



PRISCILA GOMES DE OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia* spp. EM CÃES
ASSINTOMÁTICOS**

**JATAÍ - GO
2020**



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Priscila Gomes de Oliveira

Título do trabalho: Diagnóstico de *Ehrlichia* spp. em Cães Assintomáticos

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


 Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


 Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 06 / 03 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

PRISCILA GOMES DE OLIVEIRA

DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia* spp. EM CÃES ASSINTOMÁTICOS

Orientadora: Prof^a. Dra. Cecília Nunes Moreira

Co-orientador: Prof^o. Dr. Dirceu Guilherme de Souza Ramos

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Rosangela Maria Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

JATAÍ – GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira , Priscila Gomes de
Diagnóstico de Ehrlichia spp. em Cães Assintomáticos [manuscrito]
/ Priscila Gomes de Oliveira . - 2020.
x, 24 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Cecília Nunes Moreira; co-orientador Dr.
Dirceu Guilherme de Souza Ramos ; co-orientador Dr. Rosângela
Maria Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2020.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, tabelas.

1. Diagnóstico presuntivo. 2. Equívocos. 3. Erliquiose. 4. Identificação.
I. Moreira, Cecília Nunes, orient. II. Título.

CDU 639.09

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **001/2020** da sessão de Defesa de Dissertação de **PRISCILA GOMES DE OLIVEIRA**, que confere o título de Mestra em **BIOCIÊNCIA ANIMAL**.

Ao sexto dia do mês de fevereiro de dois mil e vinte, a partir das 13 horas 30 minutos, no Auditório do Prédio de Pós-graduação da Universidade Federal de Jataí-GO, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**DIAGNÓSTICO DE Ehrlichia spp. EM CÃES ASSINTOMÁTICOS**”. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Cecília Nunes Moreira - CIAGRA/UFG/REJ com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Isis Assis Braga (Centro Universitário de Mineiros), membro titular externo; Professora Doutora Débora da Silva Freitas Ribeiro (Centro Universitário de Mineiros), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Cecília Nunes Moreira, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao sexto dia do mês de fevereiro de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Documento assinado eletronicamente por **Cecília Nunes Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 06/02/2020, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Ísis Assis Braga, Usuário Externo**, em 06/02/2020, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Debora da Silva Freitas Ribeiro, Usuário Externo**, em 06/02/2020, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1144352** e o código CRC **36A2644C**.

Referência: Processo nº 23070.043802/2019-02

SEI nº 1144352

Dedico à pequena Dáfine e mamãe Cidinha, afilhada tão esperada e amada.
À minha mãezinha Creusimar Gomes *in memoriam*, primeira educadora da minha história. Que mesmo longe fisicamente esteve presente em meu coração a cada pequena conquista.

Ao pai mais lindo do mundo Crispim Ferreira, aos melhores irmãos que alguém pode ter, Dr. Rodrigo Gomes e Profº. Danilo Gomes.

À Laura Baialardi, amiga que o programa me trouxe, pelo apoio durante a jornada e que muito admiro e agradeço por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus Pai, Deus Filho e Deus Espírito Santo,
Que em cada momento me amou, instruiu e inspirou para que tudo fosse realizado
com muito carinho e dedicação.

À Santa Maria mãe de Deus e minha mãe,
Que sempre me acolheu no colo nos momentos de aflição e angústia.

Aos meus pais Crispim Ferreira e Creusimar Gomes (*in memoriam*),
Que sempre me incentivaram e sacrificaram muito de si, para dar início a jornada
acadêmica, que hoje continua graças aos seus ensinamentos.

Ao meus irmãos Dr. Rodrigo Gomes e Profº. Danilo Gomes,
Que a exemplo deles, consegui trilhar a meu próprio caminho guiada pelo carinho,
incentivo e conselhos, por acreditarem no meu potencial.

À minha Orientadora Profª. Dra. Cecília Nunes Moreira,
Que aceitou prontamente o desafio de explorar uma nova pesquisa de conhecimento
não habitual, a fim de contribuir para o realização deste projeto.

Ao meu Coorientador Dr. Profº. Dirceu Guilherme de Souza Ramos,
Que sempre com boa vontade esteve atuante em esclarecer dúvidas e compartilhar
experiências. Demonstrando ser um profissional inspirador e que muito admiro.

À querida Profª. Dra. Ísis Assis Braga,
Por ser uma profissional admirável e proporcionar a oportunidade de conhecer a
UFMT em Cuiabá, e ter uma das melhores experiências em laboratório de pesquisa.

À minha Coorientadora Profª. Dra. Rosangela Maria Rodrigues,
Pela disponibilidade em contribuir no que fosse necessário durante a pesquisa.

Ao Profº. Dr. Daniel Moura Aguiar e toda a equipe,
Por me receberem no Laboratório de Virologia e Rickettsioses do HOVET da UFMT,
pelo aprendizado e convivência, enriquecedores na área de pesquisa científica.

Ao Diretor Profº. Dr. Douglas Regalin e a toda equipe do HV/UFG/REJ,
Pela compreensão e apoio durante a pesquisa, pelo auxílio e disposição dos clínicos
veterinários e estagiários.

Aos bolsistas voluntários e de iniciação científica,
Que com muita dedicação e esforço, sempre dispostos a cooperar, ajudaram na
realização desse projeto. E em especial de forma indireta em minha formação
profissional e acadêmica.

À FAPEG e LabTest,
Pelo apoio financeiro e doação de reagentes para realização desta pesquisa.

RESUMO

OLIVEIRA, P. G. “DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia* spp. EM CÃES ASSINTOMÁTICOS” Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. 2020.

A *Ehrlichia canis* é um importante agente infeccioso em cães, de difícil controle devido a distribuição do seu vetor, o *Rhipicephalus sanguineus*. Sendo transmitida de um cão para outro pelo repasto sanguíneo do carrapato vetor, que pela hematofagia ingere o agente de um cão infectado contendo mórulas nas células parasitadas. Durante o repasto sanguíneo, os componentes da saliva do carrapato atuam na resposta imune local do hospedeiro, diminuindo a resposta do tipo Th1. Essa supressão favorece a resposta do tipo Th2, possibilitando que a infecção se instale. Desse modo o animal gera alterações hematológicas e bioquímicas inespecíficas dificultando o diagnóstico, que muitas vezes é feito de forma presuntiva. Induzindo ao uso de medicação desnecessária podendo gerar complicações na eficácia do tratamento devido ao favorecimento de resistência a antibióticos. É importante esclarecer e estudar sobre os meios de diagnósticos e as associações necessárias, para evitar tratamentos desnecessários, especialmente em casos assintomáticos. O diagnóstico definitivo requer o uso de técnicas mais sensíveis como técnicas moleculares e não somente considerar o hemograma completo e testes sorológicos qualitativos. Visto que a disseminação de casos de erliquiose entre a população canina e as limitações das técnicas convencionais de diagnóstico, identificação e diferenciação de microrganismos podem promover equívocos no diagnóstico de doenças infecciosas, pretende-se explorar outros meios de diagnósticos disponíveis em cães assintomáticos com alterações hematológicas, visando esclarecer e conscientizar sobre a forma como os tratamentos contra hemoparasitoses estão sendo administrados.

Palavras-chave: Diagnóstico presuntivo, equívocos, erliquiose, identificação.

ABSTRACT

OLIVEIRA, P. G. “DIAGNOSIS OF *Ehrlichia* spp. IN ASYMPTOMATIC DOGS”
Dissertation presented to the Animal Bioscience Program of the Federal
University of Goiás, Jataí Regional, as a partial prerequisite for obtaining the
Master's degree in Animal Bioscience. 2020

Ehrlichia canis is an important infectious agent in dogs, difficult to control due to the distribution of its vector, *Rhipicephalus sanguineus*. Being transmitted from one dog to another by the blood meal of the vector tick, which by hematophagy ingests the agent of an infected dog containing morulae in the parasitized cells. During blood meal, the components of the tick's saliva act on the host's local immune response, decreasing the Th1-type response. This suppression favors the Th2-type response, allowing the infection to settle. In this way, the animal generates nonspecific hematological and biochemical changes, making the diagnosis difficult, which is often presumptively made. Inducing the use of unnecessary medication, which can lead to complications in the effectiveness of the treatment due to favoring resistance to antibiotics. It is important to clarify and study the means of diagnosis and the necessary associations, to avoid unnecessary treatments, especially in asymptomatic cases. The definitive diagnosis requires the use of more sensitive techniques such as molecular techniques and not only considering the complete blood count and qualitative serological tests. Since the spread of cases of ehrlichiosis among the canine population and the limitations of conventional techniques for the diagnosis, identification and differentiation of microorganisms can promote misunderstandings in the diagnosis of infectious diseases, it is intended to explore other means of diagnosis available in asymptomatic dogs with hematological changes, aiming to clarify and raise awareness about how treatments against hemoparasitosis are being administered.

Keywords: Presumptive diagnosis, misconceptions, erlichiosis, identification.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
2. CAPÍTULO 1. DIAGNÓSTICO DE <i>Ehrlichia</i> spp. EM CÃES ASSINTOMÁTICOS..	5
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e métodos.....	9
Resultados.....	12
Discussão	16
Conclusão	20
Referências bibliográficas.....	21
3. CONCLUSÕES GERAIS	24
APÊNDICES	
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO GERAL

A *Ehrlichia canis* é uma bactéria intracelular obrigatória, Gram-negativa, pertencente a ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, e é o agente etiológico responsável por causar Erliquiose Monocítica Canina (EMC) (DUARTE et al., 2013). É possível detectar sua presença tanto no hospedeiro quanto no vetor responsável pela sua transmissão através de técnicas de biologia molecular (INPANKAEW et al., 2016).

A característica do organismo foi descrita por Neitz e Thomas (1938) como sendo colônias de cor púrpura contendo grânulos cocóides parasitando monócitos e neutrófilos de cães. Posteriormente em 1945, Moshkovski renomeou o organismo em homenagem a Paul Erlich, passando a se chamar *Ehrlichia canis* (McDADE, 1990). No Brasil, foi relatado pela primeira vez em Belo Horizonte, MG em 1973. Nos últimos anos a prevalência de EMC em diferentes estados do Brasil variou entre 3,57% e 72,5% de acordo com o método de diagnóstico, demonstrando alta variabilidade epidemiológica entre os estados brasileiros, devido as condições climáticas brasileiras são ideais para manutenção do vetor, além da grande população canina errante no Brasil contribui para a disseminação deste carrapato. A ocorrência em cães semi domésticos e de zona rural também tem sido relatada, evidenciando a alta disseminação dos casos de erlichiose canina (COSTA-JÚNIOR et al., 2013; INPANKAEW et al., 2016).

A transmissão da *E. canis* é de difícil controle pois ocorre pela hematofagia do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, que contrai esses agentes geralmente nas duas primeiras semanas após o cão ter sido infectado; e por habitar em todos os continentes do planeta (MALHEIROS et al., 2016; KAEWMONGKOL et al., 2017; ROTONDANO et al., 2017).

