivem no interior do organismo dos animais domésticos, os quais conferem nutrição e proteção aos organismos, assumindo assim, o papel de hospedeiros (HENDRIX, 2006).

De acordo com Hendrix (2006) os hospedeiros que alojam as formas maduras ou que possuem reprodução sexuada são denominados definitivos. Já os que abrigam estágios mais imaturos ou de reprodução assexuada são os intermediários.

Os hemoprotozoários são organismos unicelulares encontrados no sistema circulatório de diversas espécies animais. A grande maioria desses organismos é encontrada em eritrócitos e são transmitidos, normalmente, através da picada do carrapato, possibilitando a inoculação dos parasitas na circulação sanguínea dos hospedeiros definitivos (HENDRIX, 2006).

No Brasil existe uma variedade muito grande de espécies de carrapatos acometendo os pequenos animais, o que é resultante dos diferentes ecossistemas pertencentes ao país. Além dessas características ambientais, a diversidade de hospedeiros de cada região facilita a existência de determinadas espécies de carrapato nos cães (LABRUNA et al., 2001).

O *Rhipicephalus sanguineus* é o hospedeiro intermediário de maior prevalência e distribuição no território brasileiro, o que foi comprovado por Labruna et al. (2001) através de estudos em áreas rurais.

Os animais acometidos apresentam vários sinais clínicos não patognomônicos da doença, necessitando assim de análises laboratoriais complementares para confirmação do diagnóstico.

O hemograma completo pode auxiliar no diagnóstico através da visualização dos parasitas em filmes sangüíneos. No caso das babesioses os organismos se alojam em eritrócitos, enquanto que nas hepatozoonoses e erliquioses os leucócitos são as células parasitadas.

Além disso, os esfregaços podem revelar modificações na morfologia dos eritrócitos que indicam a presença de microorganismos causadores de anemia hemolítica imunomediada como a formação de esferócitos e aglutinação (THRALL, 2007).

Pode-se ainda observar nos animais com hemoparasitoses que os valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito se apresentam em níveis menores que os referenciais, evidenciando uma anemia verdadeira.

A anemia pode ser classificada quanto aos índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM) e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), os quais podem estar reduzidos, normais ou aumentados, colaborando para a diferenciação de anemia regenerativa da não regenerativa e, assim, direcionando a suspeita clínica a um determinado parasita. A erliquiose, por exemplo, normalmente leva a uma anemia normocítica normocrômica arregenerativa, ao passo que a babesiose cursa com anemia hemolítica regenerativa (HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

Outra maneira de classificação em regenerativa e não regenerativa é a contagem de reticulócitos ou presença de anisocitose, ou seja, visualização de células jovens na circulação demonstrando que a medula óssea está produzindo novas células, sendo assim, uma anemia regenerativa. Essas células são frequentemente observadas em pacientes com babesiose (HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

No leucograma podem-se encontrar muitas variações, não se incluindo em um índice muito fidedigno na avaliação das hemoparasitoses. Basicamente, a erliquiose leva a uma redução dos níveis de leucócitos (leucopenia) e a babesiose e hepatozoonose levam ao aumento destes (leucocitose). A contagem diferencial é essencial para classificar o aumento ou redução de cada tipo de leucócito, o que pode classificar um processo agudo ou crônico.

Porém, a avaliação do hemograma e leucograma não devem ser conclusivas quanto à presença dos organismos intracelulares. Outros métodos

diagnósticos incluem a imunofluorescência indireta (IFI), a análise imunoabsorvente ligada à enzima (ELISA) e a reação em cadeia de polimerase (PCR), que são testes mais fidedignos na identificação do hemoparasita.

O teste de imunofluorescência indireta pode ser empregado para detecção de antígenos ou anticorpos. Consiste em um teste de referência na sorologia devido sua sensibilidade, especificidade, simplicidade na padronização e execução, determinação de classes e subclasses de anticorpos empregando-se conjugados específicos. Porém, o teste é um pouco limitado pela necessidade de um microscópio de fluorescência, subjetividade na leitura e a não-automatização (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Ferreira e Ávila (2001) relatam o ELISA como um teste de elevada sensibilidade e especificidade, é de rápida e fácil execução, baixo custo, leitura objetiva e pode se adaptar a diferentes graus de automatização. Sendo assim, tem sido cada vez mais empregada nos laboratórios, substituindo outros testes como o radioimunoensaio e o IFI.

O PCR é um método de amplificação de uma seqüência de bases nitrogenadas (fragmentos de DNA) específicas para um determinado organismo, sendo feita posteriormente à leitura em gel de agarose ou por hibridização. Consiste em um teste altamente sensível e específico, mas a escolha das bases específicas a serem amplificadas é crucial para um resultado fidedigno (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

O presente trabalho tem como principal objetivo comparar as alterações hematológicas com a presença de *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* e *Babesia spp.* Além disso, demonstrar a morfologia de cada parasita pela visualização em esfregaços sangüíneos e citar outros meios diagnósticos que podem ser empregados para um diagnóstico mais preciso.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Hepatozoonose canina

Hepatozoonose é causada por uma bactéria pertencente ao Filo Apicomplexa, Família Haemogregarinidae e Gênero Hepatozoon, que está intimamente relacionado à espécie Plasmodium e piroplasmas (GONDIM et al., 1998; BANETH et al., 2002; BANETH et al., 2003; GONEN et al., 2004; KARAGENC et al., 2005). Porém, O'Dwyer e Massard (2002) denominam a família a qual o parasita pertence de Hepatozoidae e compartilham das demais classificações.

Foram reconhecidas duas espécies distintas nos cães, *Hepatozoon canis* que predomina em regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo; e *Hepatozoon americanum* encontrado no sul dos Estados Unidos da América (EUA). Tal diferenciação foi baseada nos sinais clínicos, tropismo tecidual, características morfológicas, patológicas, genéticas e antigenicidade (VICENT-JOHNSON et al., 1997; PANCIERA et al., 1999; BANETH et al., 2000; BANETH et al., 2002; PALUDO et al., 2003; FORLANO et al., 2005).

Segundo Coles (1980) e Panciera (1999), o primeiro relato de hepatozoonose em cães foi no Texas. Em contrapartida, Baneth et al. (2001) e O'Dwyer e Massard (2002) relataram que o primeiro achado foi na Índia em 1905 por James, onde a doença foi caracterizada por anemia e letargia.

No Brasil foi primeiramente relatada no estado do Rio de Janeiro por Massard (1979), seguido dos estados de Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul por Massard et al. (1979), Mundim et al. (1994), O'Dwyer et

al. (1997) e Gondim et al. (1998) respectivamente, citados por O'Dwyer e Massard (2002) e Forlano et al. (2005).

A transmissão do *Hepatozoon canis* é feita pelo carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, ao passo que o *Hepatozoon americanum* é um protozoário que infecta o *Amblyomma maculatum* (VICENT-JOHNSON et al., 1997; PANCIERA et al., 1999; BANETH et al., 2000; BANETH et al., 2002; FORLANO et al., 2005).

Forlano et al. (2005) observaram a incidência de um novo vetor da hepatozoonose canina em áreas rurais, o *Amblyomma ovale*. Corroborando com os achados de O'Dwyer et al. (2000), que relatam à incidência de ambos os parasitas em regiões campestres.

O ciclo de vida do *Hepatozoon canis* se inicia pela ingestão do carrapato contaminado com oocistos maduros do protozoário circulantes na hemolinfa. Tais oocistos se rompem no trato digestório do hospedeiro definitivo (canino), liberando esporozoítos com capacidade de alcançar a parede intestinal e se disseminar via linfática ou sangüínea. A partir dessa disseminação infectam fagócitos mononucleares e células endoteliais do baço, fígado, pulmões, medula óssea, linfonodos e miocárdio, onde se instalam e formam cistos (BANETH et al., 1998; BANETH et al., 2001; BANETH e SHKAP, 2003; ETTINGER e FELDMAN, 2004; FORLANO et al., 2005).

São formados dois grupos a partir do processo denominado merogonia, o qual ocorre no interior dos órgãos hemolinfáticos dos cães acometidos. Os macromerontes responsáveis pela formação de novos esporozoítos, e os micromerontes que formam os gametócitos circulantes após penetrarem nos leucócitos e sofrerem um novo processo conhecido como gametogonia (BANETH et al., 2002; BANETH e SHKAP, 2003; ETTINGER e FELDMAN, 2004; FORLANO et al., 2005).

O parasita tem seu ciclo de vida concluído após o carrapato ingerir o sangue contaminado com gametócitos, culminando na formação de novos oocistos em sua hemolinfa (BANETH et al., 2000).

Segundo Baneth et al. (2000) e Ettinger e Feldman (2004), os gametócitos podem ser encontrados no citoplasma de neutrófilos e monócitos que circulam no sangue periférico do hospedeiro definitivo.

O período de incubação varia de 28 a 78 dias para detecção microscópica do gametócito circulante nas células sanguíneas e de 13 a 35 dias para merontes presentes na medula óssea. Em testes por imunofluorescência indireta obteve-se um período de sete semanas para detecção de títulos altos de anticorpos *anti-H. canis* em 100% dos animais acometidos (BANETH et al., 1998; BANETH et al., 2001).

Baneth et al. (2001) inocularam artificialmente e naturalmente ninfas de *Hepatozoon canis* nos ectoparasitas, os quais foram administrados via percutânea em um grupo de caninos e em outro procedeu a ingestão natural do parasita. O estudo demonstrou que a maior parte dos animais (75%) contaminados pela ingestão dos oocistos maduros na hemolinfa dos carrapatos apresentou parasitemia positiva. Ao passo que apenas 57% dos infectados percutaneamente obtiveram positividade.

