

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA DE CÃES
INFECTADOS POR *ANCYLOSTOMA* SPP. – ESTUDO
RETROSPECTIVO

BRUNA DOS SANTOS

Botucatu-SP
Setembro 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA DE CÃES
INFECTADOS POR *ANCYLOSTOMA* SPP. – ESTUDO
RETROSPECTIVO

BRUNA DOS SANTOS

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Kiomi
Takahira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Bruna dos.

Avaliação bioquímica e hematológica de cães infectados por *Ancylostoma* spp. - estudo retrospectivo / Bruna dos Santos.
- Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Capes: 50503030

1. Cães - Doenças. 2. *Ancylostoma*. 3. Coinfecção.
4. Eosinofilia. 5. Bioquímica veterinária. 6. Estudos
retrospectivos.

Palavras-chave: Ancilostomose; Canino; Coinfecção;
Eosinofilia.

Nome da autora: Bruna dos Santos

Título: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA DE CÃES
INFECTADOS POR *ANCYLOSTOMA* SPP. – ESTUDO
RETROSPECTIVO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Regina Kiomi Takahira

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Profª Drª Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém

Membro

Programa Pós-graduação Ciência Animal

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Data do exame de defesa: 06 de setembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todos aqueles que estiveram ao meu lado na trajetória da vida acadêmica, sempre tão desafiadora. Em especial, dedico este trabalho à minha mãe Rosilene, que com seu amor tão singelo perseverou ao meu lado, para que eu tivesse oportunidade de fazer o que realmente me faz feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp – campus Botucatu, por tudo que ofereceu como base para minha formação acadêmica, da qual tenho um enorme orgulho. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos recebida durante todo o mestrado (processo 145730/2017-4).

Agradeço à minha orientadora Profa. Regina, com quem tive a imensa sorte de conviver por tantos anos, e com quem tive a oportunidade de aprender mais sobre minhas próprias capacidades, dada sua parceria durante a Residência e Mestrado.

Agradeço ao Professores Hélio Langoni e Jóse Pantoja pelos projetos de iniciação científica, que foram decisivos para que eu continuasse na carreira acadêmica, mas também pelos exemplos de integridade pessoal e valorização da ética no meio científico.

Agradeço à Profa. Elizabeth Schmidt pelo apoio irrestrito para execução desse trabalho, o qual sem seu burilamento estaria com menor rigor e qualidade científica.

Agradeço ao Laboratório Clínico Veterinário, por todo acolhimento e apoio às atividade de Pesquisa, incluindo os funcionários (Adriana, Claudinei, Cris, Márcio e Marcos) pelo auxílio e amizade, aos residentes contemporâneos (Cristiana, Jussara, Fernanda, Ivanio, Nayara e Roberta) por quem trago imenso orgulho e gratidão, e aos pós-graduandos (Brayan, Daniele, Felipe, Lívia, Maurício, Pedrita, Silvia e Tatiana) pela amizade e incentivo. Deixo também minha gratidão a todos com quem tive o prazer de estar nos últimos quatro anos: demais Residentes, alunos de graduação e estagiários.

Aos amigos André e Victor deixo meus sinceros agradecimentos pela convivência quase diária, de muito amor e respeito. Agradeço ainda aos amigos que, por vezes distantes, fizeram parte dessa construção: Annalú, Maíra, Giovanna, Daniele, Nora.

Agradeço à minha família do fundo do coração por todo apoio e esforço, pois embora nunca tivessem estudado em uma Universidade, e pouco conhecessem sobre pesquisa científica, estiveram ao meu lado, me oferecendo suporte emocional e financeiro para que eu tivesse oportunidade de acessar uma

educação de qualidade, quase sempre restrita a pessoas de outros estratos sociais.

Gostaria por último de agradecer ao meu companheiro Heroules pelo apoio irrestrito, carinho e cuidado diários, além das grandes lições de convivência. Obrigada por ser o canal pelo qual tanto amor chega em minha vida.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Characterization of demographic data from canine positive cases for fecal <i>Ancylostoma</i> spp. eggs admitted at Veterinary Teaching Hospital of Unesp, campus Botucatu, from 2009 to 2018.....	42
Tabela 2 -	Characterization of fecal examinations results from canine positive cases for fecal <i>Ancylostoma</i> spp. eggs admitted at Veterinary Teaching Hospital of Unesp, campus Botucatu, from 2009 to 2018.....	43
Tabela 3 -	Disorders (n=102) of the 75 dogs of group B (positives cases for fecal <i>Ancylostoma</i> spp. eggs with concurrent systemic disorders).....	45
Tabela 4 -	Comparison of eosinophil blood count and proportion related to RI among groups A (0), A (1), B (0), B (1) and control group (group C).....	46

CAPÍTULO 3

Tabela 1 -	Comparison of complete blood cell variables between adults dogs with ancylostomosis and the control group (n = 24).....	66
Tabela 2 -	Comparison of serum biochemistry variables between adults dogs with ancylostomosis and the control group (n = 24).....	67

ANEXO I

Tabela 1 -	Intervalo de referência de hemograma para cães maiores de um ano de idade.....	83
Tabela 2 -	Intervalo de referência de bioquímica sérica para cães maiores de um ano de idade.....	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 -	Recomendações gerais para o controle de endoparasitas em cães. Adaptado de ESCCAP (2017).....	12
------------	---	----

CAPÍTULO 2

Figura 1 -	Flow chart of selection of cases included in the study.....	41
Figura 2 -	Frequency quantity of fecal score for <i>Ancylostoma</i> spp. eggs in dogs <1 year (n = 48) and dogs ≥ 1 year (n = 126) simple flotation test.....	44
Figura 3 -	ROC curve for ability of eosinophil blood count to discriminate healthy dogs and dogs with <i>Ancylostoma</i> spp. eggs in feces belonging Group A (0) (without comorbidities associated). Numbers in square brackets represent 95% confidence limits for the AUC.....	46

CAPÍTULO 3

Figura 1 -	Flow chart of the exclusion criteria application.....	66
------------	---	----

ANEXO II

Figura 1 -	Parecer comitê de ética.....	85
------------	------------------------------	----

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
1.1 Introdução.....	2
1.2 Revisão de Literatura.....	3
1.2.1 Ciclo Evolutivo.....	3
1.2.2 Fatores predisponentes.....	5
1.2.3 Prevalência.....	6
1.2.4 Sinais clínicos e achados laboratoriais.....	7
1.2.5 Diagnóstico.....	10
1.2.6 Tratamento e profilaxia.....	11
1.2.7 Implicações da ancilostomose na saúde pública.....	13
1.3 Justificativa.....	14
CAPÍTULO 2	
Normas da revista.....	17
Abstract.....	18
CAPÍTULO 3	
Normas da revista.....	48
Abstract.....	49
CAPÍTULO 4	
4.1 Considerações Finais.....	70
4.2 Referências bibliográficas.....	72
4.3 Anexo I - Intervalos de referência cão.....	83
4.4 Anexos II – Parecer do comitê de ética.....	85

SANTOS, B. **Avaliação bioquímica e hematológica de cães infectados por *Ancylostoma* spp. – estudo retrospectivo.** Botucatu, 2019. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os parasitas do gênero *Ancylostoma* spp. são os helmintos de maior prevalência em cães no Brasil. Os relatos na literatura sobre as alterações hematológicas e bioquímicas, bem como de aspectos clínicos em cães naturalmente infectados por *Ancylostoma* spp. são escassos. O objetivo deste estudo retrospectivo foi avaliar aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos de cães naturalmente infectados por *Ancylostoma* spp., atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ, Unesp–campus Botucatu, no período de 2009 a 2018. Todos os dados foram obtidos a partir dos registros médicos, e um grupo controle foi criado prospectivamente. A presença de ovos de *Ancylostoma* spp. no teste de flutuação simples das fezes foi utilizado para selecionar os casos positivos. A prevalência geral de *Ancylostoma* spp. foi de 12,1% (207/1.715). Somente nos cães com *Ancylostoma* spp. e sem comorbidades (n=35), a mediana da contagem de eosinófilos ($1,05 \times 10^3/\mu\text{L}$) e a proporção de eosinofilia (34,4%) foram maiores que no grupo controle ($0,45 \times 10^3/\mu\text{L}$ e 4,1%, respectivamente). Também nesses cães, a AUC da curva ROC foi significativa (0,72), e ao utilizar ponto de corte de $0,85 \times 10^3/\mu\text{L}$, obteve-se uma sensibilidade de 65,7% e uma especificidade de 70,8%. Nos cães com mais de um ano de idade com ancilostomose clínica (n=23), a diarreia (56,5%) e a hematoquezia (52,2%) foram os sinais mais relatados na anamnese. Houve diminuição significativa ($P<0,05$) na contagem de hemácias, hematócrito, concentrações de hemoglobina e albumina nos cães com ancilostomose em relação ao grupo controle, além do aumento na contagem de leucócitos totais, neutrófilos e eosinófilos. Quando não há comorbidades associadas à infecção por *Ancylostoma* spp., a eosinofilia é capaz de auxiliar na suspeita clínica. Nos cães adultos com ancilostomose, além dos sinais clínicos, também as alterações hematológicas e bioquímicas devem ser ponderadas para fornecer tratamento adequado e eficiente.

Palavras-chave: ancilostomose, canino, eosinofilia, coinfecção

SANTOS, B. **Biochemistry and hematological evaluation of dogs infected with *Ancylostoma* spp. - retrospective study.** Botucatu, 2019. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The parasites of the genus *Ancylostoma* spp. are the most prevalent helminths in dogs in Brazil. Reports in the literature about hematological and biochemical alterations, as well as clinical aspects in naturally infected dogs with *Ancylostoma* spp. are rare. The aim of this retrospective study was to evaluate epidemiological and clinical-pathological aspects of dogs naturally infected with *Ancylostoma* spp., presented at the Veterinary Teaching Hospital of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, Unesp – campus Botucatu, from 2009 to 2018. All data were obtained from medical records, and a control group was set up prospectively. The presence of *Ancylostoma* spp. eggs in feces by simple flotation test was used to select positive cases. The overall prevalence of *Ancylostoma* spp. was 12.1% (207 / 1,715). Only in dogs with *Ancylostoma* spp. and without comorbidities (n = 35), the median eosinophil blood count ($1.05 \times 10^3 / \mu\text{L}$) and the proportion of eosinophilia (34.4%) were higher than in the control group ($0.45 \times 10^3 / \mu\text{L}$ and 4.1%, respectively). Also in these dogs, the ROC curve AUC was significant (0.72), and using a cutoff point of $0.85 \times 10^3 / \mu\text{L}$, a sensitivity of 65.7% and a specificity of 70.8% were obtained. In dogs older than one year old with clinical hookworm disease (n=23), diarrhea (56.5%) and dysentery (52.2%) were the most frequently reported signs in the anamnesis. There was a significant decrease ($P < 0.05$) in red blood cell count, hematocrit, concentrations of hemoglobin and albumin in dogs with hookworm disease when compared to the control group, as well as an increase in leukocyte, neutrophil and eosinophil counts. Only when there are no comorbidities associated with *Ancylostoma* spp. infection, the eosinophilia is able to assist in clinical suspicion. In adult dogs with ancylostomosis, in addition to clinical signs, hematological and biochemical changes should also be considered to provide adequate and efficient treatment.

Keywords: hookworm, canine, eosinophilia, coinfection

1.1 INTRODUÇÃO

Os parasitas intestinais foram muito pesquisados durante o século 20, período em que estudos sobre a patogenicidade, ciclos biológicos e drogas anti-helmínticas passaram por grandes avanços. No entanto, as doenças parasitárias intestinais ainda acometem milhares de seres humanos em regiões de menor poder aquisitivo em todo mundo, figurando na Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018) entre as doenças negligenciadas. Para os cães o panorama não é diferente: animais errantes ou de regiões pouco desenvolvidas apresentam altas prevalências de parasitismo (FERREIRA *et al.*, 2009, KLIMPEL *et al.*, 2010). Aliado a isso, diversas parasitoses intestinais de cães são potenciais zoonoses (DAVID *et al.*, 2015).

No Brasil, as espécies *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* são as responsáveis por causar infecção nos cães (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014). Ambas figuram como parasitas zoonóticos e causam, respectivamente, a enterite eosinofílica e larva *migrans* cutânea em seres humanos (HOTEZ *et al.*, 2004).

O parasitismo pelo gênero *Ancylostoma* é prevalente em cães domiciliados e errantes (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008). Estes helmintos tem uma parte do seu ciclo de vida no solo e após sofrer mudas, podem infectar os hospedeiros por via oral (ingestão das larvas) ou penetração ativa na pele. As larvas imaturas de terceiro estágio (L₃) podem se manter em estado hipobiótico no tecido muscular e parede intestinal de seus hospedeiros, até que um estímulo tal como os hormônios gestacionais façam com que as larvas de *A. caninum* retornem ao seu ciclo evolutivo e causem infecção transmamária (GIBBS, 1986).

O principal mecanismo patogênico deste parasita é a hematofagia. Cada parasita adulto de *A. caninum*, reconhecidamente mais patogênico, pode consumir 0,84 mL de sangue por dia (ANDERSON, 2000). Em cães neonatos e filhotes a ancilostomose pode ser fatal. A anemia e a hipoalbuminemia são os principais achados laboratoriais nesses casos (MOLENTO; FORTES, 2016).

Diversos estudos com infecções experimentais foram realizados em cães, inclusive como modelo para infecção em seres humanos (FUJIWARA *et al.*, 2006; SHEPHERD; WANGCHUK; LOUKAS, 2018). No entanto, os dados na literatura são escassos quanto aos índices hematimétricos, leucograma, provas

bioquímicas e sinais clínicos de cães naturalmente infectados por *Ancylostoma* spp., bem como portadores de doenças sistêmicas associadas.

O objetivo desta dissertação foi avaliar aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais de cães naturalmente infectados por *Ancylostoma* spp. com base em um estudo retrospectivo dos casos atendidos entre os anos de 2009 a 2018 no Hospital Veterinário da FMVZ Unesp, campus Botucatu.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

Os parasitas da superfamília Ancylostomatoidea, particularmente os pertencentes ao gênero *Ancylostoma*, são geohelminths que parasitam diversas espécies de mamíferos, incluindo cães, gatos e seres humanos. O gênero *Ancylostoma* compartilha, com os demais gêneros desta superfamília, a principal característica relacionada com sua patogenicidade: a hematofagia (MOLENTO; FORTES, 2016). Por meio dos dentes e da grande cápsula bucal, alguns estágios larvais e parasitas adultos se fixam na mucosa do intestino delgado para se alimentarem de sangue do hospedeiro (ANDERSON, 2000).

No Brasil, as espécies do gênero *Ancylostoma* que causam infecção intestinal em cães são *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014). O *A. caninum* tem como hospedeiros os cães domésticos e raposas, enquanto que o *A. braziliense* além dos anteriores, tem como hospedeiro definitivo os gatos domésticos (TAYLOR; COOP; WALL, 2017).

1.2.1 Ciclo evolutivo

O ciclo de vida do *Ancylostoma* spp. é direto (não envolve hospedeiros intermediários). São dioicos, apresentam dimorfismo sexual e seu diâmetro pode variar de 12 a 20 mm no *A. caninum* e de 7,5 a 10 mm no *A. braziliense* (TAYLOR; COOP; WALL, 2017).