Em 3 a 5 dias após a infecção, ocorre a replicação por divisão binária, quando pequeno número de estruturas compactas formadas por corpúsculos elementares com 1,0 a 2,5 µm de diâmetro são observadas como inclusões pleomórficas, conhecidas como corpúsculos iniciais. Durante 7 a 12 dias corpúsculos se desenvolvem no interior da inclusão, passando a ser possível visualizar em microscopia óptica a formação de mórulas com 2 a 4 µm de diâmetro que é

característica do gênero (SWANGO et al., 1989). As células infectadas podem apresentar de uma a várias mórulas contendo inúmeros corpúsculos elementares no seu interior. Essas células se rompem liberando os corpúsculos elementares por exocitose ou lise, que irão infectar novas células, dando início a um novo ciclo (ALMOSNY et al., 2000).

O patógeno promove desajustes na resposta imunológica, como redução significativa na expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal da classe II (MHC), diminuindo a maturação de células T em linfócitos TCD₄⁺, o qual tem importante atuação na elaboração e na potencialização da resposta imune celular e humoral. Com esta diminuição há redução da liberação de IFN- γ e queda da atividade microbicida de macrófagos (SOUZA et al., 2010).

Ao serem infectados com *E. canis*, os cães apresentam manifestações clínicas como alterações hematológicas e bioquímicas inespecíficas devido a resposta imunológica, dificultando o seu diagnóstico, que desta forma pode ser presuntivo, pelos sinais clínicos e resultados laboratoriais. No entanto, o diagnóstico definitivo depende de outros meios como a observação de mórulas em monócitos e linfócitos, a dosagem de altos títulos de anticorpos anti-IgG de *E. canis* ou pela detecção de DNA de *E. canis* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (COSTA-JÚNIOR et al., 2013; DUARTE et al., 2015; KAEWMONGKOL et al., 2017).

Ressalta-se que em casos assintomáticos, o animal torna-se um reservatório e fonte de infecção difícil de ser identificado, disseminando o agente etiológico a outros animais, sem que haja suspeita clínica do mesmo. Além disso, o contágio ocorre de forma espontânea (ATTIPA et al., 2017, KAEWMONGKOL et al., 2017).

Tendo em vista alta suspeita de erliquiose entre a população canina e as técnicas usuais de diagnóstico de microrganismos, promovendo assim dessa forma equívocos no diagnóstico de doenças infecciosas, pretende-se explorar outros meios de diagnósticos disponíveis, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) nos casos assintomáticos, o que possibilitará evidenciar e controlar de forma mais efetiva a conduta no tratamento desnecessário de hemoparasitoses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMOSNY, N.R.P. & PAGANI, F.F., Alterações hematológicas observadas em casos de erliquiose canina: estudo retrospectivo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v.7, n. suplemento, p.108, 2000.

ATTIPA, C., HICKS, C. A. E., BARKER, E. N., CHRISTODOULOU, V., NEOFYTOU, K., MYLONAKIS, M. E., SIARKOU, V. I., VINGOPOULOU, E. I., SOUTTER, F., CHOCHLAKIS, D.; PSAROULAKI A; PAPASOULIOTIS, K.; TASKER, S. Canine tick-borne pathogens in Cyprus and a unique canine case of multiple co-infections. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 8, n.3, p.341–346, mar., 2017.

CARRILLO, B.J.; RESENDE, H.E.B.; MASSARD, C.L., Erliquiose canina no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro. Anais. p.162, 1976.

COSTA, J.O.; BATISTA Jr, J.A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M. P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivos da Escola Veterinária**, v.25, n. 2, p.199-200, 1973.

COSTA-JÚNIOR, L.M.; REMBECK, K.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B., Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil, **Preventive Veterinary Medicine**, Minas Gerais, v. 109, n. 3, p. 321-326. mai., 2013.

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

DUARTE, S.C.; PARENTE J. A.; LINHARES G. F.C.; Diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* em cães de Goiânia, Brasil, **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, 2013.

FONSECA, J.P., HIRSCH, C. e GUIMARÃES, A.M. Erliquiose monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 7, n. 8, Ed. 231, Art. 1529, Abril, 2013.

KAVINSKI, L.C.; FLORIANO,.; CARON,P.E.; RONZE, S.J.M. Ocorrência de um caso de Erliquiose canina em Curitiba-PR. **Revista Ciência Agrárias**, v.10, n. 1-2, p. 217-218,1988.

HUXSOLL, D. L. Canine Ehrlichiosis (Tropical canine Panctopenia): A Review. **Veterinary Parasitology**, v.2, p.49-60,1976.

INPANKAEW, T.; HII, S. F.; CHIMNOI, W.; & TRAUB, R. J. Canine vector-borne pathogens in semi-domesticated dogs residing in northern Cambodia. **Parasites & Vectors**, Australia, v. 9, n. 1, p. 253- 259, 2016.

KAEWMONGKOL, G., LUKKANA, N., YANGTARA, S., KAEWMONGKOL, S., THENGCHASRI, N., SIRINARUMITR, T.; JITTAPALAPONG, S.; FENWICK, S. G. Association of *Ehrlichia canis*, Hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Anaplasma platys* and severe anemia in dogs in Thailand. **Veterinary Microbiology**, Tailândia, v.201, p. 195–200, 2017.

MALHEIROS, J., COSTA, M. M., DO AMARAL, R. B., DE SOUSA, K. C. M., ANDRÉ, M. R., MACHADO, R. Z., & VIEIRA, M. I. B. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.7, n.5, p.893–900, 2016.

McDADE, J. E. Ehrlichioses- a disease of Animals and Human. **Journal Infectious Disease**, v. 161, p. 609-617, 1990.

ROTONDANO, T. E. F.; KRAWCZAK, F.S.; BARBOSA, W. O., MORAES-FILHO, BASTOS, J. F. N.; LABRUNA, M. A. M.; AZEVEDO, S. S.; MELO, M. A.; ALMEIDA, A. M. P.; *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil, **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.26, n.2 p. 211-215, abr/jun, 2017.

SOUZA, A. W. S. S.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T; CRUVINEL, W.M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N.P. Sistema Imunitário – Parte III, O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade, Rev. Bras. Reumatol., v. 6, n. 50, p. 665-694. 2010.

SWANGO, L. J.; BANKEMPER, K. W.; KONG, L.I. Bacterial, Rickettsial, Protozoal and Miscellaneous infections. In: Ettinger. S. J. (ed): **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, W. B. Saunders Company, p. 265-297, 1989.

2. CAPÍTULO 1

DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia* spp. EM CÃES ASSINTOMÁTICOS

Priscila Gomes de Oliveira^{1*}; Amanda Noeli da Silva Campos²; Daniel Moura Aguiar³, Dirceu Guilherme de Souza Ramos⁴; Cecília Nunes Moreira⁵

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí (UFG/REJ), Jataí-GO, Brasil. vet.priscilagomes@gmail.com*, BR 364, km 195, nº3800, CEP 75801-615.

² Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, Brasil

³ Professor Associado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, Brasil

⁴ Professor Adjunto do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí -GO, Brasil

⁵ Professora Associada do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Goiás, Regional Jataí -GO, Brasil

RESUMO

Considerando a disseminação de casos de erliquiose entre a população canina e a abordagem clínica diante das suspeitas de hemoparasitoses, avaliou-se cães assintomáticos por diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas para investigar a possibilidade de infecção por *Ehrlichia* spp. e presença de anticorpos, induzindo ao diagnóstico e tratamento contra hemoparasitose. Objetivou-se verificar a presença de material genético de *E. canis* e detectar anticorpos anti-IgG de *Ehrlichia* spp. por meio de técnicas de esfregaço sanguíneo, PCR e RIFI em cães assintomáticos. Essa investigação avaliou a presença de DNA de *E. canis* e anticorpos anti-IgG de *Ehrlichia* spp. em 70 cães assintomáticos, sem distinção de raça e com idade entre 6 meses a 10 anos. Os pacientes foram provenientes do Projeto de Controle Populacional por meio de contracepção cirúrgica, realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Jataí. Foi realizada a coleta de sangue e confecção de hemograma completo com pesquisa de mórulas em sangues venoso e periférico, além do concentrado de leucócitos. Foram realizados também a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Imunofluorescência Indireta (RIFI). Entre os animais avaliados foi observado alterações hematológicas como a anemia em 18,57%, leucopenia em 10,00% e trombocitopenia em 8,82%; sendo estes os achados comumente associados a erliquiose canina. Porém na pesquisa em esfregaços sanguíneos e na PCR não foram identificadas a presença de mórulas ou DNA do agente respectivamente. No entanto, a técnica sorológica demonstrou uma frequência de 51,4% de soropositividade, incluindo os animais com pancitopenia, o que poderia levar a interpretação equivocada do médico veterinário ao diagnosticar o animal com erliquiose, caso o mesmo se guiasse somente pelo hemograma e técnicas imunocromatográficas. Em nosso estudo 5,7 % dos animais avaliados receberam tratamento para hemoparasitose. Estes dados revelam que possivelmente na rotina clínica, 24,2% de cães assintomáticos com alterações sugestivas de hemoparasitose, eventualmente poderiam ser submetidos a tratamentos desnecessários de forma indiscriminada.

Palavras-chave: Esfregaço sanguíneo, hematozoários, parasitismo, PCR, RIFI

ABSTRACT

Considering the spread of cases of ehrlichiosis among the canine population and the clinical approach in view of suspected hemoparasitic infections, asymptomatic dogs were evaluated using different diagnostic techniques used to investigate the possibility of infection by *Ehrlichia* spp. and presence of antibodies, leading to diagnosis and treatment against hemoparasitosis. The objective was to verify the presence of genetic material from *E. canis* and detect anti-IgG antibodies to *Ehrlichia* spp. using blood smear, PCR and RIFI techniques in asymptomatic dogs. This investigation evaluated the presence of *E. canis* DNA and anti-IgG antibodies to *Ehrlichia* spp. in 70 asymptomatic dogs, regardless of breed and aged 6 months to 10 years. The patients came from the Population Control Project through surgical contraception, performed at the Veterinary Hospital of the Federal University of Jataí. Blood collection and complete blood count were performed with search for morulae in venous and peripheral blood, in addition to leukocyte concentrate. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Indirect Immunofluorescence (RIFI) were also performed. Among the animals evaluated, hematological changes were observed, such as anemia in 18,57%, leukopenia in 10,00% and thrombocytopenia in 8,82%; these being the findings commonly associated with canine ehrlichiosis. However, in blood smears and PCR research, the presence of morulae or agent DNA was not identified, respectively. However, the serological technique showed a frequency of 51,4% of seropositivity, including animals with pancytopenia, which could lead to a misinterpretation by the veterinarian when diagnosing the animal with ehrlichiosis, if it were guided only by blood count and techniques immunochromatographic. In our study 5,7% of the animals evaluated received treatment for hemoparasitosis. These data reveal that possibly in the clinical routine, 24,2% of asymptomatic dogs with alterations suggestive of hemoparasitosis, could eventually be subjected to unnecessary treatments in an indiscriminate manner.

