

Avaliação da coagulação plasmática e plaquetometria em cães não infectados e infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp.

[*Plasmatic coagulation and platelet count in dogs uninfected and experimentally infected with Ehrlichia spp.*]

M.S. Xavier¹, N.R.P. Almosny¹, M.D. Nascimento¹, G.V.O. Silva², G.G. Botelho³

¹Faculdade de Veterinária – UFF
Rua Vital Brasil, 64
24320-340 – Niterói, RJ

²Aluno de pós-graduação – FV-UFF – Niterói, RJ

³Faculdade de Veterinária – UFRRJ – Seropédica, RJ

RESUMO

Avaliou-se a ocorrência de distúrbios na coagulação plasmática e na plaquetometria de cães infectados por *Ehrlichia* spp., durante 15 semanas após o contágio. Doze cães, entre machos e fêmeas, nascidos em estação experimental e com idades entre um e dois anos, foram usados no experimento. Nove cães foram infectados experimentalmente com sangue de cão naturalmente portador de *Ehrlichia* spp. e três foram mantidos como controle. As alterações na coagulação plasmática não diferiram entre cães infectados e não infectados. A plaquetometria oscilou durante as 15 semanas entre $61 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $830 \times 10^3/\mu\text{L}$, e o menor valor médio foi de $113 \times 10^3/\mu\text{L}$ na sexta semana após a infecção. Concluiu-se que a coagulação plasmática não apresentou alterações significativas nas 15 semanas após infecção e que a contagem plaquetária oscilou entre valores normais, elevados e reduzidos durante esse período.

Palavras-chave: cão, *Ehrlichia*, coagulação plasmática, plaquetometria

ABSTRACT

The effect of Ehrlichia spp. in plasma coagulation and platelet count in dogs during 15 weeks after contamination was evaluated. Twelve male and female dogs one-to-two-year-old were born in the experimental station and were used for the experiment. Nine dogs were infected with blood of dogs naturally bearing Ehrlichia spp., and three were kept as controls. The variation of plasma coagulation did not significantly differ between infected and uninfected dogs. The platelet count oscillated during the period from $61 \times 10^3/\mu\text{L}$ to $830 \times 10^3/\mu\text{L}$, and the lowest mean value was $113 \times 10^3/\mu\text{L}$ at the sixth week after contamination in infected dogs. In conclusion, the plasma coagulation did not significantly change and the platelet count oscillated between normal, increased, and reduced values during the first 15 weeks after Ehrlichia spp. contamination in dogs.

Keywords: dog, *Ehrlichia*, plasma coagulation, platelet

INTRODUÇÃO

A erliquiose é causada por várias espécies do gênero *Ehrlichia*, parasitas intracitoplasmáticos de leucócitos e plaquetas de várias espécies de mamíferos, e é transmitida por carrapatos (Huxsoll et al., 1969; Hoskins, 1991). Vários estudos têm mostrado que os animais e o homem são suscetíveis a infecções por várias riquetsias,

inclusive as desse gênero, e as infecções têm caráter epidemiológico (Costa et al., 2005; Costa et al., 2006).

Segundo Jain (1993), pode haver alteração na homeostasia em caninos, equinos e bovinos pela diminuição do número de plaquetas. Os cães podem apresentar alterações em diversos mecanismos fisiológicos, dos quais a

trombocitopenia é o mais frequente (Moreira et al., 2003; Dagnone et al., 2003) embora, em alguns casos, haja diátese hemorrágica em indivíduos sem redução da plaquetometria (Codner e Farris-Smith, 1986). Assim, a contagem de plaquetas nem sempre está correlacionada com a extensão ou severidade do sangramento, caracterizando disfunção plaquetária (Hibler et al., 1986). A trombocitopenia é um achado consistente com todas as fases da infecção por *E. canis*, e os mecanismos causadores dessa alteração hematológica são diferentes nas fases aguda e crônica da doença. (Waner et al., 1995; Harrus et al., 1999). A queda na contagem de plaquetas começa poucos dias após a infecção e pode ser causada por aumento no consumo ou por sequestro esplênico e/ou hepático de plaquetas. (Pierce et al., 1977; Woody e Hoskins, 1991). Segundo Smith et al. (1974), a meia-vida das plaquetas está diminuída provavelmente devido ao sequestro esplênico. Ademais, diversos mecanismos imunológicos e inflamatórios podem estar envolvidos com o consumo e a destruição de plaquetas (Waner et al., 1995; Scott, 2000).

Os valores apresentam flutuações dia após dia (Troy e Forrester, 1990), e a resposta medular como *feedback* à trombocitopenia justifica essas variações (Smith et al., 1975). O tempo de sangramento prolongado e a fraca retração do coágulo são evidências da trombocitopenia ou disfunção plaquetária (Troy e Forrester, 1990; Harrus et al., 1996).