O ciclo tem início com a postura de ovos pelas fêmeas no lúmen intestinal. Os ovos presentes nas fezes podem eclodir em até cinco dias no ambiente, originando, após duas mudas, as larvas de 3º estágio (L₃ - forma infectante). As L₃ não se alimentam e sua sobrevivência depende de nutrientes armazenados em seus tecidos. Quando em condições ambientais favoráveis, estas podem permanecer no solo por meses até que encontrem um hospedeiro (ANDERSON,

2000). A infecção ocorre por penetração ativa da larva na pele ou pela sua ingestão. Na infecção percutânea, os coxins plantares são uma importante rota de entrada (MITTRA; SASMAL; SINHA, 1984). As L₃ migram por meio de vasos linfáticos até o ducto torácico, chegam à circulação sanguínea e dirigem-se aos pulmões. Nos pulmões desenvolvem a forma L₄ nos alvéolos e migram para brônquios e traqueia. Ao serem deglutidas chegam ao intestino delgado, local em que desenvolvem as formas adultas L₅, responsáveis pela reprodução sexuada e ovoposição. Tanto as formas L₄ quanto L₅ se fixam na mucosa intestinal e fazem espoliação sanguínea. Quando a infecção é por meio da ingestão das larvas, as L₃ podem seguir até os pulmões por meio dos vasos sanguíneos ou continuar no trato digestório, até atingir o intestino delgado. A migração pela traqueia e pulmões leva no mínimo de dois a sete dias. O período pré-patente é de 14 a 26 dias (ANDERSON, 2000). Outros mamíferos, como ratos, gatos domésticos e macaco *Rhesus* podem ser hospedeiros paratênicos do *A. caninum*, com presença de larvas imaturas na musculatura (LEE; LITTLE; BEAVER, 1975).

A hipobiose é uma adaptação que, ao facilitar a persistência das formas larvares por períodos prolongados no hospedeiro, permite ao parasita aguardar melhores condições para retomar o ciclo evolutivo. O fenômeno parece ser comum entre os parasitas nematódeos de animais domésticos e, no caso do *A. caninum*, este evento também ocorre (GIBBS, 1986). Isso possibilita, por exemplo, que cadelas parturientes transmitam via transmamária os parasitas aos neonatos até a quinta semana de vida (BURKE; ROBERSON, 1985). As larvas permanecem na glândula mamária somente durante a lactação, principalmente na primeira semana pós-parto (ANDERSON, 2000). No caso das cadelas, os hormônios da gestação e lactação foram relacionados à saída das L₃ do estado de hipobiose (STOYE; KRAUSE, 1976).

O estado imunológico do hospedeiro é apontado como importante para a entrada das L₃ em latência, pois em animais mais velhos, em que já existe resistência ao parasita, o evento é mais frequente do que em filhotes. No entanto, é bastante discutível quais gatilhos, além da gestação, levariam ao retorno do desenvolvimento de formas adultas no intestino (GIBBS, 1986; ARASU; HELLER, 1999).

Schad e Page (1982) demonstraram que o reaparecimento (tardio) de ovos nas fezes de um hospedeiro tratado com sucesso não representa necessariamente reinfecção, mas uma possível saída de larvas da latência. E mais, outros mecanismos estariam envolvidos na reativação, além da eliminação das formas adultas do intestino, pois as L₃ em hipobiose levaram muito mais tempo do que o período pré-patente para desenvolverem as formas adultas no intestino, após tratamento com anti-helmíntico. Outro fato relevante é que os fármacos anti-helmínticos de rotina são incapazes de eliminar as larvas L₃ em hipobiose. Em um estudo com ratos, drogas como pirantel, fenbendazol, ivermectina e milbemicina foram testadas e nenhuma causou a redução de 90% das larvas em latência, índice considerado ideal. A ivermectina apresentou melhor resposta (80%), no entanto, somente quando administrada em doses altas e repetidas (ARASU, 1998).

1.2.2 Fatores predisponentes

No tocante a susceptibilidade do hospedeiro, existem diferenças no grau de resistência em relação à idade e sexo. A resistência pela idade torna-se aparente aos oito meses de idade nas cadelas e 11 meses nos cães machos (MILLER, 1965).

A imunidade adquirida por contato prévio é eficiente em controlar a carga de parasitas, ou seja, o número de formas adultas no intestino. No entanto, não existe eliminação da infecção (OTTO, 1941). Quando detentores de uma resposta hematopoiética adequada e bom estado nutricional, cães infectados permanecem com a forma assintomática da doença, denominada ancilostomose crônica compensada (BOWMAN, 2014). Em estudo sobre resposta imune intestinal de cães de vida livre da Austrália (*Canis lupus familiaris*, *Canis lupus dingo* ou híbridos) frente à infecções naturais por *A. caninum*, foi possível verificar que os parasitas podem residir na mucosa do intestino sem serem afetados pela resposta imune local, mesmo em hospedeiros que já desenvolveram uma resposta imune protetora (CONSTANTINOIU *et al.*, 2015).

O estresse, doenças graves e uso de corticoides são fatores que podem fazer com que as larvas hipobióticas voltem ao intestino e iniciem uma infecção, provavelmente por imunossupressão (LLOYD; KRISTENSEN; SOULSBY, 1981; TAYLOR; COOP; WALL, 2017). Apesar da maior expectativa de vida dos

animais de companhia e consequente elevação das chances de conviverem com doenças crônicas, como endocrinopatias e neoplasias (PÖPPL *et al.*, 2016), não há estudos que avaliem o impacto da ancilostomose em cães com doenças sistêmicas graves. Os relatos na literatura se restringem apenas à forma clínica denominada ancilostomose crônica descompensada, forma grave e aparentemente incomum da doença, apesar da ausência de dados de prevalência (BOWMAN, 2014).

1.2.3 Prevalência

No Brasil, o gênero *Ancylostoma* spp. figura como o nematódeo de maior prevalência no país. Sua prevalência varia de 6,5% a 95,7%, a depender da população alvo do estudo e a técnica utilizada para detecção da infecção. Altas prevalências são descritas em cães de áreas carentes, cães errantes ou que pertencem a abrigos para animais (FERREIRA *et al.*, 2009, KLIMPEL *et al.*, 2010, DAVID *et al.*, 2015). Diferente do *Toxocara* spp., que tem grande associação com a idade do hospedeiro, o *Ancylostoma* spp. acomete cães de todas as idades apesar da maior susceptibilidade dos mais jovens (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; HEUKELBACH *et al.*, 2012).

Os estudos de prevalência com diagnóstico realizado pela detecção de ovos nas fezes são os mais abundantes e contemplam, mesmo que de forma desigual, as cinco regiões do país. A prevalência em cães domiciliados, no qual as coletas foram realizadas por amostragem em residência nos Estados de Alagoas, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo variou entre 6,0% a 73,7% (LABRUNA *et al.*, 2006, KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009; PRATES *et al.*, 2009; STALLIVIERE *et al.*, 2013; DAVID *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2012; CURI *et al.*, 2017).

Os estudos baseados em registros de exames coproparasitológicos realizados em laboratórios autônomos e Universidades, sendo estes oriundos de Estados como Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, tiveram a prevalência de amostras de fezes positivas para ovos de *Ancylostoma* spp. variando de 6,5 a 48% (ARAÚJO *et al.*, 2006; LORENZINI; TASCA; CARLI, 2007; TORRICO *et al.*, 2008; BALASSIANO; CAMPOS; PEREIRA, 2009; FERREIRA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2016). Em cães

errantes ou resgatados de Goiás, Santa Catarina, Espírito Santo, Sergipe, São Paulo e Amazonas, a prevalência de amostras de fezes positivas para ovos de *Ancylostoma* spp. variou entre 37,5% a 85% (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2010; BLAZIUS *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2009; PEREIRA JUNIOR; BARBOSA, 2013).

Nos trabalhos no qual a necropsia foi a técnica de eleição para colheita de material intestinal, em dois estudos contatou-se a presença de *A. caninum*, com prevalências que variaram de 19,3% a 95,7% (KLIMPEL *et al.*, 2010; HEUKELBACH *et al.*, 2012), realizados em Minas Gerais e Ceará, respectivamente. Já em dois estudos de São Paulo, *A. caninum* foi o mais prevalente (por volta de 60%) e *A. braziliense* ocorreu tanto de forma isolada (aproximadamente 20%) quanto mista com *A. caninum* (cerca de 30%) (BRESCIANI, *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2011). Em cães eutanasiados devido à leishmaniose em Minas Gerais, a prevalência de *A. caninum* foi de 63,4% e de *A. braziliense* de 24,7% (SALDANHA-ELIAS *et al.*, 2019).

O único estudo que utilizou técnicas de biologia molecular para fazer o diagnóstico da infecção a partir dos ovos presentes nas fezes, foi Oliveira-Arbex e colaboradores (2017). Essa pesquisa ocorreu com cães de Pratânia, cidade limítrofe à Botucatu, e foi detectado como infecção mais prevalente o *A. caninum* (61,4%), seguido por infecções mistas com *A. braziliense* (26,1%) e simples por *A. braziliense* (12,5%).

1.2.4 Sinais clínicos e achados laboratoriais

A gravidade da infecção depende da espécie infectante (*A. caninum* é reconhecidamente mais patogênico), e da carga parasitária (GEORGI; LEJAMBRE; RACTLIFFE, 1969; DIAS *et al.*, 2013). Os estágios larvais do *A. caninum* presentes no intestino causam danos ao órgão tanto pela erosão da mucosa do intestino delgado, que pode continuar exsudando proteínas e hemácias mesmo após a retirada do aparelho bucal do parasita, quanto pela hematofagia (STOYE, 1992). Apesar de pouco comum, a penetração e migração das L₃ na pele pode originar quadros de dermatites, principalmente nas patas (URAL; OZYILDIZ; YILMAZ, 2012). As formas clínicas da doença podem ser divididas em hiperaguda, aguda e crônica (BOWMAN, 2014).

A ancilostomose hiperaguda origina-se frequentemente das infecções por via transmamária, na qual a carga de parasitas ingerida pelos neonatos é capaz de levar ao óbito em curto intervalo de tempo (BURKE; ROBERSON, 1985; BOWMAN, 2014). Devido ao baixo peso corporal de neonatos e filhotes, mais de 250 parasitas espoliando sangue podem causar a morte em até sete dias pós-infecção (menor que o período pré-patente, ou seja, sem surgimento de ovos nas fezes). Nas perdas rápidas e intensas de sangue, os sinais de regeneração em resposta à anemia não são detectáveis ao hemograma (LANDSBERG; CROSS, 1935).

Os sinais clínicos da ancilostomose aguda são palidez de mucosa devido à anemia, apatia e diarreia acompanhada de sangue ou muco (KOPP *et al.*, 2007; BRAHMBHATT, 2015). Quadros de dispneia podem ocorrer devido à passagem de larvas pelo pulmão ou causada pela anemia. Nas infecções que perduram por mais tempo, observa-se perda de peso, opacidade do pelo, perda de apetite ou apetite exacerbado. Eventualmente, ocorre emaciação e formação de efusão abdominal devido à hipoalbuminemia (MOLENTO; FORTES, 2016). Na doença aguda costuma-se observar grande quantidade de ovos nas fezes (BOWMAN, 2014). Nesses casos a anemia é inicialmente normocítica normocrômica, passando a apresentar um caráter regenerativo, e podendo apresentar anemia microcítica hipocrômica se houver deficiência de ferro. A eosinofilia pode estar presente e a leucocitose é relatada na presença de grande carga de parasitas (FUJIWARA *et al.*, 2006).

A ancilostomose crônica é em geral assintomática, mas a presença do parasita é detectável pela presença dos ovos nas fezes. Em um estudo com cadelas assintomáticas, observou-se diminuição significativa nas concentrações de albumina e ferro séricos, em comparação com cães hígidos. Além disso, as concentrações séricas de proteína C reativa desses animais tiveram um aumento discreto, indicando um processo inflamatório, possivelmente associado à hematofagia (SCHMIDT *et al.*, 2016).

Uma vez que o sistema imune esteja debilitado, por exemplo por uma doença sistêmica de base, é possível que o cão apresente a forma clínica denominada crônica descompensada ou secundária descompensada. Nesses casos, o quadro do animal é grave, com sinais de anemia moderada e caquexia (BOWMAN, 2014).

Em estudo realizado na Índia com cães naturalmente infectados, formaram-se quatro grupos: dois grupos foram tratados com anti-helmínticos distintos em dose única, um grupo controle composto por cães saudáveis e um último grupo placebo (infectado e não tratado) (DE *et al.*, 2016). Cada grupo continha cinco cães, avaliados nos dias zero, sete e quinze pós-tratamento. Todos os cães parasitados apresentaram uma diminuição significativa do hematócrito em relação ao controle no momento zero, compatível com uma anemia discreta. No grupo placebo, houve uma alteração significativa nas variáveis hematológicas no decorrer de 15 dias: diminuição do hematócrito (30% para 23%), hemoglobina e hemácias, passando de anemia normocítica normocrômica para microcítica hipocrômica. Na avaliação bioquímica sérica, houve diminuições significativas nas concentrações de ferro, albumina e proteína total.

Em outro estudo da Índia, casos atendidos na University Veterinary Clinic-Jabalpur tiveram as fezes avaliadas para diagnóstico microscópico de helmintos (técnica de centrífugo flutuação) e macroscópico para identificação de proglotes de cestódeos. Com base nessas avaliações os casos foram divididos em cães com e sem parasitas, e as variáveis hematológicas comparadas. O helminto mais prevalente foi o *Ancylostoma* spp., e esteve presente em 33 dos 39 animais positivos na técnica de centrífugo flutuação. Os índices hematimétricos, excetuando o volume corpuscular médio (VCM), estavam diminuídos no grupo parasitado. Em relação ao leucograma, o valor relativo de linfócitos estava diminuído e de eosinófilos aumentado (QADIR *et al.*, 2011). No entanto, nenhum dos dois estudos caracterizou os animais selecionados quanto a idade, sexo, sinais clínicos e não descreveram critérios de inclusão e exclusão, o que pode afetar a avaliação hematológica.

Um estudo realizado na Zâmbia avaliou a prevalência de *Ancylostoma* spp. em cães de uma raça local, e aferiu, além de hematócrito, o valor relativo de eosinófilos e proteína total plasmática. Nenhuma das variáveis apresentou diferença significativa entre cães parasitados e não parasitados. A hipótese para justificar os resultados obtidos foi que se tratavam de infecções assintomáticas em cães de área endêmica e que desenvolveram resistência associada à idade (BWALYA; NALUBAMBA; NALUBAMBA, 2014).

Dias e colaboradores (2013) realizaram infecção experimental aguda de *A. caninum* e *A. braziliense* em cães com oito a 15 semanas de idade. A dose de

parasitas inoculada foi baixa e, como previsto, não desencadeou sinais clínicos. Aos 21 dias pós-infecção houve diminuição significativa no número de hemácias e de neutrófilos comparado às contagens antes do parasitismo por *A. caninum*. Na infecção por *A. braziliense* não houve alteração hematológica.

Outro estudo realizou infecção experimental de cães com idade entre 14 a 24 meses, sem exposição anterior ao *A. caninum*. O período de avaliação foi de zero a 120 dias pós-infecção e foi observada uma diminuição da contagem de hemácias/ μL (de cerca de $7,5 \times 10^6$ para $4,5 \times 10^6$), hematócrito (47% para 37%), hemoglobina (16 g/dL para 10 g/dL), e o aumento do VCM, caracterizando uma anemia macrocítica. No leucograma ocorreu aumento da contagem de leucócitos/ μL (cerca de 14×10^3 para 18×10^3), além de aumento relativo de eosinófilos (3% para 14%) e de linfócitos (15% para 25%) (DRACZ *et al.*, 2014).