Keywords: Blood smear, hematozoa, parasitism, PCR, IFAT

INTRODUÇÃO

A erliquiose é uma doença infectocontagiosa classificada como hemoparasitose, devido ao parasitismo de bactérias intracelulares do gênero *Ehrlichia* em células sanguíneas. É uma doença frequente na rotina clínica veterinária promovendo prejuízos à saúde dos animais infectados e à saúde humana, uma vez que existem espécies que parasitam animais e o ser humano.^{21, 6, 37}

Em cães é conhecida como a Erliquiose Monocítica Canina (EMC), comumente causada pela infecção por *Ehrlichia canis*, uma bactéria Gram-negativa, pertencente a ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, formando estruturas compatíveis com mórulas no citoplasma das células mononucleares sem apresentar sinais clínicos patognômicos, podendo manifestar-se de forma aguda, crônica e subclínica.^{16, 35, 19}

É uma enfermidade que geralmente se caracteriza pela redução da contagem dos elementos sanguíneos.^{6, 19} Ao ser infectado com *E. canis*, os cães apresentam manifestações clínicas, alterações hematológicas e bioquímicas inespecíficas, dificultando o seu diagnóstico, que pode ser presuntivo, pelos sinais clínicos e resultados laboratoriais. No entanto, o diagnóstico definitivo depende de outros meios como a observação de mórulas em monócitos e linfócitos ou pela detecção de DNA de *E. canis* pela PCR.^{13, 16, 24}

Desse modo, a utilização de medicamentos para o tratamento com base apenas nos achados hematológicos ou sorológicos pode comprometer a eficácia do mesmo além de gerar resistência aos antimicrobianos utilizados. Como demonstra um estudo^{6,10} que comprovou a ineficácia da azitromicina no tratamento da erliquiose, como alternativa ao uso convencional de doxiciclina.

Na rotina clínica, o diagnóstico definitivo da erliquiose canina tem sido realizado por meio da detecção de mórula de *Ehrlichia* spp. no citoplasma das células mononucleares do sangue nos esfregaços sanguíneos. No entanto, há vários fatores que são notados em cães infectados espontaneamente, que dificultam a pesquisa entre elas a parasitemia ocorrendo apenas nas duas primeiras semanas de infecção e parasitose, em menos de 1% das células mononucleares dos animais. Além da inexperiência do observador que pode considerar alguns artefatos nas lâminas de esfregaço sanguíneo como sendo mórulas de *Ehrlichia* spp. Portanto, outros meios de diagnóstico em associação podem otimizar essa investigação. Tais como sinais

clínicos, histórico do animal, exames complementares como hemograma, provas bioquímicas, testes sorológicos como a RIFI, cultivo celular, *Western Blot* e técnica de PCR.^{20, 18, 35}

Estes métodos são considerados valiosos rastreadores e/ou ferramentas para o diagnóstico da EMC. Sendo a técnica de RIFI para anticorpos anti-IgG de *Ehrlichia* spp., considerado "padrão ouro". No entanto, apenas indicam a exposição ao agente em algum momento indeterminado durante a vida do animal.^{8, 39, 19} Além disso, técnicas sorológicas qualitativas como o imunocromatográfico de fluxo lateral, conhecido como “teste rápido”, muito utilizado na rotina clínica, pode apenas indicar a presença de anticorpos anti-IgG nas amostras. Desta forma o uso destas ferramentas contribuem para um erro no diagnóstico definitivo frente a infecção ativa e possível causa das alterações sugestivas presentes no hemograma completo.²³

Por outro lado existe a disponibilidade, desde os anos 2000, da aplicação de técnicas avançadas em biologia molecular mudando a forma como a erliquiose é diagnosticada, e fornecendo novas ferramentas para a avaliação do tratamento.^{30, 21, 28} Dentre as técnicas de biologia molecular, destaca-se a PCR, que é uma metodologia que se baseia na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA de uma única célula.⁴¹ Além de ser um método apropriado para confirmar o diagnóstico de infecções na fase aguda da EMC, detecta o agente em pequena quantidade, mesmo antes da formação de mórulas ou de soroconversão.
33, 35, 15

Pelo exposto, a identificação precoce e precisa da presença de *Ehrlichia* spp., especialmente a *E. canis* em cães clinicamente saudáveis, permite revelar a real situação da epidemiologia e manejo da erliquiose nos cães domésticos.^{29, 19} Por isso, o estudo de técnicas comumente utilizadas no diagnóstico da infecção, como as de esfregaço sanguíneo, juntamente com o diagnóstico molecular e sorológico se torna relevante para investigar infecção e disseminação, validando a real necessidade do uso de antibióticos.

Neste contexto, o presente estudo realizou uma investigação clínica por meio de diferentes métodos de diagnóstico capazes de rastrear a possível presença de DNA de *E. canis* e quantificar os anticorpos anti-IgG de *Ehrlichia* spp. em cães assintomáticos. Desta forma, discutir as possibilidades em relação a conduta clínica, levando em consideração os possíveis equívocos frente ao diagnóstico definitivo de erliquiose com base apenas em achados hematológicos em cães assintomáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais e coleta de amostras

Segundo cálculos estatísticos e modelos já utilizados,^{40, 16} foram selecionados 70 cães sem distinção de raça, sexo ou idades no período de junho de 2018 a maio de 2019. Os pacientes foram provenientes do Projeto de Controle Populacional por meio de castração cirúrgica, realizado no Hospital Veterinário da UFG Regional Jataí, com o consentimento do tutor, que assinaram um termo de esclarecimento e consentimento livre, para a introdução e participação do paciente no estudo.

Durante a consulta foi constatado que os animais apresentavam ausência de manifestação clínica sugestiva de doença e ausência de carrapatos. Objetivando levantar informações adicionais sobre o estado clínico dos animais foram consultados os arquivos e fichas de cada paciente. Os critérios de seleção foram baseados na anamnese e exame clínico, quanto a temperatura, sistema cardio-circulatório, sistema respiratório, hidratação, linfonodos, mucosas, palpação abdominal e estado geral normais. Quando estes eram satisfatórios para um cão clinicamente saudável, os proprietários foram convidados a incluir o animal no estudo.

Atendidos os critérios de inclusão, foram solicitados o perfil hematológico completo com coleta de uma amostra de 0,5 a 2 ml de sangue da veia cefálica ou jugular em tubo esterilizado contendo anticoagulante universal, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% de cada cão. E outra amostra com 3 ml de sangue total em tubo contendo ativador de coágulo. Uma amostra de sangue da ponta da orelha foi obtida por punção com agulha de menor calibre (18x0,4 mm), por onde foi extraído gotas de sangue para confecção imediata dos esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemoparasitas. As amostras em tubo com EDTA a 10%, foram encaminhadas ao Laboratório de Apoio Diagnóstico do Hospital Veterinário da UFG Regional Jataí para exames laboratoriais e conservadas a -20° C, até o envio para o Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal de Mato Grosso em Cuiabá, MT para realização da PCR para detecção de *E. canis*, juntamente com o soro obtido após centrifugação do tubo com ativador de coagulo e armazenado a -20°C para realização da RIFI.

Este projeto, por envolver experimentação com animais, foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Regional Jataí (CEUA/REJ/UFG) possuindo o parecer de número 009/2018. Além disso, é compromisso dos pesquisadores a preservação da identidade dos proprietários dos cães e os animais envolvidos neste estudo, que foram tratados de acordo

com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Confecção de hemograma completo

Para realização dos hemogramas, as contagens de leucócitos totais, hemácias e dosagem de hemoglobina foram realizados no analisador hematológico da LabTest SDH Vet®. A contagem de plaquetas, contagem diferencial de leucócitos e análises morfológicas das células sanguíneas foram realizadas manualmente através de esfregaços sanguíneos corados com Kit Panótico® Laborclin e analisadas no microscópio óptico da Leica Microsystems® (x100). Os valores normais de referência utilizados para comparação dos parâmetros hematológicos foram obtidos adaptados de estudos previamente realizados para definir os parâmetros normais.^{25, 22}

Confecção de esfregaços sanguíneos

Para a pesquisa de mórulas de *Ehrlichia* spp., foram confeccionados, para cada animal, 3 lâminas de esfregaço sanguíneo venoso (ESV) mantido em tubo com EDTA; 3 lâminas de esfregaço de sangue da ponta da orelha (ESPO) confeccionados imediatamente após as coletas; 3 lâminas de esfregaço da capa leucocitária (ECL).¹⁷ A técnica de esfregaço consistiu na produção de uma fina camada de sangue sobre uma lâmina de vidro para microscopia óptica, essa extensão permitiu a observação das células sanguíneas de forma plana, na região central que consiste no corpo do esfregaço formando uma monocamada de células.¹⁸

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para realização da PCR as amostras dos cães foram divididas em alíquotas em microtubos de 1,5mL e mantidas a -20°C, até a extração de DNA. O sangue com EDTA a 10% foi descongelado em temperatura ambiente e o DNA das 70 amostras dos animais foi extraído utilizando o Kit de extração Wizard® Purification Systems, de acordo com o protocolo convencional de extração de DNA seguindo as instruções do fabricante para um volume de 300 µL de sangue total. O material obtido foi posteriormente utilizado para a realização das reações de PCR para amplificar o gene dsb da *E. canis*.

A PCR, seguiu um protocolo estabelecido previamente,^{3,14} em que foi utilizado 2,5 µL de DNA de cada amostra, a fim de amplificar um fragmento de 173 pb do gene dsb de *E. canis* e do fragmento com 551 pb do gene bab de *Babesia* sp na mesma reação, por técnica de PCR convencional. Para isso, foi utilizado o volume total de 22,51 µL e as sequências dsb-330 “sense” (5'-GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e dsb-481 “antisense” (5'-TGC TTG TAA TGT AGT GCT GCA T -3'); bab 143-167 “sense” (5'-CCG TGC AAT TGT AGG GCT AAT ACA-3') e bab 694-667 “antisense” (GCT TGA AAC ACT CTA RTT TTC TCA AAG-3').

Os produtos amplificados foram visualizados em Gel de Agarose 1,5% (Agarose NA, Amersham Biosciences), após a eletroforese a 90 volts, durante 15 minutos, com marcador de massa molecular de 100 pb (*DNA Ladder* 100 bp *Invitrogen*). Foi realizado também segundo protocolo adaptado,³ a amplificação do fragmento com 551 pb do gene bab de *Babesia* sp., sendo bab 143-167 “sense” (5'-CCG TGC AAT TGT AGG GCT AAT ACA-3') e bab 694-667 “antisense” (GCT TGA AAC ACT CTA RTT TTC TCA AAG-3') para descartar alterações por causa desse tipo de hemoparasitose e evidenciar o uso desnecessário e equivocado do tratamento para essa enfermidade.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi realizada a partir de lâminas confeccionadas com células DH82 infectadas com a cepa *E. canis* de São Paulo oriundas do Laboratório de Virologia e Rickettsioses do HOVET-UFMT, as amostras de soro foram diluídas a partir de 1:40 em solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,2) para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp.¹ Foram depositados 10µL de cada soro diluído em cada um dos poços das lâminas com antígeno de *E. canis*, como substratos, reservando-se dois poços, em cada lamina, para a adição dos controles positivo e negativo, que foram realizados por amostras sabidamente positivas e negativas frente ao antígeno de *E. canis*. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida.