A infecção por *Hepatozoon canis* pode se comportar desde uma forma assintomática até severa e potencialmente fatal, quando se encontra letargia, caquexia e anemia acentuada. Essa diferenciação também interfere na parasitemia, a qual se encontra elevada nos casos de severidade, obtendo 39% de neutrófilos e monócitos infectados. Ao passo que em casos leves e moderados esse valor decresce no máximo para 3% e 18%, respectivamente (GONDIM et al., 1996; VICENT-JOHNSON et al., 1997; O'DWYER et al., 2000; O'DWYER e MASSARD, 2002; BANETH et al., 2002; KARAGENC et al., 2005).

De acordo com Vicent-Johnson et al. (1997) e Karagenc et al. (2005) a doença tem manifestação subclínica em sua maioria e, conseqüentemente, uma parasitemia muito baixa (0,5%). A esse fato atribue-se uma pequena quantidade de células infectas circulantes no momento da coleta ou ao fato de que alguns gametócitos podem se perder com o processamento do material.

O'Dwyer et al. (2000) demonstraram que não há diferenciação na prevalência da infecção devido à idade dos animais. Em contrapartida, Mundim et al. (1994) observaram maior incidência em animais com menos de um ano de idade. Já Baneth e Weigler (1997) citam que a maior ocorrência da doença se dá em jovens com até seis meses e adultos entre 5 e 10 anos, apesar de que todas as idades podem ser acometidas.

É confirmado que a terapia com prednisolona reflete na liberação de gametócitos na circulação periférica após 48 horas da administração, culminando com o início da parasitemia. Outros fatores foram relatados em detrimento da imunossupressão, como animais com o sistema imune imaturo, disfunções congênitas ou doenças infecciosas que induzam a queda da imunidade em jovens, resultando na manifestação clínica da hepatozoonose (BANETH et al., 2001; BANETH et al., 2002; ETTINGER e FELDMAN et al., 2004).

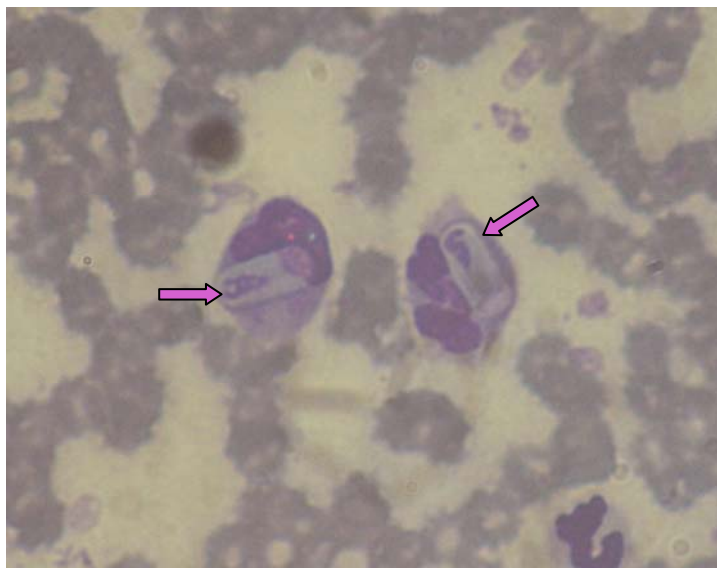
Os sinais clínicos observados são: anorexia, mucosas pálidas, perda de peso, dor, diarreia, vômito, andar cambaleante, febre, poliúria e polidipsia (GONDIM et al., 1998; PALUDO et al., 2003). Ettinger e Feldman (2004) relatam ainda a ocorrência de depressão, diarreia sanguinolenta e corrimento oculonasal.

Os achados hematológicos incluem anemia normocítica normocrômica regenerativa, leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda e monocitose. Alguns animais podem apresentar ainda eosinofilia e linfocitose (GONDIM et al., 1998; PALUDO et al., 2003; ETTINGER e FELDMAN, 2004). Já O'Dwyer e Massard (2002) relataram que não ocorre leucocitose neutrofílica.

Observou-se o aumento da fosfatase alcalina devido à proliferação de periosteos nos ossos, exceto no crânio. Além disso, pode-se encontrar hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, demonstrando hepatopatias crônicas devido à perda da capacidade de depuração de proteínas estranhas pelo fígado, estimulando assim, o sistema imune a aumentar a produção de globulinas (BANETH e WEIGLER, 1997; O'DWYER e MASSARD, 2002; GONDIM et al., 1996; ETTINGER e FELDMAN, 2004; THRALL, 2007).

O diagnóstico é feito pela visualização de esfregaços sangüíneos corados com Giemsa ou Leishman, possibilitando a identificação dos gametócitos no interior de neutrófilos e monócitos (ETTINGER e FELDMAN, 2004). *Hepatozoon canis* são protozoários intracitoplasmáticos grandes que possuem característica de ocuparem o centro da célula, comprimindo o núcleo celular (BANETH et al., 2000; BANETH et al., 2002).

Segundo Baneth et al. (2002), os gametócitos medem cerca de 11µm X 4µm e possuem um formato elíptico, confrontando com Gondim et al. (1998) que obteve resultados de 6.8 x 4.0 µm por 7.5 X 4.5 µm de diâmetro.



Fonte: arquivo pessoal, 2007

Figura 1 - As setas apontam o gametócito do *Hepatozoon canis* em neutrófilos encontrado na visualização do esfregaço sangüíneo ao aumento de 100 X.

Pode-se observar merozoítos a partir da biópsia do tecido contendo merontes. Tais formações são mais alongadas e se organizam em círculos, permanecendo um centro livre de coloração (BANETH et al., 2002).

Acredita-se que a não visualização dos gametócitos se deve ao fato de estar dentro dos cistos no momento da coleta do sangue ou devido à parasitemia ser muito baixa (VICENT-JOHNSON et al., 1997; PALUDO et al., 2003).

Com o objetivo de quantificar e caracterizar o protozoário, Baneth et al. (2000) utilizaram nitrogênio para a purificação do parasita em leucócitos, resultando em gametócitos livres, com morfologia intacta e o mínimo de contaminação por debris celulares. Pela avaliação em microscopia eletrônica não foi observado nenhum dano à forma dos gametócitos. Porém, no microscópio de fase, pôde ser observada uma formação em anzol, demonstrando um prejuízo a estrutura interna do parasita ou separação entre o citoesqueleto do neutrófilo e o parasita.

Baneth et al. (2000) observaram também que a quantidade de parasitas purificados depende do número de neutrófilos infectados e sucesso no uso de nitrogênio para romper as células sem danificar a morfologia dos gametócitos.

Além disso, o método de purificação permitiu a realização do teste de western blot, onde foi verificada a reação do soro infectado com inúmeros antígenos do parasita (BANETH et al., 2000; O'DWYER e MASSARD, 2002).

Segundo Baneth et al. (1998) o uso da sorologia demonstrou maior eficiência nos casos mais crônicos, onde a parasitemia é baixa e existe dificuldade de visualização do parasita em esfregaços sanguíneos. Sendo concluído que a titulação alta de IgM demonstra uma infecção recente, ao passo que a elevação de IgG denota uma situação crônica da doença.

Gonem et al. (2004) desenvolveram um estudo diagnóstico comparativo entre a análise imunoabsorvente ligada à enzima (ELISA) e teste de imunofluorescência indireta (IFI), concluindo que o primeiro apresentou maior eficiência e praticidade no desenvolvimento e na análise de resultados. A esse fato atribui-se a condição de que o IFI detecta a reação antígeno-anticorpo fora da membrana celular parasitada. Porém, o ELISA identifica o complexo em qualquer estrutura celular.

A proporção de positividade entre a detecção através da microscopia, IFI e reação em cadeia de polimerase (PCR) também demonstrou uma diferenciação considerável entre si, tendo o IFI uma maior sensibilidade diagnóstica que os demais métodos estudados (KARAGENC et al., 2005). A isso se atribui o fato de que o IFI é capaz de detectar a incidência do protozoário tanto em uma parasitemia baixa quanto intermitente, mesmo durante a fase de aprisionamento do parasita em cistos como meronte nos órgãos do animal comprometido (BANETH e WEIGLER, 1997; KARAGENC et al., 2005).

A ocorrência de infecção cruzada é bastante alta e constantemente relatada. Karagenc et al. (2005) visualizaram filmes sanguíneos com gametócitos e mórulas de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilia* no mesmo indivíduo. Corroborando com tais achados, O'Dwyer et al. (2000) observaram em seus estudos a co-infecção de *Hepatozoon canis* com *Babesia canis* ou com *Ehrlichia canis*.

Em contrapartida, Baneth et al. (1998) e Gonem et al. (2004) não observaram co-infecção pela sorologia entre *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Leishmania infantum* e *Toxoplasma gondii*.

O'Dwyer e Massard (2002) relataram a ineficiência de antibióticos como a oxitetraciclina¹ e cloranfenicol² no tratamento da hepatozoonose. O uso de antiprotozoários, como o dipropionato de imidocarb e a doxiciclina, é o mais adequado na eliminação dos sinais clínicos e redução da parasitemia, devendo ser tratados por um período de oito semanas (O'DWYER e MASSARD, 2002; BANETH et al., 2002; ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Baneth et al. (1995) realizaram o tratamento com dipropionato de imidocarb³ associado à doxiciclina⁴ e prednisolona⁵, além de suplementação com ferro e vitamina B12, não encontrando resultados significativos.

A administração de antiinflamatórios não esteróides pode levar a resultados muito satisfatórios na terapia da maioria dos casos (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

3.2. Erliquiose monocítica canina

A erliquiose é uma doença infecciosa causada por uma bactéria gram-negativa e intracelular obrigatória, que acomete vários mamíferos incluindo canídeos, eqüinos, ruminantes, humanos e, raramente, felinos. Existem quatro agentes causadores da doença de importância médica e veterinária, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* e *Ehrlichia ruminantium* (ROSEZ et al., 2001; DAGNONE et al., 2003; CASTRO et al., 2004; ETTINGER e FELDMAN, 2004; NDIP et al., 2005; DOYLE et al., 2005; RODRIGUES-VIVAZ et al., 2005; MARSÍLIO et al., 2006).