A plaquetometria é considerada um teste sensível, embora pouco específico, na triagem de cães clinicamente suspeitos de erliquiose (Bulla et al., 2004; Macieira et al., 2005), e a magnitude da trombocitopenia pode aumentar a fidedignidade do diagnóstico (Bulla et al., 2004).

Em estudos com cães infectados experimentalmente, foram observados trombocitopenia mais acentuada em diferentes períodos após a infecção: no 35º dia (Huxsoll et al., 1972), entre o 10º e o 14º dia (Buhles et al., 1975), no 17º dia (Pierce et al., 1977), entre o quarto e o sétimo dia (Harvey et al., 1978), no 18º dia (Lovering et al., 1980), em apenas duas a quatro semanas após a infecção (SAI) (Kuehn e Gaunt, 1985), até a quinta SAI (Baker et al., 1987) e a partir do terceiro dia (Gaunt et al.,

1990). Segundo Harrus et al. (1996), os menores valores ocorreram entre o 17º e o 24º dia após a infecção, mostrando como o comportamento de redução plaquetária é flutuante e variável. Nos cães com diátese hemorrágica, o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) estão normais, e os produtos de degradação da fibrina (PDFs) não são detectados, indicando normalidade na coagulação plasmática. Entretanto, casos com coagulação intravascular disseminada (CID) podem levar a alterações nesses testes (Troy e Forrester, 1990). Buhles et al. (1975) descreveram as vasculites e Swango et al. (1989) as vasculites e as lesões endoteliais como os mecanismos capazes de causar CID. Tendo em vista as alterações plaquetárias que ocorrem na erliquiose e as consequências clínicas delas decorrentes, o presente experimento teve o objetivo de caracterizar a coagulação e a plaquetometria de cães infectados experimentalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 cães sem raça definida, machos e fêmeas, entre um e dois anos de idade, nascidos na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde o trabalho foi realizado. Nove animais foram infectados e três mantidos como controle. As infecções ocorreram a partir da inoculação de sangue de um cão naturalmente infectado e com diagnóstico laboratorial confirmado para *E. canis*. Analisou-se, durante 15 semanas, a coagulação plasmática por meio do TP e TTPA, enquanto a plaquetometria foi realizada para a avaliação da hemostasia primária, utilizando métodos manuais com o hemocítometro segundo Coles (1986), ao usar como diluente o oxalato de amônio 1%. Para TP e TTPA utilizaram-se reativos comerciais¹, seguindo técnica descrita nos próprios reativos². Alguns foram desenvolvidos no laboratório da Estação Experimental e outros no laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense Niterói/RJ. O diagnóstico sorológico dos animais foi realizado

¹Tromboplastina cálcica antiheparina e Cefalina ativada - Biolab Mérieux do Brasil SA - Rio de Janeiro, Brasil.

²Quick (1938)-Alton (1974) - Biolab Mérieux do Brasil SA - Rio de Janeiro, Brasil.

na Universidade Estadual Paulista em Botucatu/SP. Os resultados foram submetidos ao teste F de Brieger.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico laboratorial foi realizado mediante a observação de mórulas intracitoplasmáticas em mononucleares e plaquetas em esfregaços de sangue periférico. A sorologia dos animais infectados foi positiva para *E. canis* e fracamente positiva para *Anaplasma (Ehrlichia) platys*. Segundo Hoskins (1991), essa associação entre as duas riquetsioses é frequentemente observada.

A variação semanal das médias da plaquetometria dos grupos infectado e controle foi significativamente semelhante durante as 15 semanas. A plaquetometria no grupo-controle não oscilou significativamente, enquanto no grupo infectado houve oscilação significativa nas 15 semanas ($F = 1,14$ e $P = 0,34$). Na Fig. 1, vê-se que a oscilação da trombocitopenia foi o resultado mais frequente da alteração hemostática, já descrita por Troy e Forrester (1990), Hoskins (1991) e Harrus et al. (1996). A mais baixa contagem de plaquetas, $113 \times 10^3/\mu\text{L}$, ocorreu na sexta semana, aproximadamente ao 42º dia, diferentemente dos experimentos de Baker et al. (1987), Gaunt et al. (1990) e Harrus et al. (1996), mostrando o comportamento cíclico e variável da plaquetometria em cães com *Ehrlichia* spp. Os valores mínimo, máximo e médio da plaquetometria foram: $61 \times 10^3/\mu\text{L}$ na 11ª semana, $830 \times 10^3/\mu\text{L}$ na quarta semana e $287 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente, mostrando que a plaquetometria pode estar normal, aumentada ou diminuída no período de avaliação, após a infecção. Nenhum cão infectado apresentou sinais evidentes de hemorragia espontânea durante todo o experimento, mesmo no período de maior trombocitopenia.