Em seguida, foram lavadas duas vezes em PBS, secas e a cada poço adicionados 10µL de conjugado (anti-IgG de cão, marcado por isotiocianato de fluoresceína – Sigma Aldrich®) conforme orientação do fabricante. As lâminas foram novamente incubadas, como já mencionado. A partir dessa etapa a luz direta deve ser evitada para realizar novas lavagem e

secagem, as lâminas serão avaliadas em microscopia com emissão de luz ultravioleta. Para *E. canis*, serão considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:40 com observação de fluorescência em cor verde fluorescente. A intensidade de fluorescência das lâminas será avaliada comparativamente com as amostras de soro controle positivo e negativo

Análise estatística

A análise ocorreu de forma descritiva pelas frequências relativas obtidas pela razão entre a frequência absoluta de um evento e o número de observações, sendo neste estudo os 70 animais, estabelecidas através do pacote estatístico R (2013)³³, onde foram mensurados os intervalos de confiança ao nível de 95%. Nenhuma comparação estatística foi estabelecida, uma vez que os animais se demonstraram negativos para a presença de *E. canis* em todos os testes realizados. Foi utilizado o Teste de Mann-Whitney na correlação das amostras para RIFI positivas com as alterações hematológicas, bem como as altas titulações com hiperproteinemia, hipoproteinemia, hiperproteinemia, hiperglobulinemia.

RESULTADOS

Dos 70 animais participantes deste estudo, 35 eram machos e 35 eram fêmeas. A idade dos animais variou entre 6 meses a 10 anos. Quanto as raças, apenas 4 possuíam raça determinada, sendo os outros 66 sem raça definida. Nenhum animal apresentou presença de carrapato no momento da consulta, porém 22,8 % (16/70) dos animais tinham histórico de infestação.

Em relação aos hemogramas realizados 62,8% (44/70) dos cães envolvidos neste estudo, apresentaram alguma alteração hematológica. A partir desse resultado foi evidenciado que 24,3% (17/70) dos achados eram alterações que geralmente são associadas a erliquiose como a presença de anemia, leucopenia e trombocitopenia (Tabela 1).

Tabela 1: Frequências de alterações hematológicas presentes no hemograma completo entre os 70 cães assintomáticos em Jataí, Goiás

Alterações hematológicas	Nº Absoluto/n	Frequência Relativa	Intervalo de Confiança*
Anemia normocítica e normocromica	9/70	12,86%	10,28 a 29,66%
Anemia microcítica e normocromica	4/70	5,71%	5,07 a 21,28%
Policitemia	9/70	12,86%	10,28 a 29,66%
Leucocitose	14/70	20,00%	11,39 a 31,27%
Eosinofilia	10/70	14,49%	11,39 a 31,27%
Neutrofilia	7/70	10,9%	7,17 a 25,04%
Linfocitose	1/70	1,43%	0,04 a 7,70%
Leucopenia	7/70	10,00%	4,12 a 19,52%
Neutropenia	2/70	2,90%	0,35 a 10,08%
Linfopenia	4/70	5,71%	1,58 a 13,99%
Monocitopenia	1/70	1,43%	0,04 a 7,70%
Trombocitopenia	6/70	8,57%	3,21 a 17,73%
Trombocitose	6/70	8,57%	3,21 a 17,73%
Hiperproteinemia	11/70	15,71%	8,11 a 26,38%
Hipoproteinemia	1/70	1,43%	0,04 a 7,70%

*Considerando 95% de confiança. Nenhum dado hematológico teve correlação com RIFI positiva ($p < 0,05$) pelo Teste de Mann-Whitney.

Tanto a pesquisa de mórulas de *Ehrlichia* spp. nos diferentes tipos de esfregaços sanguíneos quanto a pesquisa da presença do gene *dsb* da *E. canis* por PCR (Figura 1), revelaram ausência da hemoparasitose nos animais deste estudo.

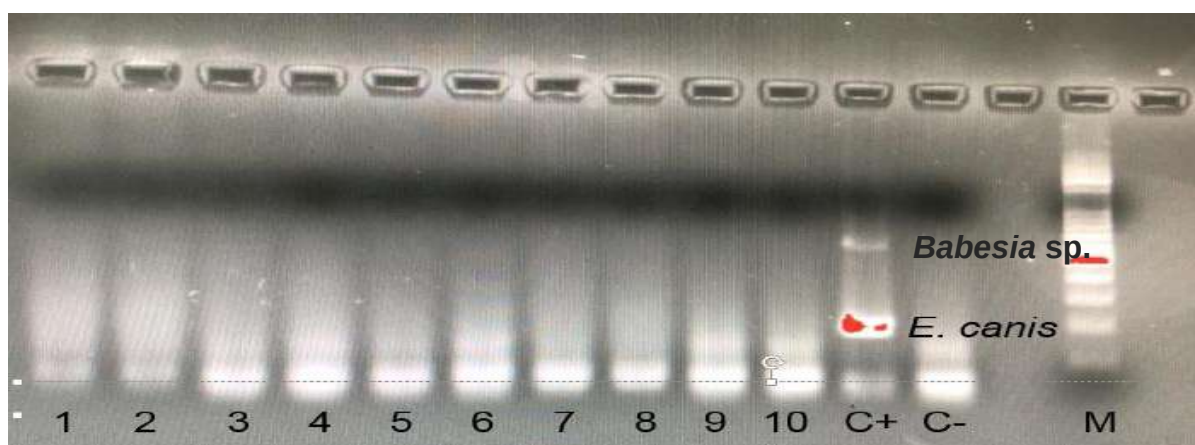


Figura 1 - Produtos de PCR da amplificação dos genes *dsb* (173 pb) de *E. canis* e gene *bab* (551 pb) de *Babesia* sp. em 10 das 70 amostras. Não foram identificadas amostras positivas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10 C+: Controle positivo (amostra de referência de *E. canis*); C-: Controle negativo (água-pura); PM: padrão molecular de 100 pb (*DNA Ladder* 100 bp *Invitrogen*).

Quanto a presença de anticorpos pela técnica RIFI, verificou-se reatividade em 51,4% (36/70) das amostras dos 70 cães avaliados (Figura 2). As titulações finais variaram entre 1:40 e 1:655.360, conforme demonstra a Tabela 2. Dos 36 animais com RIFI positiva apenas 6

apresentaram quadro de leucopenia, não havendo correlação entre RIFI positiva e leucopenia, uma vez que a maior parte dos animais com RIFI positiva não apresentam quadros de leucopenia ($p=0,02509$). O mesmo ocorreu com trombocitopenia ($p=0,0479$) e anemia ($p=0,0440$).

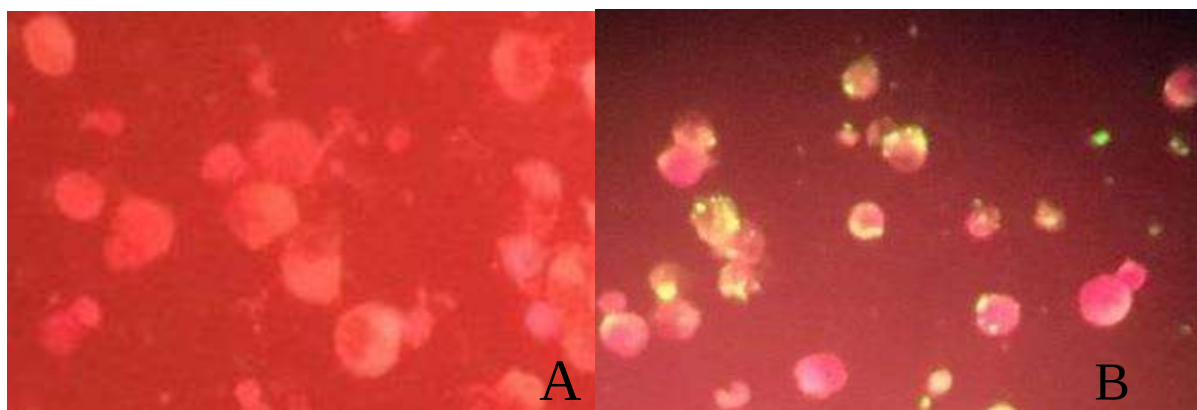


Figura 2 – Fotomicrografia da titulação 1:680, **A**: Células DH82 infectadas com *E. canis* com reação fluorescente em amostra negativa. **B**: Células DH82 infectadas com *E. canis* com reação fluorescente em amostra positiva de forma difusa, caracterizando aparentemente antígenos solúveis no citoplasma celular, corpúsculos elementares e iniciais, bem como a presença de mórulas, RIFI, 40X.

Tabela 2 Frequência de títulos de anticorpos anti- IgG de *Ehrlichia* spp., por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), nos 36 cães soropositivos de 70 amostras de cães assintomáticos em Jataí, Goiás.

Título Final	Nº de cães	Frequência Relativa (%)
40	2	2,86
160	3	4,29
640	8	11,42
2.560	3	4,29
10.240	7	10,00
20.480	3	4,29
40.960	6	8,57
163.840	2	2,86
655.360	2	2,86

A partir dos pacientes com titulações acima de 10.240 foram mensurados os níveis de albumina, globulinas e proteínas totais, a fim de evidenciar a relação da hiperproteinemia com altas titulações. Dos 20 animais com alta titulação 15 apresentaram hiperproteinemia com níveis normais de albumina e hiperglobulinas, conforme o quadro 1. Sendo hiperproteinemia

e hipoalbuminemia ($p < 0,05$) considerando que existe diferença estatística com relação a alta titulação.

Quadro 1: Relação da alta titulação pela RIFI com os níveis de albumina, globulinas e proteínas totais dos animais com titulação acima de 1:10.240

Titulações	Albumina*	Globulinas*	Proteínas Totais*
10:240	3,3	3,9	7,2
10:240	2,8	6,6	9,4
10:240	2,5	6,9	9,7
10:240	3,3	4,8	8,1
10:240	2,7	2,8	5,5
10:240	1,45	5,3	6,8
10:240	2,5	3,4	5,9
20.480	3,4	4,6	8
20.480	3,2	2,8	6
20.480	2,6	5,6	8,2
40.960	1,2	7,6	8,8
40.960	3,1	5,7	8,8
40.960	3,3	4,7	8
40.960	3,7	4,7	8,4
40.960	2,2	5,8	8
40.960	2,7	6,3	9
163.840	3,0	7,2	10,2
163.840	2,8	8	10,8
655.360	2,4	5	7,4
655.360	3,5	8,5	>12

*Níveis normais: Albumina (2,3-3,8); Globulinas (2,7-4,8) e Proteínas Totais (5,5-7,1). Adaptados de estudos previamente realizados para definir os parâmetros normais.^{25, 22}

Entre os 17 animais com alguma das alterações hematológicas sugestivas de erliquiose, 23,5% (4/17) deles foram tratados contra hemoparasitose, com idade entre 3 a 5 anos, destes 2 animais apresentavam anemia, leucopenia e trombocitopenia e foram tratados com doxiciclina e imizol. Houve 1 animal com anemia e trombocitopenia que foi tratado com doxiciclina e imizol e ainda outro apenas com anemia, sendo tratado com o uso doxiciclina. Os resultados na pesquisa envolvendo este estudo estão representados no Quadro 2.

Quadro 2: Resultados das análises desenvolvidas pelo estudo relacionados aos 4 animais tratados contra hemoparasitose.

Animal	Alt. Hematológicas	Esfreg. Sanguíneos	PCR ERL+BAB	RIFI	Tratamento
1	Pancitopenia	Negativo	Negativo	1:40.960	Doxiciclina e Imizol
2	Pancitopenia	Negativo	Negativo	Não reagente	Doxiciclina e Imizol
3	Anemia e Trombocitopenia	Negativo	Negativo	1:640	Doxiciclina e Imizol
4	Anemia	Negativo	Negativo	1:40	Doxiciclina

ERL: *Ehrlichia canis*, BAB: *Babesia* sp.