Os organismos pertencem ao gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma* (DAGNONE et al., 2003; SKOTARCZAK, 2003) e à família das Rickettsiaceae (ROSEZ et al., 2001) e Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001; MARSÍLIO et al., 2006).

Ettinger e Feldman (2004) distribuem ainda o gênero *Ehrlichia* em três genogrupos: *E. canis*, *E. phagocytophila* e *E. sennetsu*, evidenciando a habilidade que o parasita tem de infectar múltiplas espécies de hospedeiros, corroborando

¹ 66 mg/Kg, VO

² 30mg/Kg, VO

³ 5 mg/Kg, IM

⁴ 10 mg/Kg, VO

⁵ 0,5 mg/Kg, VO

com as citações de Waner et al. (2001), de Almosny e Massard (2002) e Skotarczak (2003).

Atualmente Dumler e colaboradores propuseram uma reorganização na classificação do gênero com base em análises de DNA dos parasitos, modificando *E. phagocytophila*, *E. platys* e *E. bovis* em organismos pertencentes ao gênero Anaplasma, enquanto *E. risticii* e *E. sennetsu*, ao Neorickettsia (O'DWYER e MASSARD, 2002; SKOTARCZAK, 2003).

A separação entre as espécies foi baseada no tipo de célula parasitada, distribuição geográfica e severidade da doença (ALMOSNY e MASSARD, 2002).

Ettinger e Feldman (2004) e Castro et al. (2004) discorrem que a *Ehrlichia canis* foi primeiramente diagnosticada na Argélia em 1935 por Donatien e Lestoquard e relatada em 1963 nos Estados Unidos. Desde então, foi disseminada por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo.

O primeiro caso de infecção canina por *Ehrlichia chaffeensis* foi relatado por Dawson et al. (1996), posteriormente à descrição do agente como causador da doença humana (Estados Unidos, 1987) (ETTINGER E FELDMAN, 2004; DOYLE et al., 2005).

No Brasil, a erliquiose canina foi diagnosticada pela primeira vez por Costa et al. em 1973, na cidade de Belo Horizonte, MG, e relatada posteriormente no Rio de Janeiro (RJ), Santa Maria (RS) e Curitiba (PR) (ALMOSNY e MASSARD, 2002; CASTRO et al., 2004).

Erliquiose monocítica é causada pela *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis*, acometendo, de forma severa e algumas vezes fatal, caninos e humanos respectivamente (SKOTARCZAK, 2003; ETTINGER e FELDMAN, 2004; DOYLE et al., 2005; MARSÍLIO et al., 2006).

O principal vetor transmissor da *Ehrlichia canis* é o carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, o qual é de grande importância pela sua distribuição cosmopolita e pelo fato da sua presença ter relação direta com a incidência da doença (ROZES et al., 2001, ALMOSNY e MASSARD, 2002, ETTINGER e FELDMAN, 2004, RODRIGUEZ-VIVAZ et al., 2005, MARSÍLIO et al., 2006).

Rozes et al. (2001) distribuíram o ciclo da erliquiose em três fases. Primeiramente, ocorre a penetração de corpos elementares nos monócitos por

fagocitose, onde se desenvolvem por dois dias até começarem a multiplicação. Essa etapa tem duração de três a cinco dias e culmina com a formação do corpo inicial, o qual pode ser visualizado como inclusões pleomórficas (1,0 a 2,5Mm). Por fim, as mórulas se completam ao longo de 7 a 12 dias, sendo constituídas de corpos elementares envoltos por uma membrana e permanecendo nas células hospedeiras por até quatro dias, quando ocorre a liberação das mórulas através da lise celular ou por exocitose. A partir daí, tornam-se livres na circulação passando a infectar novas células do hospedeiro acometido (DAVOUST, 1993; COUTO, 1998; ROSEZ, et al., 2001; ALMOSNY e MASSARD, 2002).

Em contrapartida, Mylonasis et al. (2003) obtiveram em seus estudos um período de incubação de 12 a 17 dias para o início da lise celular e conseqüente liberação da mórula.

A infecção do cão sadio se dá após o repasto do carrapato contendo *E. canis* nos hemócitos e na glândula salivar, o qual inocula o agente no hospedeiro através da picada durante a alimentação. A partir daí, o organismo permanece em um período de incubação de oito a vinte dias (DAVOUST, 1993, COUTO, 1998, ROSEZ, et al., 2001, ETTINGER e FELDMAN, 2004, RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005).

Completado esse período, ocorre a multiplicação nos tecidos fagocitários mononucleados do fígado, baço e linfonodos do animal infectado desencadeando uma série de sinais clínicos, iniciada pela hiperplasia linforeticular do fígado e baço, além de linfadenomegalia. As células infectadas migram via corrente sanguínea para os demais órgãos, como pulmões, rins e meninges, e se aderem ao endotélio vascular promovendo uma vasculite e infecção do tecido subendotelial (DAVOUST, 1993, COUTO, 1998, ROSEZ, et al., 2001, ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Por outro lado, Castro et al. (2004) demonstraram que os primeiros sinais clínicos surgiram após um período de incubação de 10 a 14 dias e a visualização das mórulas se deu no décimo segundo dia.

De acordo com Ettinger e Feldman (2004), a infecção pode se dar também através da transfusão sanguínea a partir de cães cronicamente infectados, o que ocorre especialmente em regiões endêmicas.

Os animais infectados apresentam sinais clínicos variáveis, que se manifestam de acordo com a fase em que se encontram (CASTRO et al., 2004). A fase aguda é caracterizada por hipertermia, anorexia, perda de peso, dispnéia, depressão e astenia, além de sinais menos específicos como corrimento ocular e nasal, dispnéia, petéquias hemorrágicas, epistaxis, hematúria, linfadenopatia e edema dos membros ou escroto (COLES, 1980; ROSEZ et al., 2001; SKOTARCZAK, 2003; ETTINGER e FELDMAN, 2004). Coles (1980) descreve ainda a ocorrência de dermatite pustular na região abdominal de alguns animais hipertérmicos.

Segundo Ettinger e Feldman (2004) essa sintomatologia se resolve naturalmente, ou seja, sem tratamento, em até duas semanas após a infecção. Em contrapartida, Rosez et al. (2001) relatam a possibilidade dos sinais agudos perdurarem até quatro semanas pós-infecção.

Após essa fase, o sistema imune pode não ser eficiente e o animal, se não tratado, vir á óbito pelo agravamento do seu quadro clínico. Caso contrário desenvolve-se a forma assintomática que caracteriza uma fase crônica da doença. Tal fase é demonstrada pela atenuação dos sinais agudos ou até mesmo ausência destes (COUTO, 1998, ROSEZ et al., 2001, ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Já durante a fase subclínica, que se manifesta após seis a nove semanas da infecção, não são observados sinais clínicos, mas pode ser evidenciada a presença de trombocitopenia, leucopenia e anemia em hemograma de rotina (SKOTARCZAK, 2003; ETTINGER e FELDMAN, 2004). Por outro lado, Rosez et al. (2001) relatam a persistência de depressão, hemorragias, edema de membros, perda de apetite e palidez de mucosas mesmo durante esse período.

Na fase crônica, os animais apresentam características de doença auto imune, caracterizada pela atenuação dos sinais agudos e uma maior susceptibilidade às infecções secundárias como a poliartrite, a qual tem sido descrita como um possível sinal da erliquiose (COUTO, 1998; ROSEZ et al., 2001; ALMOSNY e MASSARD, 2002). Sendo assim, os cães podem ter sinais discretos a ausentes ou graves, os quais se caracterizam por epistaxe, edema, palidez de mucosas, emagrecimento acentuado, sensibilidade abdominal, uveíte,

hemorragias retiniais e tendências a sangramento, além de sinais neurológicos (SKOTARCZAK, 2003; ETTINGER E FELDMAN, 2004).

As alterações laboratoriais também podem contribuir para a suspeita diagnóstica da doença. O perfil hematológico mais comumente encontrado é anemia normocítica normocrômica, neutropenia e trombocitopenia, podendo haver macroplaquetas. Animais com quadros crônicos apresentam anemia grave, leucopenia e trombocitopenia severas, embora o único achado nesses casos possa ser linfocitose (COLES, 1980; SKOTARCZAK, 2003; HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

Pode-se encontrar anemia regenerativa em cães na fase aguda apresentando hemólise ou hemorragia, ao passo que os casos de arregenerativa se enquadram em uma situação de cronicidade da doença, sendo mais amplamente encontrada (ALMOSNY e MASSARD, 2002; ETTINGER E FELDMAN, 2004).

Corroborando com citações de Almosny e Massard (2002), Castro et al. (2004) levantaram em seu estudo a ocorrência de anemia moderada desde a fase aguda da doença até o final da avaliação dos animais estudados, quando foi possível observar níveis hematológicos normais. Relatam ainda leucopenia ao longo de três semanas pós-infecção.

Ettinger e Feldman (2004) relataram a possibilidade de alguns animais com erliquiose canina apresentarem pancitopenia (25 %). Thrall (2007) atribuiu dois mecanismos a essa condição hematológica dos pacientes acometidos por *Ehrlichia canis*: destruição imunomediada de células circulantes ou anemia aplásica.

Macieira et al. (2005) analisaram o perfil hematológico dos animais soropositivos para erliquiose, obtendo uma média de 60 % de cães anêmicos e 33.3% com leucopenia, sendo que 50 % apresentaram contagem de células brancas normais e 16.7% leucocitose.

Têm sido feitos vários estudos comprovando a prevalência de trombocitopenia em pacientes acometidos por *E.canis*. Macieira et al. (2005) analisaram os valores plaquetários de animais positivos para hemoparasitoses através do teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) e obtiveram resultados de que 32.1% dos animais acometidos com rickettsias apresentavam

também trombocitopenia, sendo que 26.8 % destes eram acometidos pela erliquiose. Acredita-se que ocorra inicialmente uma plaquetopenia por mecanismos imunomediados e, em casos crônicos, a doença leve a aplasia medular resultando na redução da produção de plaquetas (THRALL, 2007).