A redução na plaquetometria pode estar associada ao sequestro plaquetário esplênico, como mostrado por Smith et al. (1974), ou ao consumo e destruição das plaquetas, evidenciados pelos trabalhos de Waner et al. (1995) e Scott (2000). Anticorpos anti-plaquetários induzidos durante a infecção por *E. canis*, observados no trabalho de Harrus et al. (2001), e destruição precoce das plaquetas por fixação do complemento ou fagocitose, indicados por Grindem et al. (1999), também podem justificar os resultados encontrados neste

experimento. A inibição da migração plaquetária descrita por Kakoma et al. (1978), que ocorre antes do aparecimento de título de anticorpos contra *E. canis*, pode ter sido mais uma das causas de redução na contagem plaquetária neste experimento.

É provável que, após a infecção experimental, esses mecanismos estejam presentes e associados, uma vez que o período analisado não caracterizou a fase crônica, fato verificado por Jain (1993) e Russel e Grindem (2000), ao observarem trombocitopenia associada à hipoplasia medular. A elevação da plaquetometria após o período de trombocitopenia, verificada no presente experimento, evidencia a capacidade de reposição medular. Embora a plaquetometria seja considerada um teste sensível, mas pouco específico na triagem de cães clinicamente suspeitos de erliquiose, como indicado nos trabalhos de Bulla et al. (2004) e Macieira et al. (2005), e a magnitude da trombocitopenia possa aumentar a fidedignidade do diagnóstico (Bulla et al. (2004), este experimento mostrou que os animais com *Ehrlichia* spp., analisados durante 15 semanas, podem ter trombocitose.

As alterações no TP e no TTPA não foram significativas, semelhantes aos resultados de Hibler et al. (1986) e Troy e Forrester (1990), que descreveram animais com diátese hemorrágica sem alterações nesses tempos. Embora Troy e Forrester (1990) tenham afirmado que em casos de CID isso possa ocorrer, e Buhles et al. (1975) e Swango et al. (1989) tenham descrito mecanismos que aparecem na fase aguda da infecção que podem levar a CID, alguns cães apresentaram aumento no TP ou no TTPA ou em ambos, mas sem alterações clínicas evidentes de diátese hemorrágica. O $\text{IC}_{50\%}$ para a relação tempo de infectados:tempo de controles para TP foi de $1,08 \pm 0,01$, e para TTPA, $1,11 \pm 0,02$, significativamente distante do limite crítico de 1,2, o que, segundo Dacie e Lewis (1995), indicariam aumento nesses tempos. O teste estatístico resultou em $t = -12,72$ e $P < 0,01$ para TP e $t = -6,81$ e $P < 0,01$ para TTPA. Na Fig. 2, mostram-se as oscilações observadas nessa relação (tempo de infectados:tempo de controles) durante as 15 semanas após a infecção.

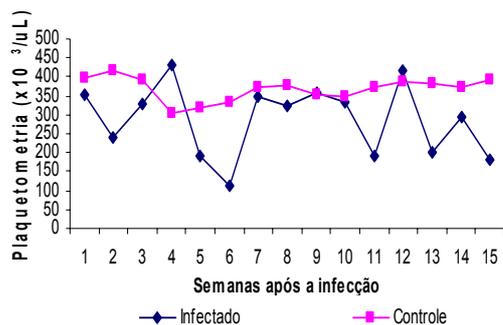


Figura 1. Plaquetometria em cães não infectados e infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp., analisados durante 15 semanas.

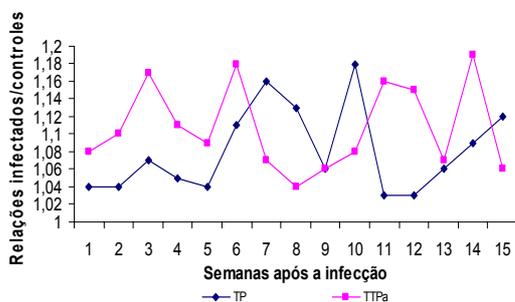


Figura 2. Relação infectados:controles para tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em cães infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp., analisados durante 15 semanas.

Embora alguns valores individuais na relação tenham ultrapassado 1,2, indicando que esses animais poderiam ter deficiência na coagulação plasmática, nenhum cão apresentou sinais clínicos de diátese hemorrágica, durante o período do experimento.