1.2.5 Diagnóstico

O método comumente empregado para o diagnóstico de parasitoses intestinais são os testes de flutuação dos ovos nas fezes. A técnica de flutuação simples foi descrita na década de 1920 por Willis (WILLIS, 1921), e é amplamente utilizada para detecção de ovos de helmintos. De caráter qualitativo, a técnica baseia-se na elevação da densidade da solução até uma gravidade específica, por meio da adição de cloreto de sódio, o que permite que os ovos flutuem, em detrimento de outros componentes das fezes que precipitam.

Como desvantagens, é preciso apontar a impossibilidade de diferenciar os parasitas da superfamília Ancylostomatoidea em nível de espécie por meio da morfologia dos ovos, referindo-se comumente como ovos de *Ancylostoma* spp. Um estudo mensurou o comprimento e largura dos ovos de *A. caninum* ($63,92 \pm 5,28 \mu\text{m}$ e $39,21 \pm 1,52 \mu\text{m}$) e *A. braziliense* ($53,03 \pm 2,33 \mu\text{m}$ e $36,3 \pm 1,35 \mu\text{m}$), de 20 amostras de fezes de cães e gatos, e afirmou ser possível diferenciar as duas espécies em microscopia óptica quando realizada por profissional experiente (LUCIO-FOSTER *et al.*, 2012). No entanto, essas diferenças de tamanho variaram consideravelmente em levantamento bibliográfico realizado neste mesmo trabalho. Portanto, a verificação quanto a reprodutibilidade desses resultados precisaria ser feita para validar seus achados.

Com a finalidade de diferenciação a nível de espécie, pode-se realizar a coprocultura ou identificação dos parasitas adultos em necropsia. Outra

desvantagem é que as infecções hiperagudas podem ter resultado negativo no exame coproparasitológico, pois, apesar da grande quantidade de parasitas no intestino, estes não concluíram sua maturação (MOLENTO; FORTES, 2016). As técnicas mais modernas de diagnóstico têm se mostrado sensíveis na detecção de infecção e eficientes na identificação das espécies dos parasitas, como as técnicas de ELISA e PCR (ADOLPH *et al.*, 2017; OLIVEIRA-ARBEX *et al.*, 2017).

1.2.6 Tratamento e profilaxia

De acordo com as diretrizes do European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP, 2017), a frequência do uso de anti-helmíntico e da realização de exame coproparasitológico é dependente da exposição do animal à situações que levam a um maior risco de infecção, como apresentada em linhas gerais na Figura 1. A resistência e até mesmo multirresistência aos anti-helmínticos já foi reportada em parasitas da espécie *A. caninum* (KOPP *et al.*, 2007, KITCHEN *et al.*, 2019). O uso indiscriminado dessas drogas permite a seleção de parasitas resistentes e neste contexto, a realização do exame coproparasitológico com a frequência sugerida na figura 1 é recomendada como uma alternativa ao tratamento preventivo (ESCCAP, 2017).

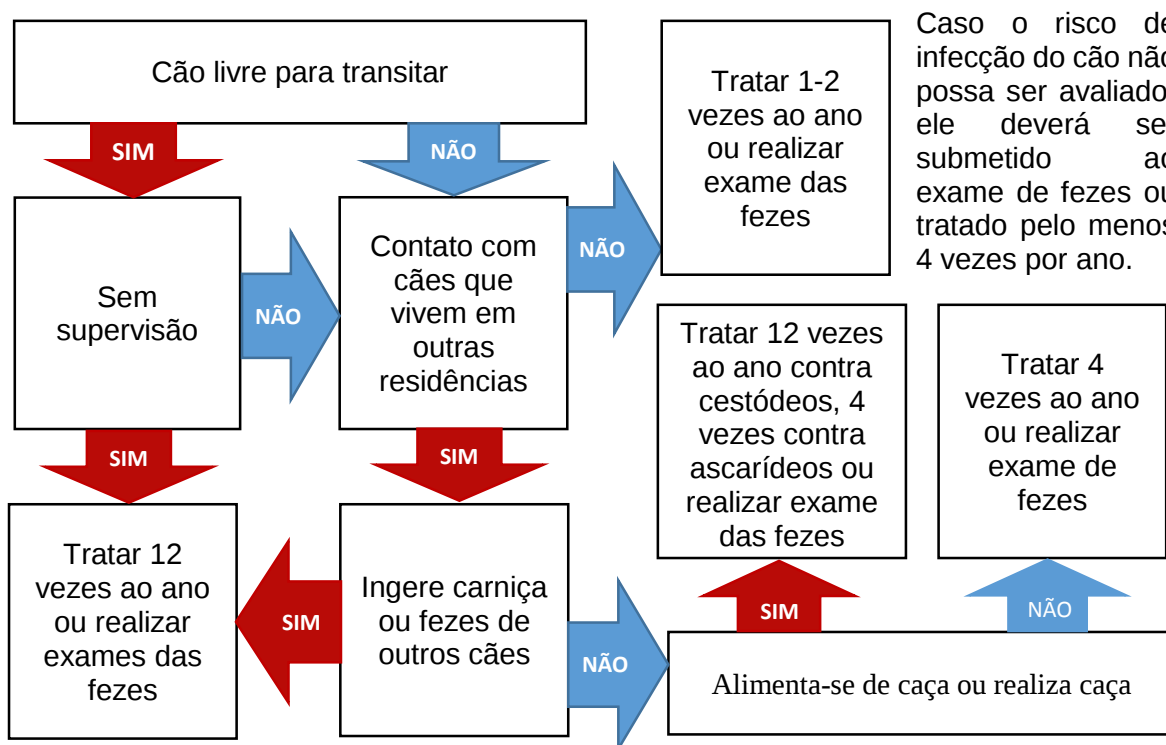


Figura 1. Recomendações gerais para o controle de endoparasitas em cães. Adaptado de ESCCAP (2017).

O Tropical Council for Companion Animal Parasites (2018) preconiza que os filhotes sejam tratados preventivamente com anti-helmínticos adequados para essa faixa etária na segunda, quarta, sexta e oitava semanas de idade. A cadela deve ser tratada ao mesmo tempo que os filhotes. Os princípios farmacológicos indicados são fembendazol, oxbendazole, pirantel, ivermectina, selamectina, milbemicina e moxidectina (CASTRO, 2015; TCCAP, 2018). As medidas profiláticas frente à contaminação ambiental são imprescindíveis. A desverminação dos cães, além do descarte diário e adequado das fezes são medidas simples e eficazes. A falta de conhecimento dos tutores a respeito das parasitoses e suas consequências para saúde dos cães e dos seres humanos continua sendo ainda hoje um grande empecilho para prevenção e controle eficazes (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008).

1.2.7 Implicações da ancilostomose na saúde pública

Muito do que atualmente se conhece da fisiopatogenia e interações parasita-hospedeiro nas infecções por *A. caninum* surgiu pela utilização de cães como modelo experimental para infecção em seres humanos (FUJIWARA *et al.*, 2006). As espécies da superfamília Ancylostomatoidea responsáveis por parasitar o trato intestinal dos seres humanos são *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*. Estes possuem notória proximidade filogenética com *A. caninum*. Além disso, *A. caninum* e *A. duodenale* são muito similares, pois ambos possuem formas hipobióticas, ciclo fecal-oral, transmissão transmamária e período pré-patente semelhantes (SHEPHERD; WANGCHUK; LOUKAS, 2018). Apesar das limitações do uso dos cães como modelo para ancilostomose, tanto pela questão ética devido à eutanásia dos cães nos experimentos, como por diferenças imunológicas frente à infecção, seu uso ainda é visto como promissor na pesquisa translacional (FUJIWARA *et al.*, 2006; SHEPHERD; WANGCHUK; LOUKAS, 2018).

A despeito de todo conhecimento gerado a respeito do tema, em regiões como o continente asiático, África subsaariana e América do Sul e Central, a pobreza e a falta de saneamento básico acarreta em cerca de 500 milhões de seres humanos infectados, principalmente crianças (LOUKAS *et al.*, 2016). Ainda que o tratamento anti-helmíntico seja efetivo no controle das infecções, as parasitoses intestinais se encontram na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (HOTEZ *et al.*, 2004; WHO, 2018).

O *A. caninum* e *A. braziliense* podem infectar o homem, causando zoonoses como a larva *migrans* cutânea (*A. braziliense* principalmente) e enterite eosinofílica, quando ocasionalmente o *A. caninum* atinge o intestino do ser humano (BOWMAN *et al.*, 2010). O *A. ceylanicum*, apesar de não ter sido descrito no Brasil, desenvolve suas formas adultas no intestino de cães domésticos, gatos, seres humanos (YOSHIDA; OKAMOTO; CHIU, 1968; SMOUT, 2017) e cães selvagens na Austrália (SMOUT *et al.*, 2013); sendo considerada uma zoonose negligenciada (INPANKAEW *et al.*, 2014). Em estudo realizado em um distrito com poucos recursos em Manaus-AM, a prevalência de larva *migrans* cutânea foi de 8,2%, e foi associada, entre outros fatores, com a pobreza (REICHERT *et al.*, 2016).

A contaminação de áreas públicas por ovos e larvas de *Ancylostoma* spp. é uma realidade no Brasil. As pesquisas em praças, caixas de areia, creches e praias, tanto de fezes de cães quanto do solo, demonstraram que o gênero *Ancylostoma* aparece com alta prevalência, sendo por vezes apenas superado por ovos de *Toxocara* spp. (SANTARÉM; SARTOR; BERGAMO, 1998; GUIMARÃES *et al.*, 2005; MANDARINO-PEREIRA *et al.*, 2010; CASSENOTE *et al.*, 2011; ALVES; COELHO; COELHO, 2014; SPRENGER; GREEN; MOLENT, 2014; BARROS *et al.*, 2018, BRICARELLO *et al.*, 2018). Em estudo que avaliou a contaminação em praças de Botucatu entre 2017 e 2018, a presença de ovos de *Toxocara* spp. teve prevalência de 20%. Já para os ovos de Ancylostomatidae, a prevalência foi por volta de 3% do total de praças analisadas (PROVIDELO, 2019).

Diante do panorama exposto, fica evidente que o conceito de *One Health*, no que tange a saúde humana, animal e o ambiente, deve ser considerado (LERNER; BERG, 2017). Os cães e seres humanos compartilham o mesmo ambiente e convivem de forma muito próxima, na sociedade atual. A educação em saúde é capaz de assegurar a sanidade e bem-estar dos cães, e estes por sua vez contaminarão menos o ambiente, acarretando menor quantidade de casos de zoonoses e novos cães infectados.

1.3 JUSTIFICATIVA

Os dados hoje disponíveis na literatura são escassos a respeito dos achados laboratoriais e clínicos nas infecções naturais por *Ancylostoma* spp., que podem auxiliar no seu diagnóstico e na compreensão da patogenicidade. Apesar da baixa letalidade, as infecções ocorrem em cães de qualquer faixa etária com elevadas prevalências e existem prejuízos aos hospedeiros mesmo em infecções assintomáticas. Além disso, não se conhece o quanto essas infecções contribuem para a piora do estado geral de cães com doenças sistêmicas graves ou de pacientes geriátricos.

O Brasil possui condições ambientais que favorecem o ciclo do parasita, além das baixas condições socioeconômicas que auxiliam a sua perpetuação. Portanto, as parasitoses intestinais dos cães precisam de mais atenção, tanto por parte da classe médica veterinária, como dos tutores, não somente por suas

implicações em saúde pública, mas também por comprometer a saúde e bem-estar dos cães.

Trabalho a ser enviado para a revista “Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports”. Link de acesso para instruções de formatação de artigos científicos: <https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology-regional-studies-and-reports/2405-9390/guide-for-authors>

1 **Epidemiological aspects of *Ancylostoma* spp. naturally infected**
 2 **dogs and eosinophil blood count in São Paulo State, Brazil.**

3 Bruna dos Santos ^a, Amanda Nogueira Ferreira da Silva^a, Silva Eugenia
 4 Vargas Mora^a, Vitoldo Antônio Kozłowski Neto^a, José Carlos Figueiredo Pantoja^b,
 5 Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt^a, Regina Kiomi Takahira^{a,*}.

6 ^a Department of Veterinary Clinics, São Paulo State University (Unesp), School
 7 of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo, Brazil.

8 ^b Department of Veterinary Hygiene and Public Health, São Paulo State
 9 University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu,
 10 São Paulo, Brazil.

11 *Corresponding author: R.K. Takahira. E-mail adress: regina.takahira@unesp.br.
 12 Tel.: +55 (14) 3880-2057. Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ UNESP -
 13 campus Botucatu. Av. Prof. Walter Mauricio Correa s/n., CEP 18618-681, Caixa
 14 Postal 560 Botucatu, SP, Brasil.

15 E-mails addresses: brunasantos.vet@hotmail.com (B. Santos),
 16 amanda.nogueirafs@gmail.com (A.F.N. Silva), sevm201@gmail.com (S.E.V.
 17 Mora), vitoldoneto@gmail.com (V.A. Kozłowski-Neto), jose.pantoja@unesp.br
 18 (J.C.F Pantoja), elizabeth.schmidt@unesp.br (E.M.S. Schmidt)

19 **Abstract**

20 *Ancylostoma* spp. is the most prevalent canine nematode parasite in Brazil.
 21 Despite its high prevalence in juveline dogs, infections may occur at any age.
 22 Eosinophilia is finding in experimental infections; however, it is not commonly
 23 seen in naturally infected dogs examined in routine clinical practise. The aim of

24 this retrospective study was to investigate the prevalence of *Ancylostoma* spp.
25 and the eosinophils blood counts in naturally infected dogs, with or without
26 comorbidities, attended at the Veterinary Teaching Hospital of the School of
27 Veterinary Medicine and Animal Science, Unesp campus Botucatu-Brazil, from
28 2009 to 2018. All data as gathered from veterinary medical records (VMR) and a
29 control group was prospectively created. Eosinophil blood counts were executed
30 if fecal samples were positive for *Ancylostoma* spp. eggs, which were excluded
31 when the interval of days between complete blood count and simple flotation test
32 exceeded seven days, or when VMR lacked in information regarding case history
33 or physical examination. Based on VMR, positive cases for *Ancylostoma* spp.
34 were distinguished as single intestinal parasite infection (group A) and concurrent
35 systemic disorders (group B), and such as group with (1) or without (0) intestinal
36 parasitic coinfections (IPC). The overall prevalence of *Ancylostoma* spp. was
37 12.1% (207/1,715) and a decreased prevalence was noticed from 2009 to 2013
38 (13.9%) and from 2014 to 2018 (9.6%). IPC was observed in 44.9% (93/207) of
39 positives cases of fecal *Ancylostoma* spp. eggs, and dogs <1 year had higher
40 quantity of fecal eggs and IPC in comparison to dogs ≥1 year old. Infected dogs
41 without systemic diseases or IPC (group A [0]; n=35) presented median
42 eosinophil blood counts ($1.05 \times 10^9/L$) and eosinophilia ratio (34.4%) significantly
43 higher ($P < 0.05$) than the ones observed in the control group ($0.45 \times 10^9/L$ and
44 4.1%, respectively). In groups A (1) (n=20), B (0) (n=39), and B (1) (n=36), there
45 were no significant differences ($P > 0.05$) when compared to the control group.
46 Only for the group A (0) had significantly AUC (0.72) in ROC curve. Considering
47 a $0.85 \times 10^9/L$ cutoff, sensitivity and specificity were, respectively, 65.7% and
48 70.8%. Only in cases where there are no associated comorbidities with

49 *Ancylostoma* spp. eggs in feces the eosinophilia is pronounced to an extent that
50 could aid in clinical suspicion. In other situations, information concerning
51 prevalence of *Ancylostoma* spp. as well as the epidemiological findings are
52 mandatory towards proper diagnosis of the parasitism, which can be confirmed
53 by fecal examinations.