Corroborando com esses achados Rodriguez-Vivas et al. (2005) demonstraram que a incidência de 53 (44.1%) animais positivos pelo teste de ELISA, dentro de uma população de 120 animais e a visualização do organismo se deu em apenas 5.0% destes. Porém, todos os indivíduos apresentaram uma redução no número de plaquetas, o que mostra a necessidade de incluir a erliquiose como principal suspeita de trombocitopenia, especialmente em regiões endêmicas (DAVOUST, 1993; ROSEZ et al., 2001).

Entretanto, Dagnone et al. (2003) concluíram que apesar de 20% dos casos analisados apresentarem trombocitopenia, a doença não era sua principal causa.

O animal pode apresentar ainda um aumento dos níveis séricos de proteínas globulinas e redução de albumina no soro. Isso ocorre em quadros crônicos associados à glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos, que levam a perda de albumina juntamente com hiperglobulinemia (DAVOUST, 1993; ROSEZ et al., 2001; ALMOSNY e MASSARD, 2002; SKOTARCZAK, 2003; ETTINGER E FELDMAN, 2004; HENDRIX, 2006).

Outros aspectos bioquímicos incluem aumento de uréia e creatinina, caracterizando uma azotemia, elevação de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina e bilirrubina total no soro (ETTINGER E FELDMAN, 2004).

O diagnóstico laboratorial consiste na visualização da mórula (3 a 6 μm) no interior de neutrófilos, linfócitos e monócitos, a partir de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (CASTRO et al., 2004; HENDRIX, 2006). Mylonakis et al. (2003) observaram uma maior frequência em linfócitos, ao passo que Castro et al. (2004) visualizaram mórulas apenas em monócitos.



Fonte: arquivo pessoal, 2007

Figura 2 - A seta aponta mórula de *Ehrlichia sp.* encontrada em linfócito, na visualização do esfregaço sangüíneo de cão, ao aumento de 100 X.

Os organismos basofílicos são mais facilmente encontrados na fase aguda e em pequena quantidade, o que pode ser minimizado pela confecção de filmes leucocitários devido a maior concentração de monócitos nesses esfregaços (CASTRO et al., 2004; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005; HENDRIX, 2006). Almosny e Massard (2002) relatam ainda, que o esfregaço de extremidades, como ponta de orelhas, ajuda na identificação da mórula intracitoplasmática.

As inclusões podem assumir diversas formas de acordo com a fase em que se encontram. A forma mais observada é a dos corpúsculos iniciais, as quais são representadas por elementos basofílicos em células mononucleadas, arredondados e pequenos, se diferenciando das granulações celulares por possuir uma coloração mais azulada (ALMOSNY e MASSARD, 2002; MYLONAKIS et al., 2003).



Fonte: arquivo pessoal, 2007

Figura 3 - A seta aponta mórula de *Ehrlichia sp.* encontrada em monócito, na visualização do esfregaço sangüíneo de cão, ao aumento de 100 X.

O diagnóstico através do esfregaço se torna difícil devido a natureza cíclica do parasita (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005). Sendo assim, Mylonakis et al. (2003) analisaram a presença do organismo pela citologia de tecido cutâneo, medula óssea, linfonodos e sangue periférico. O aspirado de linfonodos resultou em maior detecção da mórula (intracelular e extracelular) em comparação ao sangue periférico, o qual apresentou a menor titulação para erliquiose. Concluiu-se então, que os resultados mais fidedignos foram os da biópsia de tecido cutâneo e linfonodos, especialmente em animais com linfadenopatia, os quais obtiveram titulações altas para *Ehrlichia sp* e visualização do organismo em linfócitos.

Em estudos posteriores Mylonakis et al. (2004) comprovaram que a citologia da medula óssea, tecido cutâneo e linfonodos demonstraram uma alta sensibilidade em casos agudos da doença, o que não ocorre em situações crônicas. Além disso, foram identificadas mórulas em neutrófilos, linfócitos e monócitos.

Outro meio diagnóstico é a cultura e isolamento da célula, o qual demanda muito tempo e altos custos para ser concluído, porém é mais sensível que a

observação direta. Apesar desses inconvenientes, deve ser tido como um método de eleição em casos extremamente graves ou como avaliação das drogas utilizadas no tratamento (IQBAL et al., 1994).

Atualmente o método mais sensível e específico para diagnosticar a doença é a imunofluorescência indireta (IFI) (DAVOUST, 1993; ROSEZ et al., 2001; ALMOSNY e MASSARD, 2002), confrontando com achados de Iqbal et al. (1994), que apontaram o PCR como melhor método diagnóstico para erliquiose canina.

Os testes de ELISA são mais utilizados em casos subclínicos ou crônicos, devido à baixa frequência de mórulas intracitoplasmáticas nessas fases. Porém, podem ocorrer falso-negativos em fase aguda (ALMOSNY e MASSARD, 2002). O mais comumente utilizado, simples e disponível na rotina é o Immunocomb, o qual se baseia na detecção sérica de IgG contra *E. canis*. Além disso, é muito útil no monitoramento do paciente após o tratamento (ROSEZ, et al., 2001).

Warner et al. (2001) compararam a eficiência entre métodos diagnósticos e concluíram que apesar da IFI ser um método mais sofisticado que ELISA, ambos apresentam boa especificidade. Entretanto, todas as reações cruzadas detectadas pela IFI ainda são empecilhos para o diagnóstico final.

Ndip et al. (2005) observaram co-infecção entre *E.canis* e *E. chaffeensis* pelo método de IFI, apesar de 88% serem positivos apenas para *E. canis* pelo PCR. Além disso, 20 cães que apresentaram PCR-positivo para erliquia foram negativos na IFI e a maioria dos animais que haviam demonstrado titulação baixa na IFI foram detectados pelo PCR.

Sendo assim, a reação em cadeia de polimerase (PCR) é um teste rápido e tão sensível quanto os demais. Macieira et al. (2005) realizaram PCR em cães com trombocitopenia e obtiveram um percentual de 88.24% positivos para *E. canis*, comprovando sua sensibilidade diagnóstica, corroborando com Iqbal et al. (1994).

Doyle et al. (2005) ressaltam ainda a importância do PCR em estudos epidemiológicos, além da identificação específica e rápida dos organismos infecciosos tanto para humanos quanto em reservatórios mamíferos. Marsílio et al. (2006) discorrem que o PCR representa um método altamente específico e sensível para diagnóstico e estudos sobre a patogenia da erliquiose canina.

O diagnóstico da EMC é dificultado devido às múltiplas manifestações clínicas e reações cruzadas entre as diferentes espécies de erliquioses, especialmente entre *E. canis* e *E. chaffeensis*, além das demais hemoparasitoses (MARSÍLIO et al., 2006).

Mylonakis et al. (2004) relataram o primeiro caso de infecção mista em um cão com *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*. Já Warner et al. (2001) descreveram a ocorrência de infecção cruzada entre espécies de erliquiose com destaque para *E. canis* e *E. ewingii* de acordo com o método de Western blotting.

Estudos feitos por Macieira et al. (2005) mostraram co-infecções entre *E. canis* e *Babesia spp.* Ndip et al. (2005) identificaram reação cruzada entre *E. canis* e *E. chaffeensis* através do teste de imunofluorescência indireta (IFI).

O tratamento de eleição para a erliquiose monocítica é a doxiciclina⁶, pois é a única capaz de agir em todas as fases da infecção (ROSEZ et al., 2001; ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Entretanto, Iqbal e Rikihisa (1994) estudaram a eficiência do medicamento e comprovaram sua ineficácia em três dos cinco cães avaliados, propondo um aumento na dosagem e reavaliação pelo IFI após dois meses de tratamento.

Outras drogas podem ser utilizadas, como a oxitetraciclina, o cloranfenicol, o dipropionato de imidocarb e a tetraciclina (ROSEZ et al., 2001; ETTINGER e FELDMAN, 2004).

O uso de dipropionato de imidocarb vem sendo extinto devido a não resolução da doença em todos os animais acometidos, além de ser mais efetivo nos casos graves, crônicos ou refratários (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

3.3. Babesiose canina

Babesiose canina é a principal causa de anemia hemolítica em cães e pode resultar em hemoglobinúria, além de ser fatal, especialmente em filhotes (JAIN, 1993; KJEMTRUP et al., 2000; ETTINGER E FELDMAN, 2004; SÁ et al., 2006; THRALL, 2007).

O primeiro relato de *Babesia canis* foi feito por Piana e Galli-Valerio na Itália (1895), sendo observada posteriormente na Europa, África, Ásia, Índia,

⁶ 5mg/kg duas vezes ao dia durante 21 dias

América do Norte e América do Sul, incluindo o Brasil (O'DWYER e MASSARD, 2002; SÁ et al., 2006).

No Brasil, a *Babesia canis vogeli* foi primeiramente detectada nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Mesmo assim, pouco se sabe sobre a babesiose como fator de risco no país (PASSOS et al., 2005; SÁ et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2006).

O protozoário pertence ao gênero *Babesia* e ordem Piroplasmorida. A doença é causada por duas espécies distintas: *B. canis* (piroplasma grande) e *B. gibsoni* (piroplasma pequeno), sendo diferenciadas pela especificidade e patogenicidade (ZHLER et al., 1998; KJEMTRUP et al., 2000; BRANDÃO et al., 2003; ETTINGER E FELDMAN, 2004; SÁ et al., 2006; THRALL, 2007).

Uma babesia pequena, que se acreditava ser a *B. gibsoni*, foi descrita em cães da Califórnia (1991) e posteriormente encontrada nos Estados Unidos (1999) com maior incidência em cães das raças American Pit Bull terrier e Staffordshire terrier. O microorganismo causa anemia hemolítica, icterícia, vasculite, trombocitopenia, hepatite, glomerulonefrite e linfadenopatia reativa (ZHLER et al., 2000; THRALL, 2007).