Os mesmos 70 animais estudados também obtiveram resultados negativos para *Babesia* sp. pela PCR, demonstrando que o uso de imizol também foi desnecessário e que estas alterações hematológicas podem ser decorrentes de outras situações não só por hemoparasitose.

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos pela PCR e esfregaços sanguíneos, os animais não estavam em bacteremia por *Erlichia* spp. Apesar da sensibilidade mais baixa no esfregaço sanguíneo e da sensibilidade superior da PCR, assim como verificados por outros autores^{16,35} as duas técnicas indicaram o mesmo resultado, os animais não apresentaram erliquiose. Porém alguns deles foram tratados desnecessariamente para a doença baseados em outros achados considerando possivelmente uma erliquiose subclínica, já que a PCR foi realizada posteriormente com sangue coletado no dia da consulta antes do início do tratamento, que também contribuiu para confirmar que os animais foram tratados por medicamentos contra a erliquiose e não portavam a *E. canis*.

Em casos onde ocorre a negatividade no esfregaço sanguíneo, muitas vezes o clínico veterinário adota como diagnóstico, testes rápidos ou testes sorológicos por fácil acesso ou ainda por achados hematológicos. Entretanto, apesar de testes rápidos como os imunocromatográfico de fluxo lateral e sorológicos terem resultados positivos, eles indicam a presença de anticorpos contra *Ehrlichia* spp., mas não significa que o animal esteja parasitado, conforme ocorreu neste estudo, uma vez que estes títulos de anticorpos podem permanecer elevados por meses e anos.²³ Portanto a associação das técnicas por PCR e esfregaço sanguíneo positivos, poderia contribuir para o diagnóstico definitivo. Logo, o que se considera a partir dos achados hematológicos são as possibilidades como causa principal, o que levaria o clínico a tratar um animal contra erliquiose sem que o mesmo esteja em bacteremia.

Um dos achados que rotineiramente é considerado diagnóstico de erliquiose subclínica é a trombocitopenia, sendo evidenciada em 8,52% dos animais, entretanto a trombocitopenia pode ser associada⁷ a fatores relacionados ao consumo aumentado de plaquetas, deficiência imunológica, além do sequestro realizado pelo sistema mononuclear fagocitário ou outras infecções e neoplasias. Enquanto que a anemia, outro achado associada à EMC pode estar associada a doenças hematológicas e não hematológicas como infecções, neoplasias, desnutrição, deficiência nutricional e doenças renais. Conforme estudos recentes,²⁶ pode não estar caracterizada como uma doença, mas sim um estado patológico, demonstrando que sua classificação tem grande colaboração para concluir o diagnóstico. Uma vez que se tratando de animais assintomáticos, a anemia pode estar relacionada a fatores como idade e raça.⁷

Em relação a leucopenia, 10% dos animais apresentavam essa alteração, porém em alguns casos, pode-se tratar de uma variação transitória normal relacionada com a fase da vida do indivíduo, quando discreta. Além de poder ser evidenciada em casos não só infecciosos, mas também possuir causas inflamatórias, parasitárias, neoplásicas, tóxicas ou anafiláticas, segundo alguns autores.²⁷

Nota-se que os animais não apresentavam erliquiose embora tenham sido tratados para a mesma, baseados em diagnóstico presuntivos, por que não possuíam o diagnóstico molecular no ato da consulta e retorno clínico. Na rotina clínica alguns cães podem apresentar achados hematológicos e as vezes teste sorológico positivo que podem induzir a um diagnóstico de erliquiose subclínica mas que não estão doentes de fato. Portanto, o teste sorológico pode superestimar o problema, porque é um teste de detecção de anticorpos, sendo assim um animal previamente exposto pode ter anticorpo por tempo indeterminado e não possuir a *E. canis* como causa de prejuízos a saúde do animal, sendo recomendado o uso de técnicas sorológicas pareadas.^{26, 27}

Tendo em vista a hiperproteinemia presente em 16 animais dos 17 com alterações hematológicas sugestivas de erliquiose, a maioria provavelmente ocorreu devido ao aumento de globulinas uma vez que em cães com alta titulação, a albumina apresenta-se normal, com aumento das proteínas plasmáticas totais devido a hiperglobulinemia.

Todos os achados hematológicos apesar de estarem presentes em casos de erliquiose, não indicam somente este tipo de doença,³¹ pois são inespecíficos e inconstantes apesar de alguns terem relação com achados frequentes na fase aguda da doença, eles podem indicar outras enfermidades, bem como fazer alterações fisiológicas transitórias, como

mentionado anteriormente. Portanto os animais podem ser tratados desnecessariamente contra erliquiose devido a exposição prévia a *E. canis*, porém sem mais estarem portando a bactéria apesar de apresentarem anticorpos, comumente detectados em testes rápidos e sorológicos.

Enfim, os clínicos veterinários estão sendo induzidos pelos meios de diagnóstico disponíveis e de maior acesso, como o hemograma e técnicas de imunocromatografia, a erroneamente considerarem a erliquiose subclínica como diagnóstico em animais assintomáticos.

Desse modo, a causa primária pode estar sendo negligenciada pois não está sendo descoberta como deveria e a instauração de medidas terapêuticas sem real necessidade estão sendo cada vez mais aplicadas, expondo o paciente a efeitos colaterais com o uso rotineiro de medicamentos como a doxiciclina, antimicrobiano de eleição contra erliquiose.³⁶

A doxiciclina administrada em cães é utilizada para o tratamento de várias infecções bacterianas por Gram positivas e negativas, por se tratar de um antibiótico de amplo espectro. Utilizado por um longo período, pode causar além do aumento da resistência a antimicrobianos, efeitos colaterais como vômito, diarreia e deficiência óssea, prejudicando o desenvolvimento de animais jovens. Além da eficácia ser questionada em estudo recente,³⁶ ao evidenciar que a *E. canis* foi detectada em cães tratados com doxiciclina por 14 dias e em carrapatos alimentados com esses cães, sugerindo que os cães mesmo em tratamento podem permanecer como reservatórios para *E. canis*.

Neste estudo, todos os animais com alterações hematológicas sugestivas para erliquiose corresponderam as amostras negativas para presença de mórulas e por PCR. A ausência deste agente em esfregaços sanguíneos justifica-se pela dificuldade em observar as mórulas em células mononucleares no esfregaço sanguíneo devido à baixa parasitemia, em especial nessa fase da doença e a porcentagem de células infectadas raramente exceder a 1%, porém neste estudo os animais realmente eram negativos, demonstrando que o esfregaço ainda pode ser uma técnica confiável porém não absoluta.²⁰

Em relação aos tipos de esfregaço não houve diferença entre eles, uma vez que os animais avaliados não estavam em bacteremia, ou seja, parasitados por *Ehrlichia* spp. confirmados pelo resultado negativo por PCR em todas as amostras. Porém, os três tipos de esfregaço realizados no presente estudo, demonstraram ser uma técnica convencional que ainda é eficiente, pois os animais também foram negativos em uma técnica mais sensível como a PCR, para essa fase da doença.

No entanto, os estudos recentes ³⁵ demonstraram que o diagnóstico por pesquisa de hemoparasitas em relação a outras técnicas em 85 cães, mesmo em fase aguda obteve a menor positividade (1,17%), devido à dificuldade na execução da técnica e detecção do agente. Um fator importante que induz o clínico veterinário a acreditar na ausência da bactéria, quando tem acesso a PCR para confirmar a ausência.

Na fase assintomática, estágio geralmente associado à cronicidade, os cães podem apresentar-se negativos na PCR do sangue periférico, conforme apresentado neste estudo, porém o agente pode ser encontrado presente no baço, em detrimento da circulação sanguínea. ¹⁹ Fato este que justificaria os resultados negativos na PCR para esta categoria dos cães estudados.

Dos animais avaliados, 51,4% (36/70) foram soropositivos pela técnica de RIFI, resultante de estímulo imunogênico persistente, conforme observado também por outros autores que estudaram cães com suspeita clínica de erliquiose,^{32,19} porém em cães sintomáticos é esperado evidenciar altos títulos de anticorpos. Já em cães assintomáticos como apresentado neste estudo, a porcentagem de altos títulos foi elevada porém sem evidências de suspeita de doença.

Sobre a correlação entre a RIFI positiva e achados como leucopenia, anemia e trombocitopenia, neste estudo, estatisticamente o animal pode não ter pancitopenia com RIFI positiva, pela confiabilidade do teste demonstrando $p < 0,05$, mesmo discordando de outros autores, não há correlação significativa entre pancitopenia e soropositividade.^{19,20} Logo, a presença desses achados em pacientes assintomáticos, induzem de forma errônea a utilização de testes sorológicos rápidos para confirmação da suspeita de erliquiose, uma vez que nem sempre são compatíveis com as alterações hematológicas e presença do agente. A utilização de técnicas rápidas em associação com hemograma completo é recomendada quando o animal apresentar sinais clínicos como hipertemia, perda de peso, astenia, petéquias geralmente compatíveis com a fase aguda da doença, além de parasitismo por carrapatos.¹⁷

De acordo com o que foi apresentado neste estudo 24,2% (17/70) dos animais com alterações hematológicas, foram correspondentes aos “marcadores” sugestivos de Erliquiose Monocítica Canina em fase aguda, com base no hemograma completo, sendo estes anemia, trombocitopenia e leucopenia. O que poderia levar equivocadamente o médico veterinário a prescrever a administração de fármacos desnecessariamente, uma vez que não há evidências de agente circulante.

Na rotina clínica, cães com suspeita de erliquiose não confirmada pelos achados hematológicos porém com resultados positivos para técnicas de imunocromatografia, não devem receber tratamento indiscriminado com antimicrobianos.⁶ Como mencionado os 4 animais foram tratados desnecessariamente com medicamentos contra hemoparasitoses incluindo a doxiciclina e imizol , pois não estavam parasitados por *Ehrlichia* spp ou *Babesia* spp, uma vez que também pode ser um diagnóstico diferencial.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que cães assintomáticos devem ser avaliados criteriosamente em relação a presença de agentes infectocontagiosos, como as hemoparasitoses. Uma vez que, mesmo em regiões endêmicas, outras causas podem levar ao aparecimento de alterações hematológicas sugestivas. Dessa forma, o hemograma completo e testes rápidos não são suficientes para concluir o diagnóstico. A pesquisa parasitológica por esfregaço sanguíneo, nessa fase da doença mostrou-se efetiva assim como a PCR confirmando ausência do agente nesses animais. Porém resultados sorológicos positivos associados a alterações hematológicas sugestivas de erliquiose em alguns cães, podem equivocadamente levar o médico veterinário a prescrever medicamentos desnecessariamente para o tratar a “falsa” hemoparasitose.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

FINANCIAMENTO

O autor recebeu apoio financeiro em forma de bolsa de pós-graduação de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e doação de reagentes bioquímicos da empresa Lab Test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGUIAR DM, et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. Cienc Rural 2007; 37: 796-802.
- 2 ALBERNAZ AP, et al. Erliquiose canina em Campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Cienc Anim Bras 2007; 8: 799-806.
- 3 ALMEIDA AP, et al. Coxiella symbiont in the tick *Omithodoros rostratus* (Acari Argasidae). Ticks and Tick-Borne Diseases 2012; 3: 203-206.
- 4 ARRAGA-ALVARADO CM, et al. Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. Am J Trop Med Hyg 2014; 91: 1161-1165.
- 5 ATTIPA C, et al. Canine tick-borne pathogens in Cyprus and a unique canine case of multiple co-infections. Ticks and Tick-Borne Diseases 2017; 8: 341–346.
- 6 AZEVEDO FD. Protocolos terapêuticos no tratamento da erliquiose monocítica canina, Port Pesquisa Veterinária Brasileira –BVS- Vet, 2012; s.n.; 85.
- 7 BAI L, et al. Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in dogs in and around Hisar, Haryana, India, J Parasit Dis 2016; 41: 647-654.
- 8 BELO B, et al. Estudo de anemias e Policitemias registradas em cães de Joinville/SC de 2015 a 2017. Public Med Vet Zootec 2018; 12:1-7.
- 9 BULLA C, et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. Vet Res 2004; 35: 141-146.
- 10 CANTADORI DT, et al. Azitromicina no tratamento da erlichiose monocítica em cães naturalmente infectados. Cienc Anim Bras 2014; 15: 458-465.
- 11 CASTRO MB, et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet Parasit 2004; 119: 73-86.
- 12 COSTA-JÚNIOR LM, et al. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil, Prev Vet Med 2013;109: 321-326.
- 13 COSTA JS, et al. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) ticks in dogs and their domestic environment in Cuiaba, MT, Brazil. Braz J Vet Res Anim Sci 2019; 56: 2.
- 14 DAHMANI M, et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria, Ticks and Tick-Borne Diseases 2015; 6: 198–203.