54 **Keywords:** hookworm, canine, prevalence, eosinophilia, coinfection

55

56 **Abbreviations:**

57 **IPC:** intestinal parasitic coinfection

58 **RI:** reference interval

59 **VMR:** veterinary medical records

60

61 **Highlights:**

- 62 • Experimental acute infections with *Ancylostoma* spp. in dogs result in
63 eosinophilia
- 64 • Natural hookworm infection without comorbidities have higher proportion
65 of eosinophilia
- 66 • Dogs with concurrent disorders and hookworm have eosinophil count
67 similar with health dogs

68

69 **1. Introduction**

70 In Brazil, the genus *Ancylostoma* spp. is the most prevalent canine
71 nematode parasite found in fecal examinations and necropsy (Oliveira-Arbex et
72 al., 2017; Bricarello et al., 2018; Saldanha-Elias et al., 2019). *Ancylostoma*

73 *caninum* and *Ancylostoma braziliense*, indistinguishable by egg morphology, are
74 species belonging to the Ancylostomatoidea Superfamily responsible for causing
75 infection in dogs in the national territory (Dantas-Torres and Otranto, 2014). Both
76 are zoonoses and cause eosinophilic enteritis and cutaneous larva migrans in
77 humans, respectively (Loukas et al., 2016).

78 The pathogenicity of *Ancylostoma* spp. is mostly related to hematophagy
79 that leads to intense blood loss (Bowman, 2014), and gastroenteric changes,
80 which result in diarrhea and dysentery (Kopp et al., 2007). Newborn dogs and
81 puppies are of most susceptibility and may face deep intestinal hookworm
82 infections. Because of profound blood spoliation, anemia and death are potential
83 outcomes from the parasitism (Landsberg and Cross, 1935; McKenna et al.,
84 1975). Unlike *Toxocara* spp., which significantly associates with host age,
85 *Ancylostoma* spp. affects dogs at any age, in spite of the greater susceptibility of
86 juvenile dogs (Katagiri and Oliveira-Sequeira, 2008; Gates and Nolan, 2009).

87 After a phase of paramount susceptibility, that matches the development
88 of an efficient immune response to the parasitism, adult and elderly dogs may
89 become chronically infected and asymptomatic (Constantinoiu et al., 2015;
90 Schmidt et al., 2016). *Ancylostoma* spp. infections could occur combined with
91 other intestinal parasites (Ferreira et al., 2013), as well as with systemic diseases
92 (Bowman, 2014).

93 Eosinophils are cells whose primary function is to defend the host against
94 relatively large organisms, such as helminths (Behm and Ovington, 2000).
95 Eosinophilia is a frequent laboratory finding in acute experimental infections by
96 *Ancylostoma* spp. (Hotez et al., 2002, Fujiwara et al., 2006, Dracz et al., 2014),
97 however that is not always observed on clinical routine basis in natural infections.

98 This could be related not only to the chronic aspect of the *Ancylostoma* spp.
99 infection itself (Carroll and Grove, 1984), but also to the endogenous rise of
100 corticosteroids induced by stress and inflammatory disease, resulting in a
101 diminished circulating eosinophils in peripheral blood (Young and Meadows, 2010;
102 Stockham and Scott, 2011).

103 The aim of this retrospective study was to investigate the prevalence of
104 *Ancylostoma* spp. and the eosinophil blood counts in naturally infected dogs, with
105 or without comorbidities, attended at the Veterinary Teaching Hospital of UNESP,
106 campus Botucatu-Brazil, from 2009 to 2018.

107

108 **2. Material and methods**

109 *2.1 Prevalence and definition of positive case*

110 All dogs in the study were attended at the Veterinary Teaching Hospital of
111 UNESP, campus Botucatu, from June 2009 to June 2018. The data gathered in
112 the study came from veterinary medical records (VMR). Owner consent was
113 previously in order to access VMR information. The number of simple flotation
114 tests in canine feces, dates from when each test was performed, their respective
115 results and age of the dogs at the time of tests were used to calculate prevalence.
116 Age categories and subcategories were: dogs <1 year (0-5.9 months and 6-11.9
117 months) and dogs $\geq$ 1 year (1 to 7.9 years and >8 years). Prevalence results from
118 simple flotation tests in which the sample was insufficient for analysis were
119 excluded from prevalence calculations. When a new simple flotation test was
120 performed within 30 days for the same dog, it was not included in the study.

121 Ongoing infections by *Ancylostoma* spp. were defined eggs belonging to
122 the Ancylostomatoidea superfamily were detected in canine feces by the simple

123 flotation method. VCM provided information regarding gender, breed, age, city of
124 origin, results from fecal examinations (simple flotation and centrifugal-flotation
125 methods) and quantity of fecal eggs score of *Ancylostoma* spp.

126 Comparisons among *Ancylostoma* spp. eggs scores, presence of
127 intestinal parasitic coinfection (IPC) and parasites involved with IPC were realized
128 between dogs <1 year (juvenile) and dogs ≥ 1 year (adults). Were excluded dogs
129 without informed ages on VMR.

130

131 *2.2 Analysis of eosinophil blood count*

132 *2.2.1 Exclusion criteria*

133 Positive cases for fecal *Ancylostoma* spp. eggs were excluded when time
134 elapsed from complete blood count and simple flotation test exceeded a seven
135 days intervals. Missing medical history or physical examination findings in VMR
136 were also exclusion criteria. Reference interval (RI) eosinophils in blood count
137 was set at $0.10\text{--}1.25 \times 10^9$ eosinophils/L (Jain, 1993).

138 *2.2.2 Experimental groups and criteria for the control group*

139 Based on VMR, confirmed infections for *Ancylostoma* spp. were divided in
140 intestinal parasitic infection (group A) or concurrent systemic disorders (group B).
141 Groups A and B were splitted in cases with (1) or without IPC (0).

142 A prospective control group (group C) was designed to further evaluate
143 eosinophil blood count from naturally infected dogs with *Ancylostoma* spp.
144 Analysis from all three groups were performed by means of the same
145 standardized techniques and were conducted at the same laboratories. The
146 control group was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation
147 (Protocol 0074/2019).

148 Inclusion criteria for the control group were: male or female dogs from
 149 Botucatu, over 15 kg (blood donors included), from one to 8.9 years old, up to
 150 date with polyvalent and rabies vaccination, without clinical history of diseases
 151 within the last two months and negative results in simple flotation and centrifugal-
 152 flotation tests. Dogs facing thrombocytopenia (total platelet count below
 153 160,000/ μ L)(Meyer and Harvey, 2004) or ELISA positive either *Ehrlichia* sp.,
 154 *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp. or *Dirofilaria immitis* in SNAP 4 Dx Plus®
 155 (IDEXX Laboratories, Maine, USA) without negative test in PCR, were excluded
 156 from the control group

157 2.3 Laboratory evaluations

158 Complete blood count was performed at the Veterinary Clinical Pathology
 159 Laboratory of the Veterinary Teaching Hospital. Blood cell counts were
 160 accomplished by automated hematological analyzers Hema-Screen18 (Ebram
 161 Produtos Laboratoriais Ltda, SP, Brazil) from 2009 to 2014 and PochH-100iVDiff
 162 (Sysmex Corporation, Chou-ku, Kobe, Japan) ever since 2014. Differential
 163 leukocyte count in 100 cells was manually performed by blood smear evaluation
 164 in optical microscopy (1,000x magnification).

165 Sodium chloride saturated salutation (simple flotation) (Willis, 1921) and
 166 centrifugal-flotation with zinc sulphate (Faust et al., 1938) were performed at the
 167 Laboratory of Parasitic Disease of Animals at the Veterinary Teaching Hospital.
 168 Although the simple flotation method is a qualitative one, the Laboratory of
 169 Parasitic Disease of Animals determined a semi quantitative score for the
 170 presence of eggs in feces, as follow: most microscope fields of view without eggs
 171 = rare, most of the fields of view with eggs = 1+, all fields of view with 1 - 5 eggs
 172 = 2+, and all fields of view with > 5 eggs = 3+. Such semi quantitative appraisal

173 was carried out in optical microscopy of 40x magnification, using 24x24 mm cover
174 glass.

175 2.4 Data analysis

176 The GraphPad Version 8 software (GraphPad Software Inc., San Diego,
177 CA, USA) provided statistical analysis. The Shapiro-Wilk test was used for
178 normality evaluation. The median, 25% and 75% percentiles, and range were
179 used to represent the nonparametric data set. Medians were compared by
180 Kruskal-Wallis test, and analysis of proportions were measured by Chi-squared
181 or Fisher tests. The ROC curve was performed to evaluate the sensitivity and
182 specificity of the eosinophil blood count of dogs infected by *Ancylostoma* spp. in
183 order to compare with the control group. The statistical significance was set at P
184 <0.05.

185

186 3. Results

187 Of the 1,529 dogs samples underwent simple flotation test, 199 were
188 positive for *Ancylostoma* spp. at least once during the nine years of observation,
189 which corresponds to 13.0% of prevalence. Of these dogs, six have had two
190 positive tests and one dog has had three positive tests, with median time elapsed
191 between positive results of 570 days. The prevalence of positive cases of
192 *Ancylostoma* spp. eggs in feces was 12.1% (207/1,715). Figure 1 shows the
193 numbers of simple flotation tests, number of cases investigated and positive
194 cases for *Ancylostoma* spp. eggs.

195 Prevalence of positive infections by *Ancylostoma* spp. was higher (P
196 <0.01) from years 2009 to 2013 (13.9% - 135/972) than for the 2014 to 2018
197 period (9.6% - 72/743). Only 1,587 out of 1,715 investigated cases were provided

198 with age information in VMR. There was no significant difference in the
 199 prevalence of dogs < 1 year (10.7% - 51/478) and $\geq$ 1 year (11.7% - 130/1,109).
 200 However, an 8.2% (28/341) and a 16.8% (23/177) prevalence ($P < 0.01$) was
 201 detected in dogs of 0-5.9 and of 6-11.9 months old, respectively.

202 All 207 detected cases of *Ancylostoma* spp. were characterized by gender,
 203 age, breed, city of origin, fecal egg score, presence or absence of IPC and its
 204 corresponding parasite identification (Table 1 and Table 2). The proportion of
 205 dogs with mixed-breed and pure breeds were similarly infected and the most
 206 commonly parasitized breeds were Poodle (20/102), Pitt bull (15/102), German
 207 shepherd (10/102), Labrador (7/102), Cocker spaniel (5/102), Border collie
 208 (5/102), and Shih tzu (4/102). The centrifugal-flotation test was performed in
 209 98.1% (203/207) of the samples, and two of these had previously been detected
 210 with IPC in the simple flotation test. In 45.6% (93/205) of the samples there were
 211 other intestinal parasites identified.

212 Dogs <1 year old experienced IPC more frequently (58.5% - 30/51) than
 213 did dogs $\geq$ 1 year old (38.5% - 50/130) ($P = 0.02$). Coinfections with *Giardia* spp.,
 214 *Cystoisospora* spp. and *Toxocara* spp., were observed to happen in 19.6%
 215 (10/51), 17.5% (9/51,) and 17.5% (9/51), respectively, of dogs <1 year old, and
 216 in 15.4% (20/130), 18.5% (24/130) and 4.5% (6/130), of dogs $\geq$ 1 year old. Only
 217 *Toxocara* spp. eggs were identified in a meaningly higher prevalence ($P = 0.01$)
 218 in dogs <1 year old .For analysis of the quantity score of *Ancylostoma* spp. eggs,
 219 48 dogs <1 year and 126 dogs $\geq$ 1 year were used. Seven cases were excluded
 220 because the VMR data did not provide the *Ancylostoma* spp. eggs score. In dogs
 221 $\geq$ 1 year there was no difference ($P > 0.05$) in the proportion between the different

222 scores. In dogs <1 year old, the 3+ score was significantly higher than the rare
223 and 2+ scores (Figure 2).

224 Control group (group C) comprised 10 female and 14 male dogs, including
225 Labrador retriever (4), Golden retriever (2), English pointer (2) and Chow chow
226 (2). Other breeds had only one representative each and six were mixed-breed.
227 The median age was three years old and the weight was 32.5 kg (15-60 kg).

228 Out of 130 cases of *Ancylostoma* spp eggs in feces selected for eosinophil
229 blood count, 75% had complete blood count been carried out on the same day of
230 the simple flotation test, 18% on one to two days previously and the remaining
231 7% on three to six days prior to the simple flotation test. Among these 130, 55
232 had no concurrent systemic disorders (group A) and 75 had evidence of
233 concurrent systemic disorders according to VMR (group B). In group B, 102
234 disorders were reported (Table 3), given that 54 dogs endured single disorders,
235 15 suffered from two and six bore three distinct ongoing disorders. The
236 eosinophil blood count was compared between groups A and B, with (1) and
237 without IPC (0), and up against control group (Table 4). Only group A (0) (without
238 IPC or systemic disorders) faced higher median eosinophil counts in comparison
239 with group C. Group A (0) also had a lower proportion of eosinopenia and higher
240 eosinophilia compared with group C.

241 In ROC curve analysis, only group A (0) had a number of eosinophils with
242 a distinct distribution from the control group, with the area under the curve (AUC)
243 of 0.72 (95% CI - 0.59 to 0.85) (Figure 3). By setting the cutoff at $0.85 \times 10^9/L$,
244 the sensitivity and specificity was 65.7% and 70.8%, respectively. Therefore, at
245 eosinophil blood count above $0.85 \times 10^9/L$, the probability of identifying true
246 positives for *Ancylostoma* spp. eggs is 65.7%, whereas the probability of a true

negative for *Ancylostoma* spp. eggs go undetected is 70.8%. With the cutoff point of $0.85 \times 10^9/L$, the likelihood ratio of sensitivity was 2.25.

4. Discussion

The overall prevalence of positive cases (12.1%) similar to those observed in retrospective studies at Veterinary Teaching Hospitals in São Paulo (7.1%) (Ferreira et al., 2016) and Londrina (6.2%) (Ferreira et al., 2013), as well as prospective investigations from private practices in Rio de Janeiro (15.7%) (Balassiano et al., 2009) in from 2005 to 2014, 2008 to 2011, and 2003 to 2004, respectively. There was a decreased of prevalence of 13.9% (2009 to 2013) to 9.6% (2014 to 2018) in our study. Ferreira et al. (2016) also found a decrease in the frequency of *Ancylostoma* spp. from 1991 to 2014 in São Paulo. However, a retrospective study with data from our Laboratory of Parasitic Disease of Animals from 2002 to 2006, reported a prevalence 38% for *Ancylostoma* spp. eggs in canine feces (Torrico et al., 2008), whereas domiciled dogs from medium class districts of Botucatu in the years 2004 and 2005 had prevalence of 18,2% (Katagiri and Oliveira-Sequeira, 2008). Therefore, prevalence is more probably related to the target dog population, than to the evaluation year. Prevalence in the Veterinary Teaching Hospital UNESP Botucatu has been decreasing since 2002.

The prevalence regarding age was similar between the compared categories, but between the subcategories 0-5.9 months and 6-11.9 months, the proportion in the latter was twice higher. Both subcategories are susceptible to infections, but this difference may have occurred because in newborns and pups infections could have rapid and intense blood loss before parasites had

completed the pre-patent period (Landsberg and Cross, 1935). In this context, simple flotation tests may have false negative results (Taylor et al., 2017). In addition, severe cases of parasitism in puppies are common, which could lead to concerns about anthelmintic treatment in this age group. The maintenance of the prevalence of infection in adult and elderly dogs, as well as the results of the seven dogs that presented more than one positive test during the study period, may have been caused by reinfection or the resumption of development of hypobiosis larvae (Schad and Page, 1982; Gibbs, 1986). A similar condition was reported by Katagiri et al. (2008) in dogs under one year old with a prevalence of positive samples compared to adults. In the study by Ferreira et al., (2016) being older than one year was significantly related to a higher prevalence of positive *Ancylostoma* spp. eggs samples. However, there are controversies and numerous studies point to a higher proportion of infections in dogs below one year old (Oliveira-Sequeira et al., 2002; Balassiano et al., 2009; Gates and Nolan, 2009).