Atualmente classifica-se o gênero em três espécies: *Babesia canis canis*, transmitida pelo *Dermacentor reticulatus*; *Babesia canis vogeli*, causada pelo *Rhipicephalus sanguineus*; e *Babesia canis rossi*, quando transmitida pelo *Haemaphysalis leachi*, o qual ocorre no Sul da África e é a cepa mais patogênica. Tal divisão taxonômica foi desenvolvida de acordo com a variação dos vetores, patogenicidade e localização geográfica (UILEMBERG et al., 1989; ZHLER et al., 1998; KJEMTRUP et al., 2000; BICALHO et al., 2002; O'DWYER e MASSARD, 2002; PASSOS et al., 2005; SÁ et al., 2006).

Thrall (2007) relata que a *B. canis vogeli* é mais comum no sudeste dos Estados Unidos e possui baixa patogenicidade, ao passo que a *B. canis canis* é encontrada na Europa e em países da Ásia e a *B. canis rossi* ocorre na África, sendo a mais patogênica.

Sá et al. (2006) realizaram estudos no Rio de Janeiro com 45 cães infectados pelo protozoário e obtiveram a confirmação de que 100% dos indivíduos foram acometidos pela *B. canis vogeli*, corroborando com os resultados de Passos et al. (2005). Sendo assim, tal subespécie é predominante em regiões

tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil (UILEMBERG et al., 1989; SÁ et al., 2006).

A transmissão é feita pela picada de carrapatos ixodídeos, inoculando o organismo através da saliva, durante a alimentação. O *R. sanguineus* foi descrito como principal vetor da *B. gibsoni* no Brasil, bem como da *B. canis* (JAIN, 1993; DANTAS-TORRES et al., 2005; BICALHO et al., 2002).

Inokuma et al. (2004) descrevem a prevalência tanto do *R. sanguineus* quanto do *Haemaphysalis longicornis* como ixodídeos transmissores da *B. gibsoni*. A infestação concomitante de *R. sanguineus* e *Amblyomma aureolatum* também foi relatada, sendo o primeiro encontrado nos subúrbios e o outro em áreas rurais (LORETTI et al., 2005).

Outra forma de transmissão inclui a via transplacentária e através de transfusão sanguínea, apesar da principal forma ser ainda a inoculação direta do organismo pela picada do carrapato contaminado (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

O ciclo biológico da babesiose pode ser dividido em três etapas: gamogonia, esporogonia e merogonia. A primeira etapa compreende a fusão de gametas nas células intestinais do carrapato com conseqüente formação de um zigoto. Tal estrutura é móvel e alongada, o que o permite invadir a hemolinfa do artrópode, se disseminar por todos os órgãos para ocorrer à multiplicação no interior deles. A partir da sua primeira alimentação, ocorre migração dos parasitas para as glândulas salivares, onde se reproduzem assexuadamente, originando os esporozoítos infectantes (esporogonia) (O'DWYER et al., 1997; HOMER et al., 2000; O'DWYER e MASSARD et al., 2002).

O processo de merogonia ocorre no hospedeiro vertebrado, após a transmissão de esporozoítos infectados durante o repasto sanguíneo. Uma vez atingida a circulação sanguínea do hospedeiro, o organismo será englobado por eritrócitos, onde se multiplicam para formar os merozoítos, os quais vão infectar novos eritrócitos (HOMER et al., 2000; ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Como sinais mais freqüentes da doença podem-se incluir hemólise extravascular, apesar de existirem sinais da forma intravascular (CID); febre, anorexia, desidratação, vômito, icterícia, vasculite, hepatite, glomerulonefrite, linfadenopatia reativa e esplenomegalia (JAIN, 1993; BRANDÃO et al., 2003;

ETTINGER e FELDMAN, 2004; LORETTI et al., 2005; THRALL, 2007). Loretti et al. (2005) relatam ainda a ocorrência de desidratação, depressão, fraqueza, petéquias na cavidade oral e mucosa vaginal, epistaxis, hematoemese, diarreia sanguinolenta, sangramento persistente no dorso e extremidades após queda do carrapato.

De acordo com Bicalho et al. (2002) a parasitemia é elevada apenas até o quarto dia pós-infecção e começa a decrescer até atingir níveis reduzidos, que tornam a visualização dos merozoítos inconstante a inexistente (17 dia pós-inoculação). Além disso, concluíram que a parasitemia é maior em sangue capilar que venoso. Entretanto, Kagiwara e Holzchuh (1987) relataram uma parasitemia intensamente variável a partir do segundo ou quarto dia pós-inoculação.

Os achados laboratoriais cursam com anemia hemolítica regenerativa com decréscimo severo do volume globular, esferocitose, plasma icterico, trombocitopenia, leucocitose e bilirrubinúria (ETTINGER e FELDMAN, 2004; LORETTI et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006). Jain (1993) descreve a anemia como sendo macrocítica hipocrômica e, normalmente, regenerativa.

Porém, o leucograma pode ser muito variável, se apresentando como leucopenia por neutropenia e linfopenia, como resposta inicial á infecção, ou leucitose por neutrofilia e linfocitose. Além disso, os valores de eosinófilos e monócitos podem se apresentar de forma bastante variável. Sendo assim, a variação está relacionada ao período de infecção que o animal se apresenta (KAGIWARA e HOLZCHUH, 1987).

Thrall (2007) ressalta ainda a necessidade de um diagnóstico diferencial da erliquiose canina, devido à semelhança entre os achados laboratoriais, os quais se apresentam com trombocitopenia, neutropenia e hiperglobulinemia para ambas as doenças.

Já Brandão et al. (2003) não observaram em seus estudos a prevalência de anemia ou de qualquer redução nos parâmetros hematológicos. Porém, foi identificada a redução de reticulócitos e trombocitopenia em todos os animais acometidos.

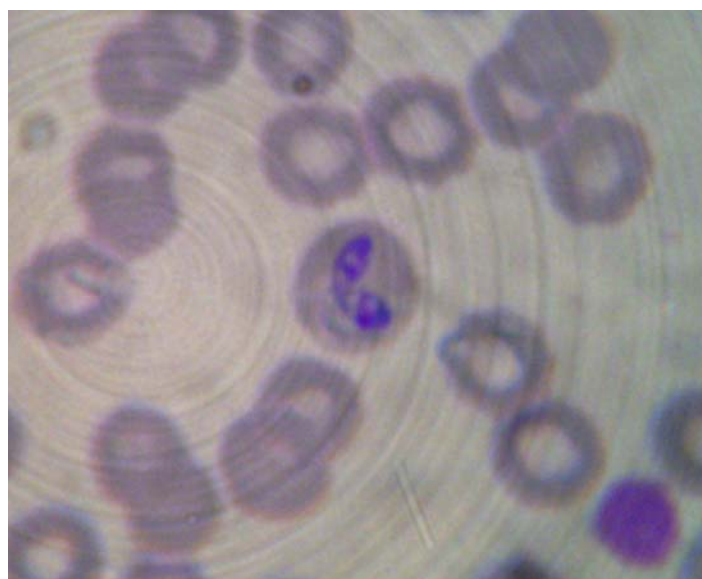
O diagnóstico consiste na visualização de merozoítos no interior das hemácias em filme sanguíneo corado com Giemsa, o que é mais facilmente observado em casos agudos, quando a parasitemia se manifesta de forma

elevada. A probabilidade de encontrar o parasita aumenta quando é feita a coleta de sangue das extremidades, como pontas das orelhas (COLES, 1980; O'DWYER e MASSARD, 2002; ETTINGER e FELDMAN, 2004; HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

Outra forma de melhorar a visualização do parasita em microscopia óptica é submeter o sangue total a centrifugação para confecção de lâminas da região abaixo do botão leucocitário (ETTINGER e FELDMAN, 2004; THRALL, 2007).

A *Babesia canis* é um microorganismo grande, piriforme, basofílico e se apresenta de forma única ou aos pares no interior das hemácias. Já a *Babesia bigemina* são piroplasmas pequenos e singulares, sendo mais pleomórficos que o piroplasma grande. Estes organismos podem se unir pela sua extremidade através de uma estrutura filamentosa e se arranjar formando uma angulação característica das espécies de babesioses (JAIN, 1993; KJEMTRUP et al., 2000; ETTINGER e FELDMAN, 2004; HENDRIX, 2006; SÁ et al., 2006).

Coles (1980) relata ainda que na babesiose canina pode-se encontrar até 16 merozoítos em uma mesma célula, medindo entre 6.0 e 7.0 μm cada parasita. Entretanto, Sá et al. (2006) evidenciaram um tamanho de 3.0 a 5.0 μm para a grande e 1.5 a 2.5 μm no caso da pequena, corroborando com o relato de Uilemberg et al. (1989).



Fonte: arquivo pessoal, 2007

Figura 4 – No centro da imagem pode-se observar dois merozoítos de *Babesia* sp. encontrado em eritrócitos, na visualização do esfregaço sangüíneo de cão, ao aumento de 100 X.

Zahler et al. (2000) descreveram um novo microorganismo pequeno em cães, *B. microti*, que está mais relacionado às *Theilerias* que as *Babesias*. Sendo assim, a visualização de um piroplasma pequeno não pode comprovar uma infecção por *B. gibsoni*, pois vários outros parasitas podem ter morfologia semelhante.

O diagnóstico parasitológico também pode ser feito durante a necrópsia, pelo método de histopatologia das células endoteliais dos capilares de diversos órgãos, sendo mais evidentes em linfonodos, medula óssea, rins e plexo coróide. O processo é feito a partir da confecção de imprints, fixados em metanol e corados por Giemsa, podendo ser observados parasitos com citoplasma pálido e núcleo proeminente, basofílico e não centralizado. Outros achados constantes são congestões em diversos órgãos e presença de pigmentos biliares no fígado (O'DWYER e MASSARD, 2002; LORETTI et al., 2005).