- 15 DUARTE SC, et al. Diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* em cães de Goiânia, Brasil, Rev Patol Trop 2013; 42: 1.
- 16 ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. J Small Anim Pract 1991; 33:540-543.
- 17 FONSECA JP, et al. Erliquiose monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. Public Med Vet Zootec 2013; 7: 1529.
- 18 FONSECA JP, et al. Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. Rev Cienc Anim Bras 2017; 18: 1-9.
- 19 HARRUS S, WANER T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. Vet J 2011; 187: 292-296.
- 20 ISOLA JGMP, et al. Erliquiose canina- Revisão de Literatura. Rev Cient Eletron Med Vet 2012;18.
- 21 JAIN NC. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993. 417p
- 22 JAPOLLA G, et al. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico, Enciclop Biosf 2015; 11: 2635.
- 23 KAEWMONGKOL G, et al. Association of *Ehrlichia canis*, Hemotropic *Mycoplasma spp.* and *Anaplasma platys* and severe anemia in dogs in Thailand. Vet Microb 2017; 201: 195–200.
- 24 KANEKO JJ, et al. Clinical biochemistry of domestic animals. 5.ed. San Diego: Academic, 1997:932.
- 25 LACERDA, LA. Anemias: Avaliação clínica e laboratorial. In: Jericó MM, et al. Tratado de medicina interna de cães e gatos. 1 ed. Roca, Rio de Janeiro, Brasil. 2015: 7047.
- 26 LATIMER KS, MEYER DJ. Os leucócitos na Saúde e na Moléstia. In: ETTINGER, S.J. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3.ed. vol. 4, São Paulo: Manole,1992: 2616-2664.
- 27 MAEKAWA N, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in a Philippine dog, Elsevier, Filipinas, 2017.
- 28 MALHEIROS J, et al. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. Ticks and Tick-Borne Diseases 2016; 7:893–900.
- 29 MARTIN AR, et al. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. Experim parasite 2005; 109: 76-80.
- 30 MENDONÇA CS, et al. Erliquiose Canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. Biosci J 2005; 21:167-174.
- 31 ROTONDANO TEF, et al. *Ehrlichia canis* and *Rickettsia spp.* in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil, Braz J Parasitol 2017, 26: 211-215.

- 32 RUFINO CP, et al. Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA Using Multiplex PCR, Vector Borne Zoonotic Dis 2013; 13:12.
- 33 R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.14.0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2013.
- 34 SALES MRRP, et al. Prevalência de *Ehrlichia canis* pela *Nested*-PCR, correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, Rev Bras Med Vet 2015; 37: 47-51.
- 35 SCHAEFER JJ, et al. Tick acquisition of ehrlichia canis from dogs treated with doxycycline hyclate. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:3394–3396.
- 36 SILVA BA, et al. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. Gac Méd Méx 2014; 150:171-174. Espanhol.
- 37 SOUSA VRF, et al. Coinfecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cães diagnosticada pela PCR. Acta Sci Vet 2009; 37: 281-283.
- 38 YANCEY CB, et al. Regional Seroreactivity and Vector-Borne Disease Co-Exposures in Dogs in the United States from 2004–2010: Utility of Canine Surveillance. Vector Borne Zoonotic Dis 2014; 14: 724–732.
- 39 UENO TEH, et al. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet 2009; 18: 57-61.
- 40 WANER T, et al. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. J Vet Diagn Invest 2000. 12 : 240-244.
- 41 WANER T, et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. Vet Parasit 2001. 95: 1-15.

3. CONCLUSÃO GERAL

O estudo dos métodos de diagnóstico da erliquiose em suas diferentes fases, é importante para investigar causas de alterações hematológicas observadas no hemograma completo. Alguns métodos tradicionais devem ser complementados com técnicas diagnósticas mais precisas e sensíveis a fim de evitar o diagnóstico presuntivo, e consequente tratamento desnecessário. Cães assintomáticos com alterações hematológicas compatíveis com erliquiose devem ser avaliados com mais critério. Mesmo sendo soropositivos por testes sorológicos não há justificativa suficiente para tomar uma medida terapêutica.

Dessa forma, analisar separadamente os exames laboratoriais e resultados sorológicos positivos poderia equivocadamente levar o médico veterinário a considerar a erliquiose monocítica canina ou outra hemoparasitose como sendo a causa dos achados hematológicos, porém de forma errônea.

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do projeto: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE SUBCLÍNICA EM CÃES

Nome do pesquisador principal: Priscila Gomes de Oliveira e Cecília Nunes Moreira

Razão social da UFG e número de protocolo na CEUA: 009-18

Objetivos do estudo: Realizar uma investigação clínica em cães submetidos a contracepção cirúrgica eletiva, quanto a presença de erliquiose monocítica canina em esfregaço sanguíneo de sangue venoso e sangue periférico obtido da ponta da orelha, e o diagnóstico por meio de PCR e RIFI visando comparar as diferentes técnicas de pesquisa deste hematozoário em cães.

Procedimentos a serem realizados: O seu animal virá uma única vez no momento da consulta para a contracepção. Será realizado a coleta de sangue por punção venosa e capilar da ponta da orelha.

Potenciais riscos para os animais: O único desconforto para o seu animal poderá ser durante a coleta sanguínea.

Cronograma: Seu animal no momento da consulta clínica, será submetido a coleta de sangue venoso e capilar.

Benefícios: Esta pesquisa contribuirá para investigação de erlichiose canina subclínica, explorando diferentes meios de diagnóstico, afim de comparar os resultados obtidos visando beneficiar os cães de Jataí e região com suspeita dessa enfermidade. Além disso, os resultados gerados contribuirão para a atenção da erlichiose canina na região sudoeste.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s).

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.

Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O médico veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será a Dra. Priscila Gomes de Oliveira, inscrito (a) no CRMV sob o nº 7846. Além dele, a equipe do pesquisador principal

Cecília Nunes Moreira também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: (64) 9 9602 2109

Equipe: Priscila Gomes de Oliveira/ Cecília Nunes Moreira

Endereço: Rod. Br 364, km 192, Setor Parque Industrial, nº 3800

Telefone: (64) 3606 8324

Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com a Comissão de Ética no Uso de Animais/UFG pelo e-mail: ceujatai@yahoo.com.br

Este termo segue o recomendado pela Resolução Normativa CONCEA no 22, de 25 de junho de 2015.

APÊNDICE B: Consentimento da Participação do Proprietário do Animal

Eu _____ RG _____
_____ abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa “**MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE SUBCLÍNICA EM CÃES**” como sujeito. Declaro que fui devidamente informada (o) e esclarecida sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação, assim como os meus direitos.

Local e data: _____. ____/____/____.

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Declaração do pesquisador

Expliquei o objetivo do estudo ao voluntário. Tenho pleno conhecimento de que ele(a) entendeu o objetivo, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo.

Assinatura _____ do _____ pesquisador:
_____ Data: __/__/__.

Nº do animal: _____.

Nº da amostra: _____.

Este termo segue o recomendado pela Resolução Normativa CONCEA no 22, de 25 de junho de 2015.

ANEXO A: Parecer Consubstanciado Referente ao Projeto de Pesquisa Do
Protocolo N. 009/18

Jataí, 16 de fevereiro de 2018.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE
PESQUISA DO PROTOCOLO N. 009/18**

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Mestrado

II - Identificação:

- ☐ Data de apresentação a CEUA: 15-02-2018
- ☐ Título do projeto: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ERLICHIOSE SUBCLÍNICA EM CÃES
- ☐ Pesquisador Coordenador no SAP: Cecília Nunes Moreira
- ☐ Pesquisador Responsável/ Unidade: Priscila Gomes de Oliveira
- ☐ Pesquisadores Participantes: Andréia Vitor Couto do Amaral e Camila Franco de Carvalho.
- ☐ Médico Veterinário/CRMV: Priscila Gomes de Oliveira / 7846
- ☐ Unidade onde será realizado: Regional Jataí/ Hospital Veterinário

III - Objetivos e justificativa do projeto:

IV - Sumário do projeto:

- ☐ Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais: não existe qualquer método que possa ser usado para substituir o uso de sangue total e periférico de cães nesta pesquisa
- ☐ Prevê Projeto Piloto: Não
- ☐ Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental: Canis lúpus familiaris/ 70 animais no total, 35 machos e 35 fêmeas.
- ☐ Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc): *Canis lúpus familiaris*/ Fêmeas e machos de 8 meses a 9 anos de idade e qualquer peso, encaminhados para contracepção cirúrgica eletiva em projeto de Castração, realizado pelo Hospital Veterinário da UFG/Regional Jataí
- ☐ Fonte de obtenção do animal: Animais atendidos no Hospital Veterinário da UFG, unidade Jataí
- ☐ Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação: Serão coletadas amostras, não exigindo a acomodação do animal para esse fim.
- ☐ Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos: há risco baixo de infecções, e serão utilizados EPIs, além de uso de focinheira no animal, e a depender do porte físico dos cães, os mesmos serão contidos por uma ou duas pessoas durante a coleta sanguínea

- ❑ Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa: Não serão utilizados fármacos anestésicos ou analgésicos para a coleta de amostras. Os animais não passarão por privação alimentar.
- ❑ Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Será avaliado o status clínico, fornecimento de tratamento adequado, alimentação, hidratação e abrigo, caso haja necessidade da permanência do animal neste recinto
- ❑ Pontos Finais Humanitários: pontos finais humanitários serão adotados para minimizar o sofrimento do animal durante as coletas:

Será evitado a coleta em animais debilitados que apresentem quadro clínico grave sugestivo de outras doenças, como a raiva, ou que tenham feridas afetando ampla região do tecido cutâneo; 2.