CONCLUSÕES

O caráter da contagem plaquetária é cíclico, intercalando fases de normalidade com outras de trombocitopenia ou trombocitose, e os testes de coagulação plasmática (PT e TTPa) não apresentam alterações significativas. Pode existir trombocitose em alguns cães infectados por *Ehrlichia* spp., em até 15 semanas pós-infecção. Durante 15 semanas após a infecção com *Ehrlichia* spp., os cães não apresentam trombocitopenia clinicamente evidente. Alguns cães infectados com *Ehrlichia* spp., analisados durante 15 semanas, podem ter alterações no TP

e TTPa, sem sinais clínicos de deficiência da coagulação plasmática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, D.C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S.D. et al. Acute *Ehrlichia platys* Infection in the dog. *Vet. Pathol.*, v.24, p.445-453, 1987.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO Jr, J.P. et al. The relationship between degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet. Res.*, p.141-146, 2004.

BUHLES, W.C.; HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K. Tropical canine pancytopenia: role of aplastic anaemia in pathogenesis of severe disease. *J. Comp. Pathol.*, v.85, p.511-521, 1975.

CODNER, E.C.; FARRIS-SMITH, L.L. Characterization of the subclinical phase of Ehrlichiosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.189, p. 47-50, 1986.

COLES, H. *Veterinary clinical pathology*. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. 486p.

COSTA, P.S.G.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* and *Ehrlichia chaffensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.853-859, 2005.

COSTA, P.S.G.; VALLE, L.M.C.; BRIGATTE, M.E. More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.10, p.7-10, 2006.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. *Practical haematology*. 8.ed. Philadelphia: Linvigstone Churchill Elsevier, 1995. p.300-310 e 358-367.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.; VIDOTTO, M.C. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.117, p.285-290, 2003.

GAUNT, S.D.; BAKER, D.C.; BABIN, S.S. Platelet agregation studies in dogs with Acute *Ehrlichia platys* Infection. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.290-293, 1990.

GRIDEM, C.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; PERKINS, P.C. et al. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine

- rocky mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.35, p.56-61, 1999.
- HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A. et al. Platelets dysfunction associated with experimental acute canine Ehrlichiosis. *Vet. Rec.*, v.139, p.290-293, 1996.
- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.2745-2749, 1999.
- HARRUS, S.; DAY, M.J.; WANER, T. et al. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet. Microbiol.*, v.83, p.343-349, 2001
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by rickettsia-like agent in dogs. *J. Infect. Dis.*, v.137, p.182-188, 1978.
- HIBLER, S.C.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infection in dogs. Part II – Ehrlichiosis an infectious cyclic thrombocytopenia. *Compend. Contin. Educ.*, v.8, p.106-114, 1986.
- HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. *Canine Pract.*, v.16, p.13-21, 1991.
- HUXSOLL, D.L.; AMYX, H.L.; HEMELT, I.E. et al. Laboratory studies of tropical canine pancytopenia. *Exp. Parasitol.*, v.31, p.53-59, 1972.
- HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M. et al. *Ehrlichia canis*. The causative agent of a hemorrhagic disease of dogs? *Vet. Rec.*, v.8, p.587, 1969.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p.82-132.
- KAKOMA, I.; CARSON, C.A.; RISTIC, M. et al. Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. *Inf. Immun.*, v.20, p.242-247, 1978.
- KUEHN, N.F.; GAUNT, S.D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Res.*, v.186, p.355-358, 1985.
- LOVERING, S.L.; PIERCE, K.R.; ADAMS, L.G. Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine Ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, p.1266-1271, 1980.
- MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA, A.M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Clin. Pathol.* v.34, p.44-48, 2005.
- MOREIRA, S.S.; BASTOS, C.V.; ARAUJO, R.B. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da ehrlichiose canina em Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.141-147, 2003.
- PIERCE, K.R.; MARRS, G.E.; HIGTOWER, D. Acute canine Ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.1821-1825, 1977.
- RUSSEL, K.E.; GRINDEM, C.B. Secondary thrombocytopenia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Eds.). *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap.69, p.487-495.
- SCOTT, M.A. Imunne-mediated thrombocytopenia. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Eds.). *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap.68, p.478-486.
- SMITH, R.D.; HOOKS, J.E.; HUXSOLL, D.L. et al. Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): survival of phosphorus-32-labeled blood platelets in normal and infected dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.35, p.269-273, 1974.
- SMITH, R.D.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. et al. A. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. *Inf. Immun.*, v.11, p.1216-1221, 1975.
- SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, Rickettsial, Protozoal and miscellaneous infection. In: ETTINGER, S.J. (Ed.). *Textbook of veterinary internal medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p.265-297.
- TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine Ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. *Infectious disease of the dog and cat*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.404-418.
- WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D.J. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.48, p.177-182, 1995.
- WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract.*, v.21, p.75-98, 1991.