Em geral, deve-se considerar o histórico do paciente, apresentação clínica e análises morfológicas para se obter um diagnóstico definitivo. Por outro lado em casos crônicos, quando a parasitemia é baixa, o diagnóstico molecular se faz necessário (HOMER et al., 2000).

O PCR é um teste genético que identifica o DNA do parasita, o que vem sendo cada vez mais utilizado devido a sua maior sensibilidade e especificidade que os demais (O'DWYER e MASSARD, 2002; THRALL, 2007).

Em estudos realizados por Inokuma et al. (2004) os cães infectados por babesiose se demonstraram positivos quando submetidos ao PCR, ao passo que na análise do esfregaço corado com Giemsa obteve-se um número reduzido de identificação do organismo intraeritrocitário. Os resultados mostraram que os cães com anemia e trombocitopenia foram positivos para babesiose quando analisados em PCR, mas nem todos puderam ser identificados em filmes sangüíneos.

Os testes por imunofluorescência indireta (IFI) e análise imunoabsorvente ligada á enzima (ELISA) são mais sensíveis que a visualização do parasita em

esfregaços sanguíneos. Entretanto, os animais em fase inicial da doença e até mesmo alguns em fase mais avançada podem se apresentar como falsos negativos (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Ettinger e Feldman (2004) ressaltam ainda que esses testes imunológicos apresentam grande quantidade de reações cruzadas. No caso da babesiose a reatividade cruzada mais comum é entre *B. canis* e *B.gibsoni*, sendo que a última ainda pode apresentar reações falsas positivas para *Toxoplasma* e *Neospora*.

O tratamento consiste no uso de dipropionato de imidocarb (Imizol, IM) e também pode ser usado o aceturato de diminazina (BRANDÃO et al., 2003; LORETTI et al., 2005; THRALL, 2007). Loretti et al. (2005) ressaltam ainda o uso da doxiciclina associada à terapia com glicocorticóides, pois não obtiveram sucesso com o uso exclusivo de doxiciclina.

De acordo com Brandão et al. (2003) a dose utilizada do dipropionato de imidocarb é de 7.0 mg/Kg, confrontando com Thrall (2007) que indica o uso de 6.6mg/Kg, sendo que a segunda dose é dada duas semanas depois da primeira aplicação.

Brandão et al. (2003) testaram a eficiência do dipropionato de imidocarb em cães, separando-os em dois grupos, um que recebeu o tratamento e outro que não recebeu. Ambos apresentaram uma redução nos títulos de anticorpos, porém o grupo tratado permaneceu em níveis mais baixos que os não tratados, os quais se mantiveram no limite superior. Seis meses depois os animais foram submetidos a uma nova infecção com homólogos da *B. canis*, demonstrando que a resposta imunológica se manteve dessa forma.

Também é indicado o uso de prednisona em doses imunossupressoras por duas a três semanas para controle hemolítico imunomediado (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Pode ser feita transfusão sanguínea em casos graves de hematócrito muito reduzido e sinais clínicos como taquicardia, taquipnéia, pulso fraco, fraqueza e colapso. Os doadores devem ser previamente avaliados quanto à infecção por babesiose (ETTINGER e FELDMAN, 2004; DANTAS-TORRES et al., 2006).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram encontrados 22 animais (4.8%) acometidos por hemoparasitoses dentro de um total de 523 avaliações hematológicas na Universidade Federal do Goiás (UFG), como demonstrado na Tabela 8. Essa quantidade ínfima se deve ao fato de que o método empregado foi a visualização dos hemoparasitas em esfregaços sanguíneos corados com panóptico rápido, confrontando com a literatura que utiliza o Giemsa como corante de eleição para constatação dos hemoprotozoários (O'DYWER e MASSARD, 2002; ETTINGER e FELDMAN, 2004; CASTRO et al., 2004; HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

Ettinger e Feldman (2004) descrevem ainda o uso de Leishman como corante para pesquisa dos gametócitos do *Hepatozoon canis*, mas não relata seu uso nos casos de erliquioses e babesioses.

Conforme demonstrado na Tabela 8, o menor percentual de visualização em filmes sanguíneos foi do *Hepatozoon canis* (0.19%), o que pode ser atribuído à baixa parasitemia (0.5%) que o organismo apresenta ou a baixa quantidade de células circulantes no momento da coleta, ou ainda a perda de gametócitos durante o processamento do sangue total (VICENT-JOHNSON et al., 1997; KARAGENC et al., 2005). Paludo et al. (2003) relatam ainda a possibilidade dos gametócitos se encontrarem dentro de cistos no momento da coleta do sangue.

A maior incidência constatada foi de babesiose (1.91%), a qual ainda se apresenta baixa quando comparada com a quantidade total de hemogramas realizados. Esse fato pode ser esclarecido pelo fato da parasitemia se manifestar elevada apenas até o quarto dia pós-infecção dificultando assim a observação dos merozoítos após esse período (BICALHO et al., 2002). Kagivara e Holzchuh (1987) citam ainda a ocorrência de parasitemia cíclica, o que dificulta não só a visualização como também a constatação do período da infecção em que o indivíduo se encontra.

A visualização das mórulas de *Ehrlichia sp* se deu apenas em nove cães (1.71%), o que pode ser explicado pela natureza altamente cíclica do organismo, dificultando sua identificação nos métodos de rotina laboratorial (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005).

Além disso, pôde-se observar uma infecção mista de erliquiose e babesiose durante a avaliação de uma única lâmina do indivíduo. A co-infecção entre esses dois organismos já foi demonstrada por Macieira et al. (2005), mas não uma confirmação de infecção mista. Porém, Milonakis et al. (2004) relatou uma infecção mista entre *E. canis* e *Hepatozoon canis* em um cão, mas não houve observação de *Babesia sp.* e *Ehrlichia sp.*

Durante o período de estágio foram diagnosticados ainda dois casos (0.38%) de *Mycoplasma haemofellis*, que são microorganismos intraeritrocitários dispostos como cocos basofílicos em forma de cordões ao longo da célula. Essa bactéria acomete felinos em especial e não será discutida nesse trabalho.

Em dois indivíduos (0.38%) analisados que apresentaram sinais clínicos e achados hematológicos suspeitos de erliquiose canina e cuja visualização do hemoparasita em esfregaço sanguíneo se comportou de forma negativa, foram feitos filmes da papa de leucócitos a partir da centrifugação de microcapilares contendo sangue total com EDTA, os quais eram quebrados na região do botão leucocitário, desprezada apenas essa porção na lâmina e feito o esfregaço (CASTRO et al., 2004; HENDRIX, 2006). Mesmo assim, não foi possível a identificação das mórulas nas células brancas desses indivíduos.

Confrontando com a literatura, o animal com diagnóstico de hepatozoonose não demonstrou nenhuma alteração no hemograma, exceto um leve desvio à esquerda que é freqüentemente relatado acompanhado de uma leucocitose

neutrofílica e monocitose (GONDIM et al., 1998; PALUDO et al., 2003; ETTINGER e FELDMAN, 2004). Entretanto, O'Dwyer e Massard (2002) descrevem a ausência de leucocitose por neutrofilia, como encontrado nesse caso.

Lopes e Cunha (2002) descrevem a presença de parasitas como uma das causas de neutrofilia, devido a uma reação sistêmica do organismo do hospedeiro contra o protozoário.

De acordo com Gondim et al. (1998) e Paludo et al. (2003), os indivíduos acometidos pelo *Hepatozoon canis* apresentam uma anemia normocítica normocrômica regenerativa, o que não foi observado no perfil hematológico do animal analisado.

Os gametócitos do *Hepatozoon canis* foram identificados em neutrófilos, condizendo com Ettinger e Feldman (2004) que relatam a incidência em neutrófilos e monócitos. Além disso, apresentavam uma localização mais centralizada e formato elíptico, sendo um protozoário intracitoplasmático com dimensões grandes e capazes de deslocar o núcleo na célula parasitada (BANETH et al., 2000; BANETH et al., 2002).

Nos casos de erliquiose o hemograma se demonstrou mais fidedigno à literatura, porém com alguns aspectos variáveis entre si, conforme evidenciado nas Tabelas 9 e 10. De nove casos demonstrados na Tabela 9, em apenas 1 (11.1%) não foram observadas alterações à nível de células vermelhas, enquanto que os 8 restantes apresentaram anemia normocítica normocrômica (88.9%) evidenciando um processo crônico, conforme indicado por Coles (1980), Skotarczak et al. (2003), Hendrix (2006) e Thrall (2007).

Entre os indivíduos que apresentaram anemia, observou-se sete (77.8%) deles com trombocitopenia e apenas um (11.1%) tinha presença de macroplaquetas, que são precursoras das plaquetas, sendo maiores e mais jovens. A redução do número de plaquetas se torna muito presente nas rickettsioses, especialmente em casos de erliquiose, o que pode estar relacionado a mecanismos imunomediados e aplasia medular em situações de cronicidade (SKOTARCZAK et al., 2003; HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

Em um (11.1%) caso foi possível observar eritroblastos e anisocitose moderada (11.1%), demonstrando um acometimento agudo do animal, devido à presença de células jovens na circulação; ao passo que em pacientes acometidos

cronicamente a anemia que se manifesta é arregenerativa, não sendo possível identificar hemácias jovens nos filmes sanguíneos (ALMOSNY e MASSARD, 2002; ETTINGER e FELDMAN, 2004). Hendrix (2006) relata ainda que em quadros crônicos as alterações hematológicas são bem acentuadas, mas pode cursar apenas com linfocitose, o que não foi evidenciado em nenhum dos casos avaliados.