Dogs ≥ 1 year old had no differences among scores, whereas dogs < 1 year presented a gradual increase in the scores. The 3+ score was significantly higher than the rare and 2+ scores. There is a relationship between the number of eggs and the number of parasites, with a decrease in the number of eggs and the chronicity of the infection (Carroll and Grove, 1984). Therefore, apparently juvenile dogs had a higher proportion of acute infections and for this reason higher egg count was observed.

Out of the 207 positive cases of *Ancylostoma* spp. eggs in feces, IPC was noticed in 45.6% samples. In a study conducted at Southern Brazil, 120 dogs were positive for *Ancylostoma* spp. eggs in feces and 46.7% of infections were

caused by at least another concurrent helminth (Stalliviere et al., 2013). In a retrospective study based on data gathered from a veterinary hospital in São Paulo, IPC occurred in 23.5% of the cases infected with *Ancylostoma* spp. (Ferreira et al., 2013). In our study, the frequency of IPC in dogs <1 year old was 58.5%, being superior than dogs ≥ 1 year old (38.5%). Ferreira et al. (2016) reported IPC (7.6%) and *Toxocara* spp. (2.5%) to a greater extent in dogs <1 year old yet their study assessed the prevalence of all parasites, not exclusively *Ancylostoma* spp. These findings are suggestive that, in addition to the increased susceptibility of dogs under one year old for distinct intestinal parasites (Gates and Nolan, 2009), there may be other risk factors associated with the occurrence of IPC, possibly environmental elements. Due to their greater IPC, the juvenile dogs have a higher potential for environmental contamination with distinct zoonotic agents through single fecal sample (Lorenzini et al., 2007; Ferreira et al., 2013; Dantas-Torres and Otranto, 2014). In addition to the *Ancylostoma* spp. infection itself, *Giardia* spp., *Toxocara* spp. and *Strongyloides stercoralis* were detected agents in fecal examinations in our study.

Concurrent systemic disorders associated with *Ancylostoma* spp. largely varied. Infectious diseases (distemper, erlichiosis, viral and bacterial gastroenteritis) proved to be the most commonly recorded ones. These diseases and others such as neoplasms, kidney and liver diseases, lack of specific clinical signs, similarly to what hookworm infection brings about diarrhea, vomiting, apathy, weight loss and anemia (Finora, 2003; Martella et al., 2008; Ueno et al., 2009; Goddard and Leisewitz, 2010; O'Neill et al., 2013; Bexfield, 2017; Thawley, 2017). Therefore, considering the severity of these conditions and the clinical

signs they may entail, the presence and relevance of intestinal parasites could be underestimated during routine practise.

In an attempt to isolate possible interferers in the evaluation of eosinophil, which could contribute to both increase and decrease counts, this study was designed to have multiple groups. Eosinopenia can occur in dogs under emotional or physical distress, and inflammatory diseases that lead to endogenous adrenocorticosteroid release, as well as hyperadrenocorticism (Schultze, 2010). Besides, some diseases cause suppression in bone marrow production of leukocytes, such as leukemias and infectious diseases. On the other hand, hypersensitivity reactions, hypoadrenocorticism, other parasites (Dirofilaria, Spirocerca, Trichuris, Strongyloides, and larval migration of ascarids) and inflammatory conditions that result in mast cell degranulation may induce peripheral blood eosinophilia (Stockham and Scott, 2011). Having excluded occurrence of such factors, median eosinophil cell counts and eosinophilia ratio in group A (0) were higher in comparison to group C. In the other groups characterized by presence of *Ancylostoma* spp. eggs in feces, median eosinophil counts were not different from the control group.

Eosinopenia alone holds few clinical importance, even being portrayed in healthy dogs (Young and Meadows, 2010), but in our evaluation its occurrence correlates with other clinical findings. Dogs with concurrent disorders were approximately 25% affected, which was higher but not statistically different from the control group. In contrast to that, eosinopenia in dogs from group A (0) was uncommon, and statistically less frequent when compared to the control group.

AUC of 0.72 is considered to be of moderate accuracy (Greiner et al., 2000), and is useful in discriminating positive dogs for *Ancylostoma* spp. eggs.

346 Furthermore, dogs with eosinophil blood counts above $0.85 \times 10^9/L$ has 2.25
347 more likely to detect truly positive. In general, a positive likelihood ratio above
348 two is considered a good probability (Jensen and Kjelgaard-Hansen, 2010) In
349 studies performed with absolute eosinophil counts in humans and dogs, which
350 was intended to use this counting as biomarker and diagnosis, the AUC obtained
351 was 0.643 and 0.696 respectively (Borin-Crivellenti et al., 2017; Jucevičiūtė et al.,
352 2019). In our study and others reported above, the disorders implied in an
353 increase in the number of eosinophils in the peripheral blood, and based on the
354 AUC, it is possible to propose that there was a similar ability to differentiate
355 positives and negatives through counting eosinophils.

356 Except for the control group, it is mandatory to consider that all laboratory
357 analysis were performed by different professionals over time, despite the
358 standardization of laboratory techniques and clinical records. Accuracy errors
359 inherent to the leukocyte differential count in 100 cells could have reflected in the
360 eosinophil blood count. Furthermore, diseases may not have been diagnosed
361 when the dogs were admitted to the Veterinary Teaching Hospital.

362

363 **5. Conclusion**

364 Despite the *Ancylostoma* spp. parasitism drop in prevalence over the
365 years, the infection deserves proper awareness because one in 10 cases was
366 positive for eggs of the parasite at the Veterinary Teaching Hospital of Unesp,
367 campus Botucatu as evaluated by the simple flotation test. Juvenile dogs are
368 affected differently from adults, presenting higher intestinal parasitic coinfections
369 and egg fecal scores to a greater degree. *Ancylostoma* spp. infections can occur
370 concomitantly with numerous systemic disorders and intestinal parasitic

confections, which leads to a median number of eosinophils similar to healthy dogs. Only in cases where there are no associated comorbidities eosinophilia is pronounced to an extent that could aid in clinical suspicion. In other situations, knowing the status of prevalence of *Ancylostoma* spp. and epidemiological aspects are the main tool to assist in clinical suspicion, which can be confirmed by fecal examinations.

377

378 **Acknowledgements**

The authors also express their gratitude to André Justo, DVM, who collaborated with the revision and translation to the English language.

381

382 **Funding**

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil) [145730/2017-4]

385

386 **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no conflict of interests

388

389 **References**

Balassiano, B.C.C., Campos, M.R., Pereira, M.J.S., 2009. Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 91, 234-240.

393

Behm, C.A., Ovington, K.S., 2000. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today.* 16, 202-209.

396

397 Bexfield, N., 2017. Canine idiopathic chronic hepatitis. Vet. Clin. North. Am.
398 Small. Anim. Pract. 47, 645-663.

399

400 Borin-Crivellenti, S., Garabed, R., Moreno-Torres, K.I., Wellman, M.L., Gilor, C.,
401 2017. Use of a combination of routine hematologic and biochemical test results
402 in a logistic regression model as a diagnostic aid for the diagnosis of
403 hypoadrenocorticism in dogs. Am. J. Vet. Res. 78, 1171-1181.

404

405 Bowman, D.D. (Ed.), 2014. Georgis' Parasitology for Veterinarians, 10th edition.
406 Saint Louis: Elsevier Saunder, 496 pp.

407

408 Bricarello, P.A., Magagnin, E.A., Oliveira, T., Silva, A., Lima, L.M., 2018.
409 Contamination by parasites of zoonotic importance in fecal samples from
410 Florianópolis Beaches, Santa Catarina State, Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sc.
411 55, 1-10.

412

413 Carroll, S.M., Grove, D.I., 1984. Parasitological, hematologic, and immunologic
414 responses in acute and chronic infections of dogs with *Ancylostoma ceylanicum*:
415 a model of human hookworm infection. J. Infect. Dis. 150, 284-294.

416

417 Constantinoiu, C.C., Goullet, M.S., Constantinoiu, E.C., Scott, J.L., 2015.
418 Mucosal tolerance of the hookworm *Ancylostoma caninum* in the gut of naturally
419 infected wild dogs. Parasite Immunol. 37, 510-520.

420

- 421 Dantas-Torres F, Otranto, D., 2014. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil:
422 opening the black box. *Parasit. Vectors.* 7, 22.
423
- 424 Dracz, R.M., Mozzer, L.R., Fujiwara, R.T., Lima, W.S., 2014. Parasitological and
425 hematological aspects of co-infection with *Angiostrongylus vasorum* and
426 *Ancylostoma caninum* in dogs. *Vet. Parasitol.* 200, 111-116.
427
- 428 Faust, E.C., D'Antoni, J.S., Odom, V., Miller, M.J., Peres, C., Sawitz, W., Thomen,
429 L.F., Tobie, J., Walker, J.H., 1938. A Critical Study of Clinical Laboratory Technics
430 for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces¹. *Am. J. Trop.*
431 *Med. Hyg.* 1, 169-183.
432
- 433 Finora, K., 2003. Common paraneoplastic syndromes. *Clin. Tech. Small. Anim.*
434 *Pract.* 18, 123-126.
435
- 436 Ferreira, F.P., Dias, R.C.F., Agostinho, T.M., Constantino, C., Pasquali, A.K.S.,
437 Vidotto, O., Freire R.L., Navarro I.T., 2013. Frequência de parasitas
438 gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque
439 em saúde pública. *Semin. Cienc. Agrar.* 34, 3851-3858.
440
- 441 Ferreira, J.I.G.D.S., Pena, H.F.J., Azevedo, S.S., Labruna, M.B., Gennari, S.M.,
442 2016. Occurrences of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic
443 dogs in São Paulo, SP, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25, 435-440.
444

- 445 Fujiwara, R.T., Geiger, S.M., Bethony, J., Mendez, S., 2006. Comparative
446 immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite*
447 *Immunol.* 28, 285-293.
- 448
- 449 Gates, M.C., Nolan, T.J., 2009. Endoparasite prevalence and recurrence across
450 different age groups of dogs and cats. *Vet. Parasitol.* 166, 153-158.
- 451
- 452 Gibbs, H.C. 1986. Hypobiosis in parasitic nematodes—an update. *Adv. Parasitol.*
453 25, 129-174.
- 454
- 455 Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2010. Canine parvovirus. *Vet. Clin. Small. Anim.* 40,
456 1041-1053.
- 457
- 458 Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, R.D., 2000. Principles and practical application of
459 the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.*
460 45, 23-41.
- 461
- 462 Hotez, P.J, Bin, Z., Bethony, J., Jin, Q., Hawdon, J.M., Young, H.A., Simmens,
463 S., Hitzelberg, R., Zook, B.C., 2002. Natural history of primary canine hookworm
464 infections after three different oral doses of third-stage infective larvae of
465 *Ancylostoma caninum*. *Comp. Parasitol.* 69, 72-81.
- 466
- 467 Jensen, A.L., Kjølgaard-Hansen, M., 2010. Diagnostic test validation. In: Weiss,
468 D.J., Wardrop, K.J., Schalm, O.W. (Eds.). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th
469 edition. Iowa, Blackwell Publishing Ltd, pp. 1027-1033.

470

471 Jain, N.C., (Ed.), 1993. Essential of Veterinary Hematology. Pennsylvania: Lea
472 and Febiger, pp. 417.

473

474 Jucevičiūtė, N., Mikužis, P., Balnytė, R., 2019. Absolute blood eosinophil count
475 could be a potential biomarker for predicting haemorrhagic transformation after
476 intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke. *BMC Neurol.* 19, 127.

477

478 Landsberg, J.W., Cross, S.X., 1935. The blood picture in acute fatal infestations
479 with *Ancylostoma caninum*. *J. Parasitol.* 21, 130-132.

480

481 Loukas, A., Hotez, P.J., Diemert, D., Yazdanbakhsh, M., McCarthy, J.S., Correa-
482 Oliveira, R., Croese, J., Bethony, J.M., 2016. Hookworm infection. *Nat. Rev.*
483 *Dis. Primers.* 2, 16088.

484

485 Lorenzini, G., Tasca, T., Carli, G.A., 2007. Prevalence of intestinal parasites in
486 dogs and cats under veterinary care in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
487 *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 44, 137-145.

488

489 Katagiri. S., Oliveira-Sequeira T.C.G, 2008. Prevalence of dog intestinal
490 parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in Sao Paulo
491 State, Brazil. *Zoonoses. Public. Health.* 55, 406-413.

492

493 Kopp, S.R., Kotze, A.C., McCarthy, J.S., Coleman, G.T., 2007. High-level pyrantel
494 resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Vet. Parasitol.* 143, 299-304.

495

496 Martella, V., Elia, G., Buonavoglia, C., 2008. Canine distemper virus. Vet. Clin.
497 North. Am. Small. Anim. Pract. 38, 787-797.

498

499 McKenna, P.B., McPherson, W.B., Falconer, G.J., 1975. Fatal ancylostomiasis in
500 a dog, N. Z. Vet. J. 23, 151-152.

501

502 Meyer, D.J., Harvey, J., 2004. Appendix: Reference Intervals and Conversion
503 Tables. In: Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. 3rd
504 edition. Sant Louis, Sauders, pp. 305-320.

505

506 Oliveira-Arbex, A.P., David, E.B., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Katagiri, S., Coradi,
507 S.T., Guimarães, S., 2017. Molecular identification of *Ancylostoma* species from
508 dogs and an assessment of zoonotic risk in low-income households, São Paulo
509 State, Brazil. J. Helminthol. 91, 14-19.

510

511 Oliveira-Sequeira, T.C.G., Amarante, A.F.T., Ferrari, T.B., Nunesm L.C., 2002.
512 Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. Vet.
513 Parasitol. 103, 19-27.

514

515 O'Neill, D.G., Elliott, J., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., Brodbelt,
516 D.C., 2013. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices:
517 prevalence, risk factors, and survival. J. Vet. Intern. Med. 27, 814-821.

518

- 519 Saldanha-Elias, A.M., Silva, M.A., Silva, V.O., Amorim, S.L.A., Coutinho, A.R.,
520 Santos, H.A., Giunchetti, R.C., Vitor, R.W.A., Geiger, S.M., 2019. Prevalence of
521 endoparasites in urban stray dogs from Brazil diagnosed with leishmania, with
522 potential for human zoonoses. *Acta. Parasitol.* 64, 352–359.
- 523
- 524 Stalliviere F.M., Rosa, L.D., Bellato, V., Souza, A.P., Sartor, A.A., Moura, A.B.,
525 2013. Helmintos intestinais em cães domiciliados e aspectos socioeconômicos e
526 culturais das famílias proprietárias dos animais de Lages, SC, Brasil. *Arch. Vet.*
527 *Sci.* 18, 22-27.
- 528
- 529 Taylor, M.A., Coop. R.L., Wall, R.L. (Eds), 2017. Parasitas de cães e gatos. In:
530 *Parasitologia Veterinária*, 4th edition. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp.
531 585-662.
- 532
- 533 Thawley, V., 2017. Acute liver injury and failure. *Vet. Clin. Small. Anim.* 47, 617-
534 630.
- 535
- 536 Torrico, K.J., Santos, K.R., Martins, T., Silva, F.M.P.E., Takahira, R.K., Lopes,
537 R.S., 2008. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em cães e gatos na rotina
538 do laboratório de enfermidades parasitárias da FMVZ/UNESP-Botucatu, SP.
539 *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 182-183.
- 540
- 541 Schmidt, E.M., Tvarijonaviciute, A., Martinez-Subiela, S., Cerón, J.J., Eckersall,
542 P.D., 2016. Changes in biochemical analytes in female dogs with subclinical
543 *Ancylostoma* spp. infection. *BMC Vet. Res.* 12, 203.