Será evitado a coleta em cães desnutridos; 3. A coleta sanguínea por punção venosa e periférica ocorrerá, preferencialmente em local que não gere desconforto. Portanto, a punção venosa não ocorrerá próximo de locais machucados, incluindo regiões de feridas e de locais que apresentam edema. Consequentemente isto minimizará a dor no animal;

4. Durante a coleta, serão usadas agulhas de menores calibres (25x7mm e 18x0,4mm) para minimizar o desconforto da dor; 5. Sempre, se buscará apenas uma punção venosa com o intuito de reduzir o stress e dor do animal durante o processo de venopunção;

5. Por fim devido à experiência dos médicos veterinários envolvidos neste estudo é esperada a prevenção, ou redução significativa, da dor e stresse, através do conhecimento do comportamento da espécie de animal incluída neste estudo por estes profissionais.

- ❑ Grau de invasividade: GI 1
- ❑ Material utilizado em outros projetos: Não
- ❑ Método de eutanásia: não se aplica
- ❑ Destino do animal: Entrega para tutores

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ❑ Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG: Correto
- ❑ Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: Adequado.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **Aprovado**, smj desta Comissão.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-Jataí o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e

na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08 /10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de

Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é **de até 30 dias** após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **30 de NOVEMBRO de 2020**

VII - Data da reunião: 23/02/2018.

A handwritten signature in blue ink, reading "M. Mendes", is centered on a white rectangular background.

Dra. Mirian Machado Mendes
Coordenadora da CEUA-Jataí

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
Instructions to Authors

1. Scope and editorial policy

The *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (J Vet Diagn Invest) is an international peer-reviewed journal published in English by the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD). JVDI is devoted to all aspects of veterinary laboratory diagnostic science including the major disciplines of anatomic pathology, bacteriology/mycology, clinical pathology, epidemiology, immunology, laboratory information management, molecular biology, parasitology, public health, toxicology, and virology.

1.1. Copyright considerations

JVDI accepts original manuscripts for consideration with the understanding that the same material or a substantial part thereof is not presently being considered for publication or has not been published elsewhere. The Corresponding Author must secure the approval of all authors and institution(s) where the work was carried out. A statement to the Editor confirming that such approval has been received must be included in the submission cover letter.

Upon acceptance for publication, authors will receive a link to the **Contributor Form** to transfer copyright or other suitable arrangement to the publisher. All articles published in JVDI are protected by copyright that covers the translation rights as well as the exclusive rights of AAVLD to reproduce and distribute the articles. JVDI will not publish any manuscript for which the signed Contributor Form has not been submitted. If your manuscript incorporates any previously copyrighted material not in the public domain, you must obtain written reprint permission from the copyright owner and submit a scanned PDF of the permission along with your manuscript files via our online manuscript submission portal (see section 5). No manuscript containing previously copyrighted material will be accepted for review in JVDI without submission of satisfactory proof that copyright permission has been obtained.

1.2. Ethical considerations

1.2.1. Animal welfare

JVDI requires that authors obtain the relevant national/state/institutional approval prior to animal experimentation. In the United States, this means the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC; <https://www.aalas.org/iacuc/laws-policies--guidelines#.VljZmHuq2Fg>) approval for any animal experiment. However, for U.S. National Institutes of Health (<http://oacu.od.nih.gov>) grant-funded studies, in addition to IACUC approval, the following 6 points must be addressed:

1. Provide a detailed description of the proposed use of the animals in the work outlined in the Research Strategy section. Identify the species, strains, ages, sex, and number of animals to be used in the proposed work.
2. Justify the use of animals, the choice of species, and the numbers to be used. If animals are in short supply, costly, or to be used in large numbers, provide an additional rationale for their selection and numbers.
3. Provide information on the veterinary care of the animals involved.

4. Describe the procedures for ensuring that discomfort, distress, pain, and injury will be limited to that which is unavoidable in the conduct of scientifically sound research. Describe the use of analgesic, anesthetic, and tranquilizing drugs, and/or comfortable restraining devices, where appropriate, to minimize discomfort, distress, pain, and injury.
5. Describe any method of euthanasia to be used and the reasons for its selection. State whether this method is consistent with the recommendations of the AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. If not, include a scientific justification for not following the recommendations.
6. Indicate in the text which guideline/law on the care and use of laboratory animals was followed.

Authors are encouraged to register their clinical trials at <http://clinicaltrials.gov> or other suitable databases identified by the ICMJE (http://www.icmje.org/publishing_10register.html).

1.2.2. Plagiarism

JVDI employs the software program iThenticate to detect plagiarism (<http://www.ithenticate.com>). The U.S. Office of Research Integrity defines plagiarism as “copying a portion of text from another source without giving credit to its author and without enclosing the borrowed text in quotation marks” (<http://ori.dhhs.gov/education/products/plagiarism>). ***Detection of plagiarized material in any manuscript will result in its immediate rejection, regardless of its scientific merit.***

1.3. Fees

There is a manuscript-processing fee of \$75 for each printed page published in JVDI. This fee includes black & white photos in the print version and color figures online (if color figures are submitted). Upon acceptance for publication, the corresponding author will receive a **Color Figure Agreement**. Authors are responsible for paying the cost of publishing color figures in the *print* version at the rate of **\$800.00 per page and \$200 for every additional page**. Black & White images do not incur any additional cost.

2. Review and acceptance criteria

Manuscripts will be reviewed by 2 or more persons selected by the Editors on the basis of their expert knowledge and/or experience in the subject matter. Manuscripts must have a clear focus on laboratory diagnostic science in any of the disciplines listed above. Review and acceptability criteria include, but are not limited to, the following:

2.1. Adequacy of format, style, and language (see section 3)

2.2. Novelty of the contents and impact/usefulness to veterinary laboratory diagnosticians

2.2.1. Novelty

JVDI is devoted to the publication of **original** work. It is the responsibility of all authors to review the literature to ensure that work similar to their own has not been previously published before submitting a paper for review. Authors should take note of the following examples:

- The development of diagnostic assays (notably PCR procedures) for pathogens that have existing assays already published in the literature: JVDI will consider these papers if it can be demonstrated that the submitted manuscript constitutes a significant improvement over previously published methodology. Please note that if 1 or more previously described PCR procedures for any given pathogen exist, subsequent submissions will be acceptable for publication only if the authors demonstrate equivalency (or preferably superiority) via a side-by-side comparison between the existing assay and the new assay. The manuscript must also assess important test-related criteria such as sensitivity, specificity, accuracy, robustness, rapidity, throughput, and cost.
- The isolation and/or identification of infectious agents from host species that have previously been described in the literature will be considered if the submitted paper adds impactful new information, such as a new diagnostic method, novel virulence or pathogenicity data, or unique antimicrobial susceptibility information. In contrast, the detection of a well-known pathogen in a new animal species is not considered sufficiently novel information to warrant publication.
- Single case reports will be considered for publication only if they demonstrate excellence in the diagnostic investigation, including a detailed discussion on the differential diagnosis. Preferred submissions would be novel, emerging, or unique case reports; case series summaries; classic diseases that have significantly evolved or changed in some fashion; or demonstration of the usefulness of new technologies to the diagnostic process.

2.2.2. Usefulness and impact

The target readership of JVDI is veterinary laboratory diagnosticians. The contents of manuscripts published in JVDI must be applied science and relevant to the professional activities of this core group. Examples of manuscripts that do not fit within the scope of JVDI include the following:

- Clinically oriented manuscripts regarding therapy and clinical diagnostic techniques (e.g., ultrasonography, radiology).
- Basic science manuscripts (e.g., mapping genes of infectious agents without a practical diagnostic application).

2.3. Adequacy of the experimental design

The experimental design used should be appropriate and adequate. Similarly, the interpretations and conclusions should be valid and supported by statistics where appropriate.

2.4. Adequacy of the title, references, figures, and tables

The title should adequately reflect the contents of the manuscript. References must be as current and complete as possible, but the use of multiple references to back up a single fact should be avoided. Figures and tables should be pertinent to the contents of the manuscript and should not be redundant with information already presented in the text.

3. Manuscript preparation

3.1. General format and style

3.1.1. Layout and media

Three manuscript formats are accepted: Review Articles, Full Scientific Reports, and Brief Communications. Review Articles are strongly encouraged provided they cover subjects of current and broad interest to veterinary laboratory diagnosticians. Authors interested in submitting a Review Article should contact the Editor-in-Chief (editor@jvdi.org). Book Reviews are also welcome and should be emailed to the Editor-in-Chief, and not submitted through SAGE Track.

- ☐ Your main document must be in .doc, .docx, or .rtf format.
- ☐ Main document should include your tables but **must not** include embedded figures.
- ☐ Pages should be numbered at the bottom center.
- ☐ Text lines must be numbered consecutively; page 1 should begin with line #1.
- ☐ Manuscript must be double-spaced *throughout* using Times New Roman and 12-point font size.
- ☐ Figures must be submitted in .tiff and/or .jpg formats only (see section 3.3).
- ☐ Supplemental data should be submitted in .pdf format (see section 3.4).
- ☐ Submit all parts of the manuscript via SAGE Track at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>

3.1.2. Language and style

The American form of English must be used, and manuscripts should be written in a style following the current standards for scientific publications. The Editors will reject manuscripts that do not meet a minimum standard for written English. Only metric units of measurement are acceptable. Abbreviations may be used after first mention with complete spelling. Arabic numerals must be used except when a number begins a sentence, in which case it should be spelled out in full. Centrifugal speed should be expressed in relative centrifugal force ($\times g$) and not in revolutions per minute.

3.2. Detailed layout

3.2.1. Title page. Manuscript page 1: Title of paper, authors' full names (e.g., John D. Doe); name and location of each author's institution(s); name, mailing address, and e-mail of the corresponding author; and a short running title not to exceed 60 characters (including spaces).

3.2.2. Abstract. Manuscript page 2: Abstract should be limited to **250 words or fewer** and written as a single paragraph. It should be factual and concise, yet complete enough to be able to stand alone without reference to the text. State conclusions clearly: "Results are discussed" is unacceptable. *Reference citations must not be used in the abstract.*

3.2.3. Key words. Manuscript page 2: Provide an alphabetical list of key words or phrases not to exceed 80 characters (including spaces). Key words should appear directly below, and on the same page as, the abstract. *Abbreviations should be spelled out.* During online submission, SAGE Track limits the number of key words that can be submitted. This has no bearing on the list included in your manuscript.

3.2.4. Manuscript sections

- *Review Articles*: Introduction, section headings, Acknowledgments (if any), Sources and manufacturers (if any), Declaration of conflicting interests, Funding, References, Tables (if any), and Figure legends (if any). *Review articles should have appropriate section headings and subheadings chosen by the author.*
- *Full Scientific Reports*: Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if any), Sources and manufacturers (if any), Declaration of conflicting interests, Funding, References, Tables (if any), and Figure legends (if any). *Introduction and Discussion should not contain any subheads.*
- *Brief Communications*: body of manuscript (*no section or subheadings*), Acknowledgments (if any), Sources and manufacturers (if any), Declaration of conflicting interests, Funding, References, Tables (if any), and Figure legends (if any).