A classificação da anemia em regenerativa ou arregenerativa está associada à presença de reticulócitos no sangue, mas a contagem dessas células jovens não foi desenvolvida como rotina do laboratório. Porém, a simples classificação da anemia pelos índices hematimétricos pode indicar quando existe uma regeneração pela medula, o que é demonstrado principalmente pelos casos macrocíticos hipocrômicos, devido à presença de células maiores na circulação e que ainda não contém a quantidade total de hemoglobina (HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

Sendo assim, apenas um animal apresentou hemograma sugestivo de medula ativa pela presença dos eritroblastos e anisocitose moderada, indicando a liberação de células de tamanhos variados na circulação, o que sugere células maiores e mais jovens circulantes. Porém, esse indivíduo não apresentou evidências de regeneração quanto à contagem e classificação da série vermelha.

Na avaliação do leucograma pôde-se observar uma maior incidência de leucopenia por neutropenia (77.8%), como demonstrado pela Tabela 10, o que confirma os relatos de Skotarczak et al. (2003), Hendrix (2006) e Thrall (2007). Além disso, foi observado eosinopenia em cinco casos (55.5%), linfopenia em três (33.3%) e monocitopenia (33.3%) em três casos. Apenas um animal não apresentou nenhuma alteração no leucograma (11.1%) e outro panleucopenia (11.1%), confrontando com Skotarczak et al. (2003) e Thrall (2007) que relatam apenas leucopenia neutropênica. Porém, Hendrix (2006) descreve uma leucopenia acentuada em casos de cronicidade e Ettinger e Feldman (2004) demonstraram a panleucopenia em 25 % dos casos observados.

Lopes e Cunha (2002) discorrem que a leucopenia associada à neutropenia ocorre por uma degeneração, exaustão, destruição ou depressão dessas células. Nos casos da erliquiose, pode-se definir a destruição de

neutrófilos à nível medular como principal causa da neutropenia, devido à aplasia de medula (THRALL, 2007).

De acordo com Hendrix (2006) em casos de erliquiose canina pode-se visualizar linfócitos atípicos, os quais apresentam uma coloração mais basofílica no citoplasma, núcleo maior e levemente disforme, indicando uma fase crônica da doença. Durante as análises laboratoriais foi possível a associação de dois casos (22.2%) de linfócitos atípicos com a erliquiose.

O diagnóstico da erliquiose canina se deu pela observação de mórulas em esfregaços sanguíneos, no interior de linfócitos e monócitos, que são mais facilmente observados durante a fase aguda. Os organismos se demonstraram com forma arredondada e coloração mais basofílica que os grânulos intracitoplasmáticos (ELIAS, 1991; ALMOSNY e MASSARD, 2002; MILONAKIS et al., 2003; CASTRO et al., 2004; HENDRIX, 2006).

O maior percentual de visualização de mórulas se deu em linfócitos e em apenas um caso observou-se o organismo em monócitos, o que condiz com achados de Milonakis et al. (2003) e confronta com Castro et al. (2004).

A babesiose canina geralmente cursa com anemia hemolítica regenerativa, o que é evidenciado pelo aumento de reticulócitos ou outras alterações hematológicas que indiquem regeneração. Como não foi realizado o teste de reticulócitos, a avaliação da morfologia das hemácias foi o aspecto utilizado na constatação de uma situação de regeneração desses animais. Sendo assim, observou-se anisocitose leve em um (10%) caso e moderada em quatro (40%), além da presença de eritroblastos em um indivíduo (10%), evidenciando o funcionamento da medula ao emitir células maiores e mais jovens para a circulação (ETTINGER e FELDMAN, 2004; LORETTI et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006; HENDRIX, 2006).

Em nove (90%) casos a anemia foi do tipo normocítica normocrômica e somente um (10%) apresentou anemia microcítica hipocrômica, o que pode denotar uma perda crônica de sangue ou deficiência de ferro levando a menor quantidade de hemoglobina nas células e conseqüente divisão destas permanecendo menores na circulação. Um indivíduo (10%) com valores hematimétrico dentro do normal apresentou hipocromia leve, o que pode ser explicado não só por uma deficiência, mas também pela presença de células

jovens que ganharam a circulação antes mesmo de adquirirem a quantidade ideal de hemoglobina (HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

Apesar de Jain et al. (1993), Loretto et al. (2005) e Dantas-Torres (2006) relatarem a ocorrência de esferócitos nos casos de babesiose, não foi observado nesses casos. Esferócitos são células escuras com palidez central e menor quantidade de membrana por ter sofrido fagocitose devido à presença de anticorpos ou complemento em sua superfície. A pesquisa dessas formas celulares é de extrema importância, pois frequentemente representam anemia hemolítica imunomediada, que é um dos achados mais característicos da *Babesia sp.* (HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

A trombocitopenia foi observada em apenas dois (20%) casos entre os dez (100%) de babesiose canina e um indivíduo (10%) apresentou inclusive macroplaquetas, conforme demonstrado na Tabela 9. A plaquetopenia foi relatada por Jain et al. (1993), Ettinger e Feldman (2004), Loretto et al. (2005) e Dantas-Torres (2006), mas não foi um achado muito freqüente nos casos observados, sendo assim, não pôde ser considerado um achado patognomônico da doença.

Em todos os casos pôde-se observar uma leve à acentuada icterícia do plasma, o que ocorre devido à anemia hemolítica nesses casos ser do tipo intravascular. Os macrófagos possuem receptores para anticorpos e complementos presentes nas membranas dessas hemácias permitindo o processo de fagocitose e conseqüente lise destas, resultando ainda em hemoglobinemia, hemoglobinúria, hiperbilirrubinemia e bilirrubinúria. Quando os eritrócitos são parcialmente fagocitados dá-se a formação de esferócitos, os quais podem ser facilmente visualizados em filmes sanguíneos dos caninos (JAIN et al., 1993; ETTINGER e FELDMAN, 2004; LORETTI et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006; HENDRIX, 2006; THRALL, 2007).

Corroborando com achados de Kagiwara e Holzchuh (1987) o leucograma foi bastante variável cursando com leucopenia por neutropenia ou linfopenia no início e leucocitose por neutrofilia ou linfocitose em casos mais tardios da doença. Em dois (20%) indivíduos foi encontrado leucopenia por linfopenia, um (10%) apresentou panleucopenia, um (10%) leucocitose neutrofílica e outro (10%) monocítica, além de um (10%) desvio à esquerda e outras alterações como

eosinopenia (20%) e linfopenia (20%). Além disso, dois animais (20%) não apresentaram alterações no número de células brancas (Tabela 10).

Como a doença cursa com anemia hemolítica, a leucocitose por neutrofilia pode ser encontrada constantemente, além de ser um achado que indica uma infecção sistêmica severa (LOPES e CUNHA, 2002).

Embora tenha sido evidenciado um caso de monocitose, esse achado não parece ser comum na enfermidade, bem como o número de eosinófilos que se manifestou reduzido em apenas dois dos dez casos de babesiose canina. Porém, a monocitose pode ser explicada pelo fato da babesiose cursar como uma doença imunomediada, já que o protozoário é reconhecido por macrófagos através de anticorpos na membrana celular (KAGIWARA e HOLZCHUH, 1987; LOPES e CUNHA, 2002).

Sendo assim, pôde-se observar uma inconstância na contagem de leucócitos dos animais acometidos pela babesiose e essa variação pode ajudar na classificação do período de infecção em que se encontram (KAGIWARA e HOLZCHUH, 1987). Jain (1993) relatou a ocorrência de linfocitose em casos crônicos, mas nenhum indivíduo analisado apresentou esse quadro.

Alguns estágios da doença podem ser característicos tanto da babesiose quanto de erliquiose, apresentando trombocitopenia e neutropenia como achados hematológicos. Esse fato intensifica a necessidade de um diagnóstico diferencial entre as duas enfermidades (KAGIWARA e HOLZCHUH, 1987; THRALL, 2007).

O diagnóstico se deu pela visualização dos merozoítos nos eritrócitos circulantes, os quais possuíam formato piriforme, eram grandes e com coloração basofílica, sendo encontrados geralmente aos pares no interior das hemácias e, em alguns casos, se uniam nas extremidades formando uma angulação característica (COLES, 1980; JAIN, 1993; KJEMTRUP et al., 2000; O'DYWER e MASSARD, 2002; ETTINGER e FELDMAN, 2004; HENDRIX, 2006; SÁ et al., 2006; THRALL, 2007).

Apesar de a literatura constatar que essas características representam uma *Babesia canis* e não *B. bigemina*, cujo tamanho é menor, pleomórfica e singular dentro das hemácias, os resultados eram repassados sem a espécie, pois se acredita que exames complementares são necessários para essa precisão

diagnóstica (JAIN, 1993; KJEMTRUP et al., 2000; ETTINGER e FELDMAN, 2004; SÁ et al., 2006).

Outros métodos diagnósticos não foram utilizados, sendo assim, a visualização do parasita em esfregaços sanguíneos foi o único meio conclusivo na rotina.

5. CONCLUSÃO

O estágio supervisionado foi de grande importância no aprendizado e formação profissional, sendo desenvolvido em um laboratório de análises clínicas equipado com aparelhos de precisão e profissionais altamente qualificados para o processamento e elaboração de resultados satisfatórios dos exames requeridos pelos médicos veterinários.

Além disso, pesquisas são constantemente realizadas no período da manhã, possibilitando que os estagiários acompanhem esses procedimentos e aprimorem todos os conceitos e práticas adquiridas ao longo do estágio.

Outra vantagem observada durante esse período foi a possibilidade de realização de todas as amostras encaminhadas sob a supervisão dos técnicos e do biomédico responsáveis pelo funcionamento da rotina laboratorial, colaborando para o aprendizado e confiança do estagiário na execução dos exames.

Os achados laboratoriais podem induzir à pesquisa dos hemoparasitas, porém não podem ser utilizados como único meio de diagnóstico.

Na rotina realizada durante o estágio, a única forma de diagnóstico das hemoparasitoses era a visualização do parasita em esfregaços sanguíneos que apresentavam ou não variações hematológicas indicativas, o que poderia acarretar um falso diagnóstico em alguns casos, já que esse não deve ser um método decisivo.