544

545 Schad, A., Page, M.R., 1982. *Ancylostoma caninum*: adult worm removal,
546 corticosteroid treatment, and resumed development of arrested larvae in dogs.
547 *Exp. Parasitol.* 54, 303-309.

548

549 Schultze, A.E., 2010. Interpretation of Canine Leukocyte Responses. In: Weiss,
550 D.J., Wardrop, K.J., Schalm, O.W. (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th
551 edition. Iowa, Blackwell Publishing Ltd, pp. 281-289.

552

553 Stockham, S.L., Scott, M.A. (Eds.), 2011. Fundamentos da Patologia Clínica
554 Veterinária. 2nd edition. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 792.

555

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

560

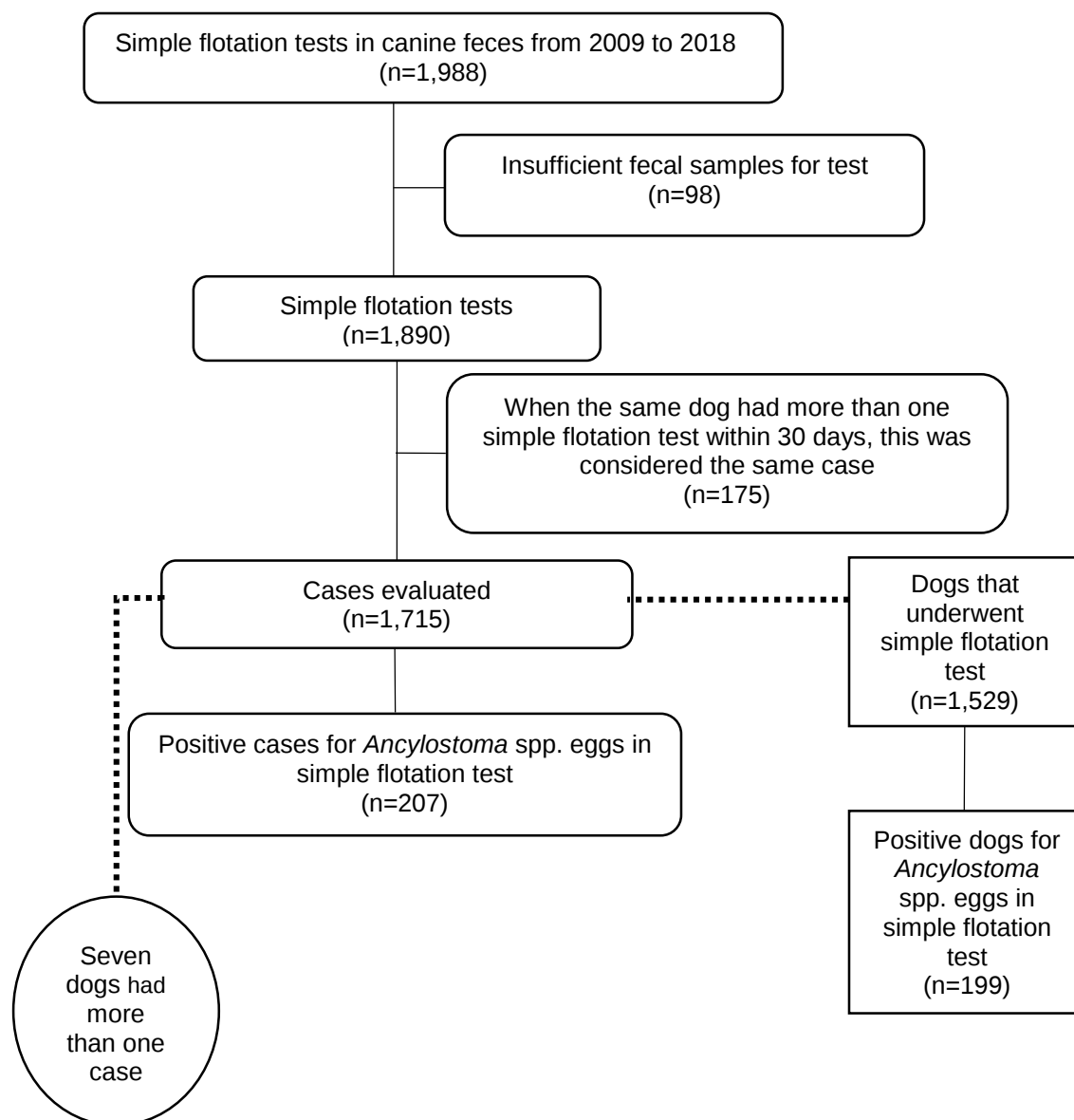
561 Willis, H.H., 1921 A simple levitation method for the detection of hookworm ova.
562 *Med. J. Aust.* 2, .375-376.

563

564 Young, K.M., Meadows, R.F., 2010. Eosinophils and Their Disorders. In: Weiss,
565 D.J., Wardrop, K.J., Schalm, O.W. (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6 th
566 edition. Iowa, Blackwell Publishing Ltd, pp. 281-289.

567

568



569

570

Figure 1. Flow chart of selection of cases included in the study.

571

572

573

574

575

576

577

578 Table 1. Characterization of demographic data from canine positive cases for
 579 fecal *Ancylostoma* spp. eggs admitted at Veterinary Teaching Hospital of
 580 Unesp, campus Botucatu, from 2009 to 2018.

581

Categories	N	Percentage	P-value
Gender	200		0.23
Female	94	47	
Male	106	53	
Age	207		<0.001
Absence of age in VMR	26	12.6	
0–5,9 months	28	13.5	
6-11,9 months	23	11.1	
1–7,9 years	87	42.0	
>8 years	43	20.8	
Breed	206		0.84
Mixed breed	104	50.5	
Pure breeds	102	49.5	
City of origin	206		< 0.0001
Botucatu	135	65.5	
Radios of 100 Km	60	29.1	
Other cities	11	5.4	

582 P-value obtained by Chi-square test.

583

584

585

586 Table 2. Characterization of fecal examinations results from canine positive
 587 cases for fecal *Ancylostoma* spp. eggs admitted at Veterinary Teaching
 588 Hospital of Unesp, campus Botucatu, from 2009 to 2018.
 589

Categories	N	Percentage	P-value
Quantity of fecal eggs score	200		<0.0001
Rare	36	18.0	
1+	51	25.5	
2+	38	19.0	
3+	75	37.5	
Intestinal coinfections	205		<0.0001
No coinfections	112	54.6	
1 parasite	80	39.0	
2 parasites or more	13	6.4	
Parasites	105		<0.0001
<i>Cystoisospora</i> spp.	35	33.3	
<i>Giardia</i> spp.	32	30.5	
<i>Toxocara</i> spp.	18	17.1	
<i>Trichuris vulpi</i>	9	8.6	
Other*	11	10.5	

590 **Capillaria* spp. *Dipylidium caninum*, *Sarcocystis* spp., *Strongyloides stercoralis*.

591 P-value obtained by Chi-square test.

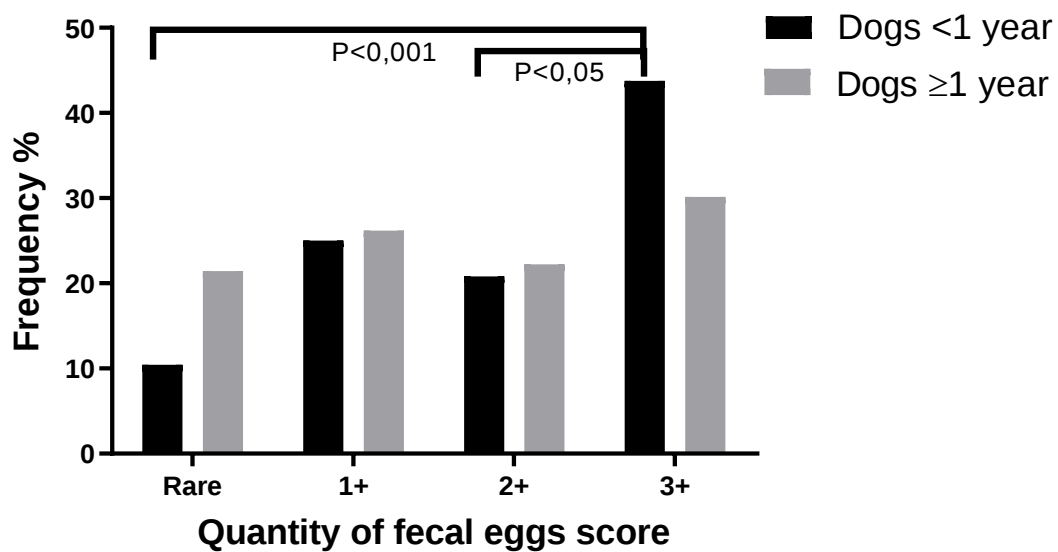


Figure 2. Frequency quantity of fecal score for *Ancylostoma* spp. eggs in dogs <1 year (n = 48) and dogs ≥ 1 year (n = 126) simple flotation test.

610 Table 3. Disorders (n=102) of the 75 dogs of group B (positives cases for
611 fecal *Ancylostoma* spp. eggs with concurrent systemic disorders).

Disorders	
Cardiorespiratory	Bronchopneumonia (4), Cardiomyopathy (1), Cardiopathy (cardiac murmur III/IV) (8), Right-sided congestive heart failure (2)
Digestive	Cholangiohepatitis (1), Exocrine pancreatic insufficiency (2), Inflammatory bowel disease (1), Hepatopathy (2)
Infectious diseases	Babesiosis (1), Bacterial gastroenteritis (3), Distemper (3), Ehrlichiosis (21), Hemoparasitosis (2), Viral gastroenteritis (5)
Integumentary	Atopic dermatitis (3), Dermatophytosis (1), Otitis (3), Otodectic mange (1)
Musculoskeletal	Abscess/phlegmon/myiasis (2), Claudication (1), Coxofemoral dysplasia (1), Cruciate ligament rupture (1), Fracture (2), Intervertebral disk disease (2), Paresis (1), Paraplegia (1), Rectal prolapse (1)
Neoplasms	Cutaneous mesenchymal tumor (1), Multicentric lymphoma (1) Pulmonary metastases (1), Oral cavity tumor (1)
Urogenital	Cystitis (4), Prostatitis (1), Renal disease (6)
Other	Cleft lip (1), Endocrinopathy suspicion (3), Hydrocephalus (1), Hypothyroidism (1), Idiopathic epilepsy (3), Metronidazole intoxication (1), Vestibulopathy (1)

Table 4. Comparison of eosinophil blood count and proportion related to RI among groups A (0), A (1), B (0), B (1) and control group (group C).

Eosinophils (10 ⁹ /L)	N	Median	25%-75%	Range	Below RI	Within RI	Above RI
Group A (0)	35	1.05*	0.60-1.90	0-6.00	2.8% (1)*	62.8% (22)	34.4% (12)*
Group A (1)	20	0.45	0.88-0.77	0-2.70	25.0% (5)	55.0% (11)	20.0% (4)
Group B (0)	39	0.40	0.08-0.94	0-3.00	25.6% (10)	56.4% (22)	18.0% (7)
Group B (1)	36	0.40	0.02-0.80	0-2.70	25.0% (9)	58.3% (21)	16.7% (6)
Group C	24	0.43	0.22-1.04	0-1.64	16.7% (4)	79.2%(19)	4.1% (1)

* P <0.05 compared to control group (Kruskal-Wallis and Fisher Test)

Group A: Dogs positives for *Ancylostoma* spp. eggs in feces without systemic disorders [(0) - without IPC and (1) with IPC]

Group B: Dogs positives for *Ancylostoma* spp. eggs in feces with systemic disorders [(0) - without IPC and (1) with IPC]

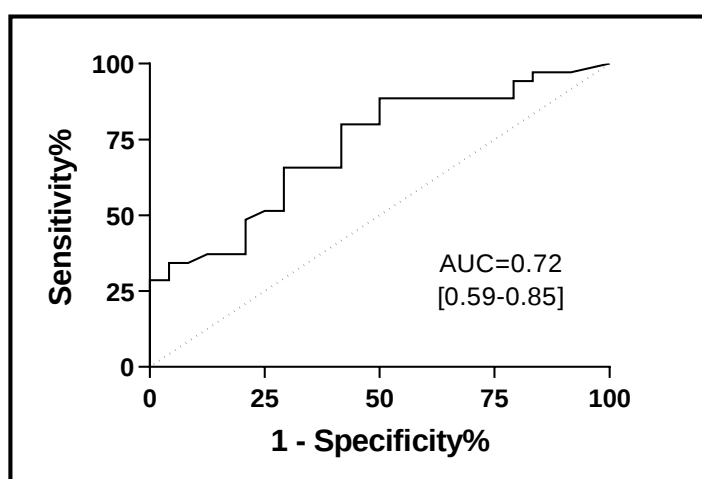


Figure 3. ROC curve for ability of eosinophil blood count to discriminate healthy dogs and dogs with *Ancylostoma* spp. eggs in feces belonging Group A (0) (without comorbidities associated). Numbers in square brackets represent 95% confidence limits for the AUC.

Trabalho a ser enviado para a revista "Acta Scientiae Veterinariae".

Link de acesso para instruções de formatação de artigos científicos:

<https://www.ufrgs.br/actavet/Instrucoes-ASV.pdf>

621

622 **Clinical and laboratory findings of ancylostomosis in naturally infected adult dogs**
 623 **in Botucatu-SP and region: retrospective study.**

624 Bruna dos Santos¹, Naiara Mirelly Marinho da Silva¹, Silvia Vargas Mora¹, Elizabeth
 625 Moreira dos Santos Schmidt¹, Regina Kiomi Takahira¹

626 ¹ Department of Veterinary Clinics, São Paulo State University (Unesp), School of
 627 Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo, Brazil.

628 CORRESPONDENCE: R.K. Takahira [regina.takahira@unesp.br - Tel.: +55 (14) 3880-
 629 2057. Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ UNESP - campus Botucatu. Av. Prof.
 630 Walter Mauricio Correa s/n., CEP 18618-681, Caixa Postal 560 Botucatu, SP, Brasil.

631

632 **Abstract**

633 **Background:** *Ancylostoma* spp. is the most prevalent helminth in dogs from Brazil. Due
 634 to hematophagy, it can outcome puppies to die, and although dogs develop an immune
 635 response capable of controlling the parasitic burden with age, adult and elderly dogs may
 636 remain infected and asymptomatic. The aim of this retrospective study was to characterize
 637 clinical and laboratory findings of hookworm in naturally infected adult dogs, attended at
 638 the Veterinary Teaching Hospital, Unesp campus Botucatu, from 2009 to 2018.