3.2.5. Sources and manufacturers.

Trade names for commercial test kits, equipment, chemicals, etc., should not be included in the text (unless your article is reviewing a specific brand) but should be listed in full with the appropriate text citation in the Sources and Manufacturers section. Generic names of drugs should be used in the text. In the text, sources should be designated by superscript lowercase letters in sequential order. Under the Sources and Manufacturers heading, sources (including manufacturer's name, city, state, and country if other than the U.S.) should be cited by corresponding lowercase letter in sequential order.

3.2.6. Declaration of conflicting interests.

It is the policy of JVDI to require a declaration of conflicting interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles. Please include any declaration at the end of your manuscript after any acknowledgements and prior to the references, under a heading "Declaration of conflicting interests". If no declaration is made, the following will be printed under this heading in your article:

The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest.

When making a declaration, the disclosure information must be specific and include any financial relationship that all authors of the article has with any sponsoring organization and the for-profit interests the organization represents, and with any for-profit product discussed or implied in the text of the article.

Any commercial or financial involvements that might represent an appearance of a conflict of interest need to be additionally disclosed in the covering letter accompanying your article to assist the Editor in evaluating whether sufficient disclosure has been made within the Declaration of Conflicting Interests provided in the article. For more information please visit the

[SAGE Journal Author Gateway](#).

3.2.7 Authorship

Papers should only be submitted for consideration once consent is given by all contributing authors. The submitting author should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This includes all contributors who:

(i) made a substantial contribution to the concept and design, acquisition of data or analysis and interpretation of data, (ii) drafted the article or revised it critically for important intellectual content, (iii) approved the version to be published.

Please refer to the ICMJE Authorship guidelines at http://www.icmje.org/ethical_1author.html

3.2.8 Acknowledgments

Any acknowledgments should appear first at the end of your article prior to your Declaration of Conflicting Interests (if applicable), any author notes, and your References.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the “Acknowledgments” section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

3.2.9. Funding

Disclose any funding sources, as well as grant numbers. If no outside funding was used, please use the following text:

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Please visit [Funding Acknowledgements](#) on the SAGE Journal Author Gateway for more information.

3.2.10. References

JVDI follows the reference style of the International Committee of Medical Journal Editors Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). In the text, references should be identified numerically with superscript numbers placed after the punctuation mark. *Names of authors should not be used in the text.*

Examples:

Recent studies^{1,3,25} have shown....

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed as previously described.¹⁰

In the Reference list, references should be listed alphabetically (according to the first author's last name) and numbered consecutively. See Appendix A for reference formats.

Authors are responsible for the accuracy of all references. Only published material or accepted manuscripts may be listed in references. *URLs, personal communications, unpublished observations, dissertations, abstract-only citations, meeting/conference/workshop proceedings, and citations from other non-refereed publications are not acceptable references; they must be cited in the text within parentheses. See Appendix A for reference formats.*

3.2.11. Tables

Tables should appear on separate pages following the References. The table title should appear directly above the table. Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals and cited consecutively in the text. All abbreviations must be spelled out using table footnotes. References to footnotes should be indicated by the following sequential symbols (*, †, ‡, §, ¶, #, ¶, **).

3.2.12. Figure legends

Every figure must have a legend. Legends should appear on a separate page following the References or Tables. Identify animal species, organ, or tissue, and describe the figure. Indicate stains and the magnification on light and electron micrographs with a scale bar in the figure and an explanation in the legend. Please notice that scale bar for light microscopic images is not required but it may be used if deemed necessary by the authors.

Example:

Figure 1. Multifocal necrosis in a chicken liver. Hematoxylin and eosin. Bar = 20 µm.

3.3. Figures

It is strongly advised that authors review the following instructions carefully, as *failure to submit figures in the required format and resolution will result in immediate rejection*. Figures must NOT be embedded in the text document, but submitted separately. Single illustrations should be designed for one column. Illustrations with figure panels should be designed to reproduce in 2 columns. Maximum file size should not exceed 5 MB.

- 1-column width is 20 picas or 3.320 inches.
- 2-column width is 41 picas or 6.807 inches.

Acceptable formats are .tiff and .jpg

- minimum acceptable resolution is 300 pixels/inch (120 pixels/cm) for half-tones (i.e., photographs)
- minimum acceptable resolution is 1,200 pixels/inch (480 pixels/cm) for line art (i.e., graphs, charts)

Multiple color figure panels should be grouped into a composite figure, with the individual panels clearly identified (i.e., **A, B, C, etc.**) in Arial in 12 point type, located in the bottom left corner of each image. Figures should be saved as separate files with the figure number (Fig. 1, Fig. 2, Figs 3-5, etc.) as the file name (*figure numbers and/or titles should not appear as part of the image*).

Gross and light microscopic images should be submitted in color if possible. Image modification or enhancement should be limited to that obtainable by ordinary photographic techniques or to adjustment of color balance or contrast by a photo editor software. If the color balance or contrast in your figures is unacceptable, the photo editors may make suitable adjustments. Micrographs cannot contain photographic or tissue artifacts and the images must be evenly lit

with backgrounds of photomicrographs (places where there is no tissue) must be white. Electron micrographs must have a scale bar in the figure; scale bar for light microscopic images may be used if deemed necessary by the authors but are not required. Scale bars should be black or white (depending on the background) and located on the bottom right corner of the image. In gross photographs and photomicrographs, correct anatomic orientation should be maintained (e.g., the surface of the skin should be at the top of the figure, and where possible gross photos should be taken with the head to the right). Grass, surgery drapes, bodily fluids, etc., must be digitally edited out and replaced with a more or less uniform background. Scale bars are acceptable but case numbers or other identification legends are not. **Please submit figures UN-flattened to allow for editing if needed.**

JVDI recommends saving your images as .tiff files with LZW compression. LZW compression will reduce file size (sometimes dramatically) without affecting quality. When you are saving a file such as a .tiff from any package such as Photoshop, you are given the option of compressing the file. LZW compression will speed up the upload and download times and will not affect your image in a negative way.

3.4. Supplemental data

JVDI, through SAGE Publications, is able to host approved supplementary materials online, alongside the full text of articles. Supplementary materials should generally be files that were used to create the research (such as datasets, dendrograms, etc.) or be additional pieces to the article that could not be included in the print version (such as audio/video material that is impossible to produce in print form). For more information, please see:

http://www.uk.sagepub.com/repository/binaries/doc/Supplemental_data_on_sjo_guidelines_for_authors.doc

4. Galleys

The Corresponding Author will receive galley proofs by email from the Sage Production Editor 8–10 weeks before the first day of the scheduled publication month. At the time galleys are sent, an invoice for page charges will also be attached, and payment is expected WITHIN 30 DAYS.

5. New manuscript submission

5.1. Preparing to submit

1. To ensure your browser is supported by SAGE Track, please visit:

http://ssl.salesforce.com/_ui/selfservice/pkb/PublicKnowledgeSolution/d?orgId=00D000000008YVy&id=501000000006EPM

2. Name your files using simple file names and avoid special characters and spaces.

5.2. Submission process

1. Submit all parts of the manuscript via SAGE Track at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>

2. If you have previously submitted or reviewed a manuscript using SAGE Track, use your **User ID** and **Password** to log in.

3. If you have forgotten your User ID and Password, enter your e-mail address to receive an e-mail with your account information.
4. If you are not registered, click on the "Create Account" tab in the upper right-hand corner of the home page and follow the on-screen instructions.
5. Click on the **Author Center**, find the button and click to **submit a new manuscript**, then follow the on-screen instructions. It is useful to have the original text file open so that you can copy and paste into the required fields. You can provide e-mail addresses for up to 20 of your co-authors. **Please note:** the system only allows up to 20 accounts per manuscript. While SAGE Track only allows you to list 20 authors, this does **not** have any bearing on the number of authors you may list on your title page. The system will create accounts for the co-authors you list, thereby allowing them to log in and check the manuscript status.
6. If at any step you need to stop the submission process, click on the "Main Menu" link. Everything you have typed into the system will be saved, and the partially completed submission will appear under "Unsubmitted Manuscripts" in your "Author Center." To return to the submission process you will need to click on the "Continue Submission" button next to the relevant manuscript title.
7. File upload:
 1. Enter individual files using the **Browse** button.
 2. Select the appropriate **File Designation** type (e.g., Main Document, Figure) from the pull-down menu. Choose **Main Document** for your manuscript text file. Choose **Figure** for all illustrations; a confirmation window will appear and you will be prompted to provide a **File Tag** and a **Figure legend** for each figure. The File Tag should be Figure 1, Figure 2, etc. Cut and paste the figure legend from your text file. If you do not want a document to be included as part of the consolidated PDF used for peer review, please designate it as a **Supplementary File**.
 3. Upload your files by clicking on **Upload Files**. This may take several minutes. Repeat these steps until you have uploaded all your files.
 4. Once you have uploaded all files, indicate the **Order** in which they should appear in your paper using the drop-down menu to the left of the file names. Then click **Save**.
 5. Click on **PDF** to view your files in PDF format. This PDF will be used for peer review.
 6. If the files have not uploaded to your satisfaction, click **Save and Go Back** to return to the file upload screen where you can remove or redo the order of the files, and repeat the upload process.
8. When you are satisfied with the PDF, click **Save and Continue**. SAGE Track will check that you have completed all the mandatory fields and that you have viewed the PDF. It will also present you with a summary of all the information you have provided and give you a final chance to edit it. When you have finished reviewing this information click **Submit**.
9. After the manuscript has been submitted you will see a confirmation screen and receive an e-mail confirmation stating that your manuscript has been successfully submitted. *This email will include the assigned manuscript number that will be used in all correspondence.* If you do not see a confirmation screen and/or receive a confirmation e-mail, your manuscript has not been successfully submitted to JVDI and cannot progress to peer review. If this is the case, your manuscript will appear in the "Unsubmitted Manuscripts" section of your "Author Center" awaiting your

attention. Please contact SAGE Track's customer support (434-817-2040, ext. 167) or the Editorial Assistant at editorial@jvdi.org if you encounter problems submitting your manuscript.

10. If you return to the **Author Center**, click on **Submitted Manuscripts** to the left of your screen. Find your manuscript title, and locate the **Status** section. This provides information on your manuscript as it moves through the review process.

6. Revised manuscript submission

1. Go to the SAGE Track home page at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>
2. Use your **User ID** and **Password** to log in.
3. Click on **Author Center**, then **Manuscripts with Decisions**.
4. Locate the manuscript you wish to revise and click **Create a Revision**.
5. Respond to the comments made by the Editor and/or Reviewers. *Important:* All corrections/changes must be detailed in your response to reviewers.
6. Follow the submission process, providing information when prompted.
7. If at any step you need to stop the revised submission process, click on the "Main Menu" link. Everything you have typed into the system will be saved. When you interrupt the revision submission process, your manuscript moves into the "Revised Manuscripts in Draft" in your "Author Center." Click on the link to restart your revision process.
8. Note that all files from your new manuscript submission process are retained by SAGE Track. Therefore, when uploading your revised files, you must first *delete* your original files and replace them with revised versions.
9. After your revision has been submitted, you will see a confirmation screen and receive an e-mail confirmation stating that your manuscript has been successfully revised. This email will include an appended manuscript number (.R1, .R2) that will be used in all correspondence.

7. Help

If you experience any problems during the online submission process, please consult the **SAGE Track online guide** (<http://mchelp.manuscriptcentral.com/gethelpnow/index.html>), which provides detailed submission instructions. The Editorial Assistant at editorial@jvdi.org is also available for assistance.