A pesquisa em filmes sanguíneos deve ser realizada sempre que requerida, porém sua eficácia varia de acordo com a parasitemia, que geralmente é baixa; com a fase da doença em que o animal se encontra; com o local da punção do sangue, já que o sangue periférico aumenta as chances de êxito na visualização; com a possibilidade da confecção de esfregaços utilizando apenas papas de leucócitos, nos casos de erliquioses e hepatozoonoses; entre outros procedimentos que podem auxiliar nesse meio diagnóstico.

Como se pode concluir, os testes de ELISA, IFI e PCR, consistem em métodos com melhores resultados, devido à maior sensibilidade e especificidade que a simples visualização da lâmina. Entretanto, possuem um custo mais elevado, necessitando inclusive de mão-de-obra especializada, além do risco de infecções cruzadas que podem mascarar os resultados, levando a falsos positivos ou negativos para determinada hemoparasitose.

O PCR tem se demonstrado altamente preciso no diagnóstico das hemoparasitoses, inclusive na detecção de novas espécies, mas ainda possui um custo demasiadamente elevado, sendo usado apenas a nível de pesquisas.

Contudo, a visualização de protozoários em esfregaços associada às alterações hematológicas, ainda é o método de eleição nas rotinas laboratoriais e pode ser bastante positivo quando se tem mão-de-obra qualificada e aparelhos precisos à disposição.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMOSNY, N.R.P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. **Erliquiose**. 1ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p.21-40.

ALMOSNY, N.R.P. In: O'DYWER, L.H.; MASSARD, C.L. **Babesiose**. 1ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p.58-63.

ALMOSNY, N.R.P. In: O'DYWER, L.H.; MASSARD, C.L. **Hepatozoonose**. 1ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p.80-84.

BANETH, G. e WEIGLER, B. Retrospective case-control study of *Hepatozoonosis* in dogs in Israel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.11, n.6, p.365-370, 1997.

BANETH, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; AROCH, I.; SHKAP, V. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Journal of Parasitology**, v.87, n.3, p.606-611, 2001.

BANETH, G.; MATHEW, J.S.; SHKAP, V.; MACINTIRE, D.K.; BARTA, J.R.; EWING, S.A. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon spp.* **Trends Parasitol.**, v.19, n.1, p.27-31, 2003.

BICALHO, K.A; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. Infecção experimental de cães com amostras de *Babesia canis* isoladas em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.5, 2002.

BRANDÃO, L.P.; HAGIWARA, M.K.; MYIASHIRO, S.I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.253-265, 2003.

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

COLES, E.H. Veterinary Clinical Pathology. In: **Examinations for parasites**. 3ed. Estados Unidos: W B Saunders company, 1980. p.455-459.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F. e FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary parasitology**, v.141, p.197-203, 2006.

DAVOUST, B. Canine ehrlichiosis. **Point. Vet.**, v.25, n.151, p.43-51,1993.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y-W.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCH, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor taqman real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.7, n.4, p.504-510, 2005.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato. In: **Anemias regenerativas causadas por hemorragia ou hemólise**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.189-190.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato. In: **Riquetsioses**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.426-427.

FERREIRA, A.W. e ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. In: **Testes Sorológicos**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 18-19, 26p.

FERREIRA, A.W. e ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. In: **Métodos de Biologia Molecular e de DNA Recombinante**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 55p.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K.R.; EWING, S.A.; MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon spp.* in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.134, n.1-2, p.1-7, 2005.

GONDIM, L.F.P.; KOHAYAGAWA, A.; ALENCAR, N.X.; BIONDO, A.W.; TAKAHIBA, R.K.; FRANCO, S.R.F. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**, v.74, p.319-323, 1998.

GONEM, L.; STRAUSS-AYALI, D.; SHKAP, V.; VICENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D.K.; BANETH, G. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. **Veterinary Parasitology**, v.122, n.2, p.131-139, 2004.

HENDRIX, C.M. Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários. In: **Hematologia**. 4ed. São Paulo: Roca, 2006. 51p.

HENDRIX, C.M. Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários. In: **Parasitas Internos**. 4ed. São Paulo: Roca, 2006. p.287-288.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.3, p.451-469, 2000.

INOKUMA, H.; YOSHIKAWA, Y.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAHAWA, M. Molecular survey of Babesia infection in dogs in Okinawa, Japan. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.341-346, 2004.

IQBAL, Z. e RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p.1644-1649, 1994 a.

IQBAL, Z., CHAICHANASIRIWITHAYA, W., RIKIHISA, Y. Comparasion of PCR with other tests for early diagnosis of Canine Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p.1658-1662, 1994 b.

JAIN, N.C. Essencials of Veterinary Hematology. 1ed. Philadelphia: Lea & Febiger: 1993. p.180-182.

KAGIWARA, M.K. e HOLZCHUH, M.P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis* I. Avaliação de leucograma durante a evolução da doença. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zoot.**, v.39, n.5, p.745-755, 1987.

KJEMTRUP, A.M.; KOCAN, A.A.; WHITWORTH, L.; MEINKOTH, J.; BIRKENHEUER, A.J.; CUMMINGS, J.; BOUDREAUX, M.K.; STOCKHAM, S.L.; IRIZARRY-ROVIRA, A.; CONRAD, P.A. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1501-1505, 2000.

KARAGENC, T.I.; PASA, S.; KISLI, G.; HOSGOR, M.; BILGIC, H.B.; OZON, Y.H.; ATASOY, A.; EREN, H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. **Veterinary Parasitology**, v.135, n.2, p.113-119, 2006.

LABRUNA, M.B.; SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES JR, J.S.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Prevalência de carrapatos de áreas rurais da região norte do Estado de Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.553-556, 2001.

LOPES, S.T.A.; CUNHA, C.M.S. **Patologia Clínica Veterinária** - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2002.

LORETTI, A.P. e BARROS, S.S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial peroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.134, p.193-213, 2005.

MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA, A.M.F.; FREIRE, I.M.A.; LINHARES, G.F.C.L.; ALMEIDA, N.K.O.; ALMOSNY, N.R.P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.1, p.44-48, 2005.

MARSÍLIO, F.; MARTINO, B.D.; MERIDIANI, I.; BIANCIARDI, P. Direct identification of *Ehrlichia canis* by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (*glt A*) gene from various Italian strains. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.18, p.215-217, 2006.

MUNDIM, A.V.; MUNDIM, M.J.S.; JENSEN, N.M.P.; ARAÚJO, S.F. *Hepatozoon canis*: estudo retrospectivo de 22 casos de infecção natural em cães de Uberlândia, MG. **R. Cent. Ci, Bioméd**, v.10, n.1, p.89-95, 1994.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Parasitology**, v.91, p.197-204, 2003.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BANETH, G.; POLIZOPOULOU, Z.; FYTIANOU, A. Mixed *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and presumptive *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, n.4, p.249-251, 2004.

MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.; GONEM, L.; BILLINIS, C.; KOUTINAS, A.F.; BANETH, G. Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.229-233, 2005.

NDIP, L.M.; NDIP, R.N.; ESEMU, S.N.; DICKMU, V.L.; FOKAM, E.B.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.59-66, 2005.

O'DYWER, L.H.; MASSARD, C.L.; DAEMONI, F. Desenvolvimento de *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) no intestino e hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Rev. Brás. Parasitol. Vet.**, v.6, n.1, p.11-14, 1997.

O'DYWER, L.H.; MASSARD, C.L.; SOUZA, J.C.P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.94, n.3, p.143-150, 2001.

PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; MATHEW, J.S.; LEHENBAUER, T.W.; CUMMINGS, C.A.; WOODS, J.P. Canine hepatozoonosis: comparison of lesions and parasites in skeletal muscle of dogs experimentally or naturally infected with *Hepatozoon americanum*. **Veterinary Parasitology**, v.82, n.4, p.261-272, 1999.

PALUDO, G.R.; DELL'PORTO, A.; CASTRO e TRINDADE, A.R.; MCMANUS, C.; FRIESMAN, H. *Hepatozoon spp.*: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.118, n.3-4, p.243-248, 2003.

PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.81-85, 2005.

RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; FOX, J.C.; SIREGAR, A.G.; PASARIBU, F.H.; MALOLE, M.B. Analyses of *Ehrlichia canis* and a Canine Granulocytic Ehrlichia infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.1, p.143-148, 1992.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; ALBORNOZ, R.E.F.; BOLIO, G.M.E. Ehrlichia canis in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.75-79, 2005.

ROSEZ, K.V.; ALVES, F.R.; BLEICH, I. Erliquiose canina. **Cães & Gatos**, v.96, p.25-27, 2001.

SÁ, A.G.; CERQUEIRA, A.M.F.C.; O'DYWER, L.H.; MACIEIRA, D.B.; ABREU, F.S.; FERREIRA, R.F.; PEREIRA, A.M.; VELHO, P.B.; ALMOSNY, N.R.P. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected brazilian dogs. Intern. **J. Appl. Res. Vet. Méd.**, v.4, n.2, p.163-168, 2006.

SKOTARCZAK, B. Canine Ehrlichiosis. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v.10, p.137-141, 2003.

THRALL, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. In: **Anemia arregenerativa ou não regenerativa**. 1ed. São Paulo: Roca, 2007. 85p.

THRALL, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. In: **Anemia regenerativa**. 1ed. São Paulo: Roca, 2007. p.99-100.

UILENBERG, G; FRANSSEN, F.F.J.; PERIÉ, N.M.; SPANJER, A.A.M. Three groups of *B. canis* distinguished and a proposal for a nomenclature. **Vet. Q.**, v.11, p.33-40, 1989.

VICENT-JOHNSON, N.A.; MACINTIRE, D.K.; LINDSAY, D.S.; LENZ, S.D.; BANETH, G.; SHKAP, V.; BLAGBURN, B.L. A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. **J. Parasitology**, v.83, n.6, p.1165-1172, 1997.

WARNER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. 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.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminates between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitol. Res.**, v.84, p.544-548, 1998.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.89,p.241-248, 2000.