639 **Materials, Methods & Results:** Dogs were positive for *Ancylostoma* spp. when eggs of
 640 the Ancylostomatoidea superfamily have viewed in fezes, by simple flotation method.
 641 The data gathered in the study came from medical records. Owner consent was previously
 642 in order to access medical records information. Inclusion and exclusion criteria were
 643 applied to select dogs older than one year, without comorbidities and with clinical
 644 symptoms. Demographic information (gender, age, breed, city of origin), clinical signs,
 645 environmental aspects and physical examination were compiled. Hematological and

646 serum biochemistry variables were compared to a prospectively selected control group
 647 using the unpaired T-test, Mann-Whitney test and Pearson or Spearman correlation. The
 648 statistical significance was set at $P < 0.05$. Of the 207 positive cases, 23 were selected.
 649 The reported clinical signs were mostly associated to the gastrointestinal tract, which
 650 were most commonly described: diarrhea 13/23 (56.5%), dysentery 12/23 (52.2%),
 651 emesis 8/23 (35.8%), melena 6/23 (26.1%), apathy 5/23 (21.7%), weight loss 5/23
 652 (21.7%) hyporexia 5/23 (21.7%), soft feces 5/23 (21.7%), feces with mucus 4/23 (17.4%),
 653 polydipsia 3/23 (13.0%) and anorexia 3/23 (13.0%). Only 4/23 (17.4%) had no diarrhea
 654 and/or dysentery. Regarding the environment, 7/21 (33.3%) had street access, 16/19
 655 (84.2%) lived in urban areas, 12/19 (63.1%) had contact with other dogs. Anthelmintic
 656 was confirmed by 16/18 (88.9%) tutors in the anamnesis, however 8/16 (50%) of those
 657 who answered in the affirmative had done the used antihelminthic at least 90 days ago.
 658 On physical examination, elevation of body temperature above 39.2°C in 6/22 (27.3%)
 659 and pain on abdominal palpation in 6/21 (28.6%) were highlighted. There was a decrease
 660 in the red blood cell count ($P = 0.002$), hemoglobin concentration ($P = 0.007$), hematocrit
 661 ($P = 0.007$), and lymphocytes count ($P = 0.023$) and an increase in platelet count ($P =$
 662 0.040), leukocytes count ($P = 0.001$), neutrophil count ($P = 0.001$), eosinophil count ($P =$
 663 0.001), and monocytes count ($P = 0.005$) compared to the control group. In serum
 664 biochemistry, there was and decrease in albumin concentrations ($P = 0.004$) and increase
 665 in globulin ($P = 0.014$) in dogs with ancylostomosis. There was a moderate and positive
 666 correlation between red blood cell count and albumin concentration ($r=0.69$).

667 **Discussion:** The study population consisted of dogs attended at the Veterinary Teaching
 668 Hospital, which possibly facilitated finding cases with clinical symptoms in adult dogs.
 669 One third of the dogs had street access and most had contact with other dogs. Therefore,
 670 it is possible that the frequency of anthelmintic use is not adequate to the risk of infection

671 in which dogs were exposed. When compared results of the laboratory analysis with
672 reference interval, differences were minor. The moderate correlation between red blood
673 cell count and albumin concentration may be associated not only with parasite
674 exploitation but also with systemic inflammatory process caused by parasitism. Thus, the
675 laboratory and clinical findings described may assist in a better approach for clinical
676 treatment and also for more rigorous control of this parasitosis in dogs.

677 **Keywords:** dogs, hookworm infection, blood cell counts, clinical signs

678

679 INTRODUCTION

680 The parasites of the Ancylostomatoidea superfamily, particularly those belonging
681 to the *Ancylostoma* genus, are geohelminths that parasitize the small bowel of several
682 mammalian species [1] and their pathogenicity have associated with hematophagy [4]. In
683 Brazil, the *Ancylostoma* species that cause infection in dogs are *Ancylostoma caninum*
684 and *Ancylostoma braziliense* [8,30]. Due to the impossibility of distinguishing both
685 through the morphology of eggs in feces [1], they are reported with the genus name:
686 *Ancylostoma* spp. This genus is the most described in fecal examinations and necropsies
687 in Brazil [6,14,15,18,24,26,28,31] and the second, losing to the genus *Toxocara*, in soil
688 contamination by eggs of squares, sandbanks and other recreation areas [35]. *A. caninum*
689 and *A. braziliense* can infect humans, causing zoonoses such as eosinophilic enteritis and
690 cutaneous larva migrans, respectively [5,19].

691 Hookworm can be fatal in newborn dogs and puppies in high burden parasitic due
692 to blood loss [27]. The anthelmintics are used for treatment and prophylaxis at any age
693 [36], but the anthelmintics has used routinely cannot eliminate hypobiosis larvae [2,17].
694 Despite developing an immune response capable of controlling the parasitic load, adult
695 and elderly dogs can remain infected even without clinical signs [4,7]. In addition,

696 arrested larvae can return to the intestine without the need for reinfection [32].
697 Information on the consequences of symptomatic infections in naturally infected dogs
698 one year of age and older is rare for blood count and biochemical findings.

699 The aim of this retrospective study was to characterize clinical and laboratory
700 findings of hookworm in naturally infected adult dogs, attended at the Veterinary
701 Teaching Hospital, Unesp campus Botucatu, from 2009 to 2018.

702

703 **MATERIALS AND METHODS**

704 *Design of study*

705 All dogs in the study were attended at the Veterinary Teaching Hospital of
706 UNESP, campus Botucatu, from June 2009 to June 2018. The data gathered in the study
707 came from medical records. Owner consent was previously in order to access medical
708 records information. Laboratory variables were compared to a prospectively created
709 control group.

710 *Inclusion criteria*

711 Dogs were positive for *Ancylostoma* spp. when eggs of the Ancylostomatoidea
712 superfamily have viewed in fezes, by simple flotation method. All dogs have tested by
713 centrifugal-flotation method.

714 *Exclusion criteria*

715 Dogs carriers of intestinal parasitic infection, evidence of concurrent systemic
716 disorders, complete blood count and simple flotation test exceeded a three days intervals,
717 missing medical history or physical examination findings in medical records, less than 1
718 year old and absent of the clinical signs were excluded.

719 *Inclusion and exclusion criteria for the control group*

720 A prospective control group was designed to further evaluate eosinophil blood
 721 count from naturally infected dogs with *Ancylostoma* spp. Analysis from all three groups
 722 were performed by means of the same standardized techniques and were conducted at the
 723 same laboratories.

724 Inclusion criteria for the control group were: male or female dogs from Botucatu,
 725 over 15 kg (blood donors included), from one to 8.9 years old, up to date with polyvalent
 726 and rabies vaccination, without clinical history of diseases within the last two months and
 727 negative results in simple flotation and centrifugal-flotation tests. Dogs facing
 728 thrombocytopenia (total platelet count below 160,000/ μ L)[29] or ELISA positive either
 729 *Ehrlichia* sp., *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp. or *Dirofilaria immitis* in SNAP 4 Dx
 730 Plus® (IDEXX Laboratories, Maine, USA) without negative test in PCR, were excluded
 731 from the control group

732 *Clinical and laboratorial evaluation*

733 Demographic data (gender, breed, age, city of origin) and the following compiled
 734 clinical variables: clinical signs, rectal temperature ($^{\circ}$ C), heart rate (beats per minute),
 735 respiratory rate (breaths per minute), capillary filling time - CPT (seconds), degree of
 736 dehydration (not apparent, mild, moderate or severe), mucous membrane color (pink, pale
 737 and red). In addition, health and environmental aspects were compiled: street access,
 738 residence in urban or rural areas, contact with other dogs and cats, use of anthelmintic,
 739 polyvalent and rabies vaccination history.

740 Hematological variables (red blood cell - RBC/ μ L, hematocrit - HT [%],
 741 hemoglobin [g/dL], mean cell volume - MCV [fL], mean cell hemoglobin concentration
 742 - MCHC [g/dL], plasma protein - PPT [g/dL], platelet count/ μ L, white blood cell -
 743 WBC/ μ L, as well as absolute neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil and basophil
 744 counts) and serum biochemistry (urea [mg/dL], creatinine [mg/dL], alanine amino

745 transferase - ALT [U/L], gamma glutamyl transferase - GGT [U/L], alkaline phosphatase
 746 - ALP [U/L], serum protein - PST [g/dL], albumin [g/dL] and globulins [g/dL]) were
 747 performed at the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Veterinary Teaching
 748 Hospital.

749 Blood cell counts were accomplished by automated hematological analyzers
 750 Hema-Screen18 (Ebram Produtos Laboratoriais Ltda, SP, Brazil) from 2009 to 2014 and
 751 PocH-100iVDiff (Sysmex Corporation, Chou-ku, Kobe, Japan) ever since 2014.
 752 Differential white blood cells count in 100 cells was manually performed by blood smear
 753 evaluation in optical microscopy (1,000x magnification). The HT was determined by
 754 capillary reading of microhematocrit after centrifugation and PPT by the refractometry
 755 method [20]. Serum biochemistry was measured using commercial kits in the automated
 756 analyzers Cobas⁶ (2009 to 2018) and Mindray Bs 200E⁷ (as from 2018). Globulin was
 757 calculated by estimation, and its concentration is the value of PTS subtracted of albumin
 758 [34]. Reference intervals (RI) for adult dogs for both complete blood count [20,29] and
 759 biochemical serum [21] were placed in the comparison tables of the variables.

760 Sodium chloride saturated salutation (simple flotation) [37] and centrifugal-
 761 flotation with zinc sulphate [13] were performed at the Laboratory of Parasitic Disease of
 762 Animals at the Veterinary Teaching Hospital.

763 *Data analysis*

764 The GraphPad Version 8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA,
 765 USA) provided statistical analysis. The Shapiro-Wilk test was used for normality
 766 evaluation. Median, 25% and 75% percentiles were used to represent the nonparametric
 767 data. Mean and standard were used to represent the parametric data. Mann-Whitney test
 768 and unpaired t-test were used to compare medians and means respectively, besides
 769 Pearson or Spearman correlation. The statistical significance was set at $P < 0.05$.

770 A análise estatística foi realizada com uso do software GraphPad Version 8⁸. As
771 variáveis numéricas passaram por teste Shapiro-Wilk. A mediana e primeiro e terceiro
772 intervalos interquartis (entre parênteses) foram utilizados para representar o conjunto de
773 dados não paramétrico, média e desvio padrão para dados não paramétricos. O teste de
774 Mann-Whitney e Teste t não pareado foram utilizados para comparar medianas e médias
775 respectivamente. Em todas as análises foi adotado valor de $p < 0,05$ de significância.

776

777 RESULTS

778 Of the 207 positive cases for *Ancylostoma* spp., 23 dogs fill in selection criteria
779 (11.1% of whole), and the flowchart with the exclusion criteria are present in Figure 1.
780 The dogs had a median age of 36 months (24 - 60 months), with 43.5% (10/23) females
781 and 56.5% (13/23) males. Of the dogs evaluated, 17.4% (4/23) had mixed-breed, and
782 82.6% (19/23) pure breed: Pitt bull (7/19), Poodle (3/19) German shepherd (3/19),
783 Labrador (2/19) and Rottweiler, Dalmata, Golden retriever and Yorshire had each one
784 representative. Most animals resided in Botucatu (56.6%) and cities within 100 km
785 (34.8%). Two of these 23 dogs presented the clinical disease twice, at intervals of one
786 year and eight months and one year and 10 months. Given the long interval of disease
787 presentation, new infection cases were considered, and were therefore included as
788 independent cases.

789 Control group comprised 10 female and 14 male dogs, including Labrador
790 retriever (4), Golden retriever (2), English pointer (2) and Chow chow (2). Other breeds
791 had only one representative each and six were mixed-breed. The median age was three
792 years old and the weight was 32.5 kg (24-38 kg).

793 Reported clinical signs are mainly related to the gastrointestinal tract and were as
794 follows: diarrhea 13/23 (56.5%), dysentery 12/23 (52.2%), emesis 8/23 (35.8%), melena

795 6/23 (26.1%), apathy 5/23 (21.7%), weight loss 5/23 (21.7%) hyporexia 5/23 (21.7%),
 796 soft feces 5/23 (21.7%), mucus feces 4/23 (17.4%), polydipsia 3/23 (13.0%) and anorexia
 797 3/23 (13.0%). Only 4/23 (17.4%) did not find diarrhea and/or dysentery. On physical
 798 examination, as present changes were dehydration, changes as in 3/22 (13.6%), body
 799 temperature above 39.2 °C in 22/6 (27.3%), pale 2/23 (8.7%) and red 2/23 (8.7%) mucous
 800 membranes, CPT three seconds at 21/4 (19.0%). Heart rate was within normal ranges for
 801 all dogs, with a median of 120 bpm (103-130 bpm). The respiratory rate was filled in a
 802 few records (11), with an average of 40 rpm (24-40 rpm). Abdominal palpation pain was
 803 present in 21/6 (28.6%).

804 Regarding the environment, street access was confirmed in 7/21 (33.3%), 16/19
 805 (84.2%) lived in urban areas, 3/16 (15.8%) in rural areas 12 / 19 (63.1%) and had contact
 806 with other dogs and 3/17 (17.6%) cats. The use of anthelmintic was confirmed by 16/18
 807 (88.9%) tutors in the anamnesis, however, 8/16 (50%) those answered that dogs had been
 808 treated at least 90 days ago, 2/16 (12.5%) in the last 30 days and the remaining 6/16
 809 (37.5%) dogs, despite the affirmative answer of the tutors, did not had date of use of the
 810 anthelmintics in medical records. Polyvalent and rabies vaccines reinforced annually was
 811 affirmative from 12/20 (60%) and 16/21 (76.2%) dogs respectively.

812 Tables 1 and 2 show comparisons respectively of the hematological variables and
 813 serum biochemistry, between adult dogs with ancylostomosis and the control group.
 814 Person's correlation between red blood cells count and albumin concentration was
 815 significant ($P=0,003$), moderated and positive ($r=0,69$).

816

817 **DISCUSSION**

818 Compensated chronic ancylostomosis is the name of the disease present in
 819 immunocompetent dogs. This condition is usually asymptomatic, despite the presence of

eggs of *Ancylostoma* spp. in feces and anemia [4]. However, the target population of the study is dogs treated at the hospital, which may have facilitated finding cases with clinical symptoms, since the largest search for veterinary care occurs when the animal is presenting signs of disease [23]. As shown in the flowchart of Figure 1, only two adult dogs, after undergoing all other exclusion criteria, showed no clinical signs.

When assessing the environmental context, a third of total dogs had access to the street and most had contact with other dogs. Therefore, the frequency of anthelmintic use cannot have been adequate to the risk of infection to which dogs were exposed. Thus, regular control of infection would be relevant, either through preventive use of anthelmintic drugs or fecal examinations [12]. Also post-treatment control is necessary due to the chance of resistance to the administered drugs [22,25].

Clinical signs related to hookworm infection described in both experimental and natural infections were similar to those observed in the present study: diarrhea, dysentery feces with mucus and apathy [3,25]. In an experimental infection study dogs were up to six months old, and in the naturally infected dog 65% were less than 1 year old. In the latter, clinical signs and laboratory findings were not segmented in age group. Therefore, the present study, according to the authors' knowledge, is the only one that addresses the clinical signs exclusively of adult dogs with hookworm. The physical examination showed slight alterations and proportionally pain to abdominal palpation and fever ($> 39.2^{\circ}\text{C}$) [16], were more relevant. In general, in severe parasitism, which mainly affects the small intestine, both findings may occur [16]. Specifically, in asymptomatic dogs infected with *Ancylostoma* spp. there has been an increase in C-reactive protein concentrations, and although not characterizing an acute inflammatory response, it demonstrates the presence of a systemic inflammatory process [33].

844 Hematological changes in experimental infections for *Ancylostoma* spp. in
845 puppies are anemia, neutrophilia, leukocytosis, relative lymphocytosis and eosinophilia
846 [10,11]. The occurrence of anemia in cases of chronic hookworm is reported, but its
847 intensity is not described [4]. In general, the hematological changes observed in this study
848 were discrete in absolute numbers, with means or medians within the RI. However, when
849 observing eosinophil percentiles, it is clear that at least 25% of dogs have eosinophilia
850 when compared to IR.

851 Although decreased erythrogram variables have been detected, it is not possible
852 to make more accurate inferences about the severity of the decrease in red blood cells,
853 hemoglobin and HT. This is because erythrogram values before infection or after
854 treatment are not known. In an experimental study with young dogs, there were reduced
855 near 10 percentage points in HT (from about 47% to 37%) [11] and the basis for
856 comparison was pre-infection values. Another study followed hematological and
857 biochemical variables of naturally infected for *Ancylostoma* spp. treated with different
858 anthelmintics [9]. Age of the dogs is not mentioned, but the difference between HT before
859 and 15 days after treatment was five to six percentage points. In comparison with the
860 control group, the HT varied from five to 10 percentage points at the time of diagnosis.
861 Therefore, given the factors that could affect the interpretation of the HT drop result, the
862 decrease of four percentile points observed in this study seems to be compatible with the
863 literature data. Signs of regeneration were not visible on erythrogram, and their absence
864 could be associated with a decrease in the number of red blood cells, resulting in a small
865 hypoxic stimulus, or due to the onset of chronic disease anemia due to the present
866 inflammatory process [33,34].

867 Biochemical tests for assessment of renal function and activity of liver injury-
868 indicating enzymes were within normal range according to the RI, and with no statistical

869 difference compared to the control group. The proteins, however, had a different profile:
870 in infected dogs albumin was decreased and globulin increased compared to the control
871 group. This ratio of decreased albumin to increased globulin may indicate an
872 inflammatory component in this profile, associated with enteric albumin loss [34]. Even
873 asymptomatic, it has been proven that dogs parasitized by *Ancylostoma* spp. showed
874 decreases in serum albumin and iron concentrations [33]. The moderate correlation
875 between red blood cell count and albumin concentration may be associated not only with
876 parasitic exploitation but also with the systemic inflammatory process caused by
877 parasitism. Both variables are affected simultaneously and decrease in the presence of
878 hookworm.

879 *Limitations of study*

880 Except for the control group, it is mandatory to consider that all laboratory
881 analysis were performed by different professionals over time, despite the standardization
882 of laboratory techniques and clinical records. Accuracy errors inherent to the leukocyte
883 differential count in 100 cells could have reflected in the eosinophil blood count.
884 Furthermore, diseases may not have been diagnosed when the dogs were admitted to the
885 Veterinary Teaching Hospital.

886

887 **CONCLUSION**

888 Ancylostomosis can cause clinical gastrointestinal disease in adult dogs without
889 concurrent disorders, the main clinical signs being diarrhea and dysentery. Hematological
890 and biochemical alterations were slight when compared to the reference intervals, but
891 statistically significant. The mean HT of dogs with ancylostomosis was 4 percentage
892 points lower than the control group, and there was a correlation between the decrease in
893 red blood cells and albumin concentration. Thus, the laboratory and clinical findings

894 described may assist in a better approach for clinical treatment and also for more rigorous
895 control of this parasitosis in dogs.

896

897 **Manufacturers:**

898 ¹IDEXX Laboratories, Maine, USA.

899 ²Ebram Produtos Laboratoriais Ltda, SP, Brasil.

900 ³Sysmex Corporation, Chou-ku, Kobe, Japan.

901 ⁴Labtest Diagnóstica. Lagoa Santa, MG, Brazil.

902 ⁵Quibasa Química Básica Ltda., Santa Branca, MG, Brazil.

903 ⁶Hoffmann La Roche, Schweiz.

904 ⁷Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltda., Nanshan, Shenzhen, China.

905 ⁸GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA.

906

907 **Ethical approval.** The experiment was approved by the Ethics Committee on Used
908 Animal of the São Paulo State University (UNESP) - Faculty of Veterinary Medicine
909 and Animal Science, under protocol number 074/2019.

910 **Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone
911 are responsible for the content and writing of the paper.

912 **Funding.** This work was supported by National Council for Scientific and Technological
913 Development (CNPq-Brazil) [145730/2017-4]

914

915

916

917

918 **REFERENCES**

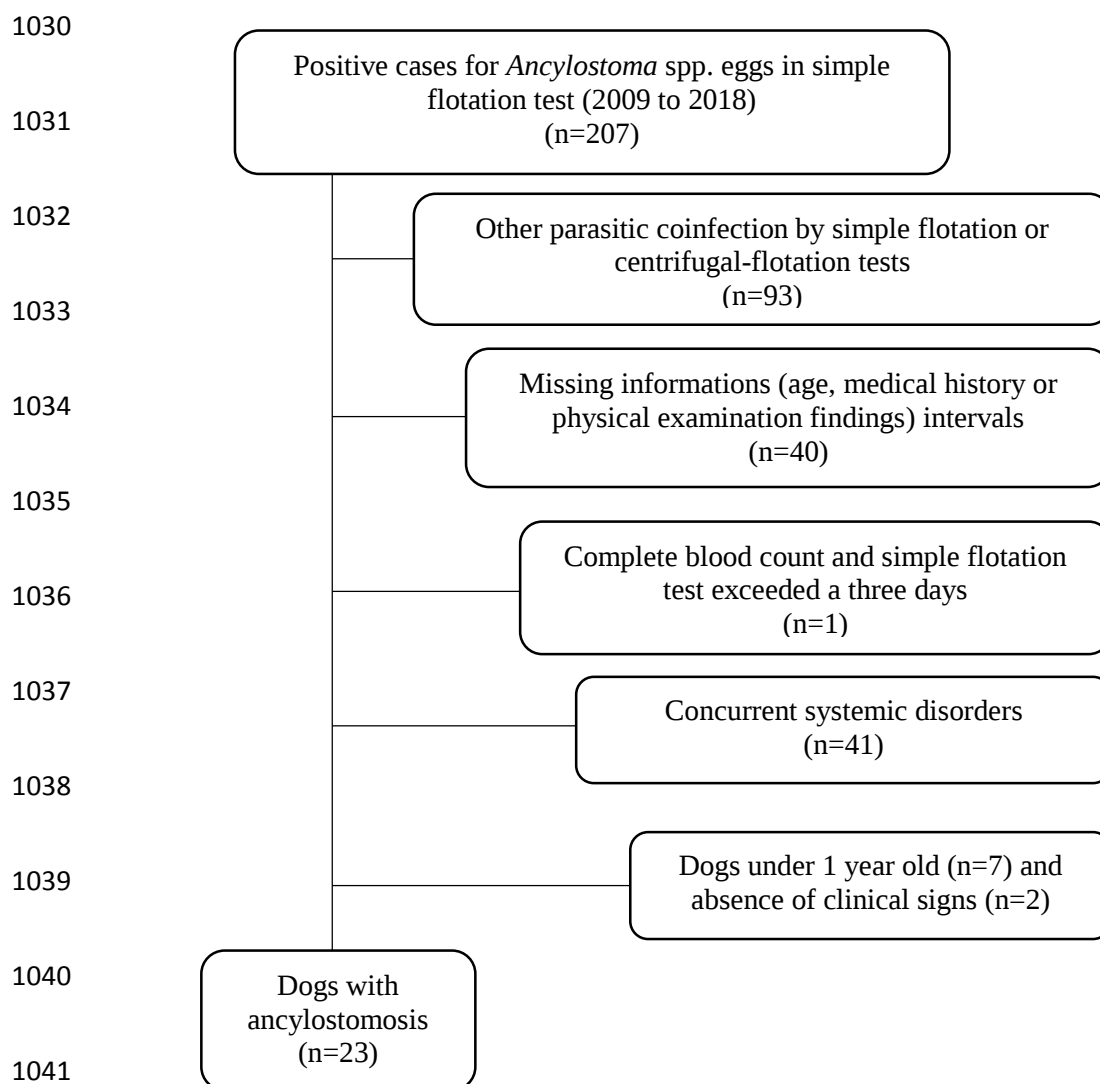
- 919 **1 Anderson R.C. 2000.** Order Strongylida (the bursate nematodes). In: *Nematode*
 920 *parasites of vertebrates: Their development and transmission*. 2nd ed. New York: CAB
 921 International, pp.41-230.
- 922 **2 Arasu P. 1998.** Anthelmintic efficacy against tissue-arrested larvae of *Ancylostoma*
 923 *caninum* in murine hosts. *The Journal of Parasitology*, 84(6): 1263-1267.
- 924 **3 Brahmabhatt N. N. 2015.** Studies on clinico-biochemical aspects of ancylostomosis in
 925 dogs. 69 f. Gujarat, Índia. Dissertation (Master in Veterinary Science) - Anand
 926 Agricultural University. Disponível em:
 927 <http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/5810054647>.
- 928 **4 Bowman D.D. 2014.** *Georgis' parasitology for veterinarians*. 10 th ed. Saint Louis:
 929 Elsevier Saunder, 496p.
- 930 **5 Bowman D.D., Montgomery S.P., Zajac A.M., Eberhard M.L. & Kazacos K.R.**
 931 **2010.** Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends in*
 932 *Parasitology*, 26(4): 162-167.
- 933 **6 Campos D.R., Oliveira L.C., Siqueira D.F., Perin L.R., Campos N.C., Aptekmann**
 934 **K.P. & Martins I.V.F. 2016.** Prevalence and risk factors associated with endoparasitosis
 935 of dogs and cats in Espírito Santo, Brazil. *Acta Parasitologica*, 61(3): 544-548.
- 936 **7 Constantinoiu C.C., Goullet M.S., Constantinoiu E.C. & Scott J.L. 2015.** Mucosal
 937 tolerance of the hookworm *Ancylostoma caninum* in the gut of naturally infected wild
 938 dogs. *Parasite Immunology*, 37(10): 510-520.
- 939 **8 Dantas-Torres F. & Otranto D. 2014.** Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil:
 940 opening the black box. *Parasites & Vectors*, 7(1): 22.

- 941 **9 De S., Gupta M.P., Singla L.D., & Sood N.K. 2016.** Anthelmintic therapy and
 942 haemato-biochemical response in dogs with ancylostomosis. *Journal of Veterinary*
 943 *Parasitology*, 30(1): 21-27.
- 944 **10 Dias S.R.C., Cunha D.E.S., Silva S.M., Santos H.A., Fujiwara R.T. & Rabelo**
 945 **É.M.L. 2013.** Evaluation of parasitological and immunological aspects of acute infection
 946 by *Ancylostoma caninum* and *Ancylostoma braziliense* in mixed-breed
 947 dogs. *Parasitology Research*, 112(6): 2151-2157.
- 948 **11 Dracz R.M., Mozzer L.R., Fujiwara R.T. & Lima, W. S. 2014.** Parasitological and
 949 hematological aspects of co-infection with *Angiostrongylus vasorum* and *Ancylostoma*
 950 *caninum* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 200(1-2): 111-116.
- 951 **12 European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP).** Guideline
 952 01 Third Edition -Worm control in dogs and cats. Disponível em:
 953 [https://www.esccap.org/uploads/docs/0x0o7jda_ESCCAP_Guideline_01_Third_Edition](https://www.esccap.org/uploads/docs/0x0o7jda_ESCCAP_Guideline_01_Third_Edition_July_2017.pdf)
 954 [_July_2017.pdf](https://www.esccap.org/uploads/docs/0x0o7jda_ESCCAP_Guideline_01_Third_Edition_July_2017.pdf). [Acessado em: 07/2019].
- 955 **13 Faust E.C., D'Antoni J.S., Odom V., Miller M.J., Peres C., Sawitz W., Thomen**
 956 **L.F., Tobie J. & Walker J.H. 1938.** A critical study of clinical laboratory technics for
 957 the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *The American Journal of*
 958 *Tropical Medicine and Hygiene*, 1(2): 169-183.
- 959 **14 Ferreira F. P., Dias R.C.F., Agostinho T.M., Constantino C., Pasquali A.K.S.,**
 960 **Vidotto O., Freire R.L. & Navarro I.T., 2013.** Frequência de parasitas gastrointestinais
 961 em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. *Semina:*
 962 *Ciências Agrárias*, 34(2): 3851-3858.

- 963 **15 Ferreira J.I.G.D.S., Pena H.F.J., Azevedo S.S., Labruna M.B & Gennari S.M.**
964 **2016.** Occurrences of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic dogs in
965 São Paulo, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(4): 435-440.
- 966 **16 Feitosa, F.L.F. 2014.** *Semiologia Veterinária: a Arte do Diagnóstico*. 3rd ed. São
967 Paulo: Editora Roca Ltda, 2014. pp.644.
- 968 **17 Gibbs, H.C. 1986.** Hypobiosis in parasitic nematodes—an update. In *Advances in*
969 *Parasitology*. (25): 129-174.
- 970 **18 Heukelbach J., Frank R., Ariza L., Lopes Í.S., Silva A.D.A., Borges A.C., Limongi**
971 **J.E., Alencar C.H.M. & Klimpel S. 2012.** High prevalence of intestinal infections and
972 ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil). *Parasitology*
973 *Research*, 111(5): 1913-1921.
- 974 **19 Hotez P.J., Brooker S., Bethony J.M., Bottazzi M.E., Loukas A. & Xiao S. 2004.**
975 Hookworm infection. *New England Journal of Medicine*, 351(8): 799-807.
- 976 **20 Jain, N.C., 1993.** *Essential of Veterinary Hematology*. Pennsylvania: Lea and Febiger,
977 pp. 417.
- 978 **21 Kaneko, J.J., Harvey, J.W & Bruss M.L. 2008.** *Clinical Biochemistry of Domestic*
979 *Animals*. 6th ed. California: Elsevier, pp. 916.
- 980 **22 Kitchen S., Ratnappan R., Han S., Leasure C., Grill E., Iqbal Z. & Hawdon, J.M.**
981 **2019.** Isolation and characterization of a naturally occurring multidrug-resistant strain of
982 the canine hookworm, *Ancylostoma caninum*. *International Journal for Parasitology*,
983 49(5): 397-406.

- 984 **23 Katagiri S. & Oliveira-Sequeira T.C.G. 2008.** Prevalence of dog intestinal parasites
985 and risk perception of zoonotic infection by dog owners in Sao Paulo State, Brazil.
986 *Zoonoses and Public Health*, 55(8-10): 406-413.
- 987 **24 Klimpel S., Heukelbach J., Pothmann D. & Rückert S. 2010.** Gastrointestinal and
988 ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for
989 humans? *Parasitology Research*, 107(3): 713-719.
- 990 **25 Kopp S.R., Kotze A.C., McCarthy J.S., Coleman G.T. 2007.** High-level pyrantel
991 resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Veterinary Parasitology* 2007, 143(3-
992 4): 299-304.
- 993 **26 Labruna M.B., Pena H.F.D.J., Souza S.L.P., Pinter A., Silva J.C.R., Ragozo**
994 **A.M.A., Camargo L.M.A. & Gennari S.M. 2006.** Prevalência de endoparasitas em cães
995 da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. *Arquivos do Instituto*
996 *Biológico*, 73(2): 183-193.
- 997 **27 Landsberg, J.W. & Cross, S.X., 1935.** The blood picture in acute fatal infestations
998 with *Ancylostoma caninum*. *The Journal of Parasitology*, 21(2):130-132.
- 999 **28 Lorenzini G., Tasca T. & De Carli, G.A. 2007.** Prevalence of intestinal parasites in
1000 dogs and cats under veterinary care in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian*
1001 *Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44(2): 137-145.
- 1002 **29 Meyer D.J & Harvey J.** Appendix: Reference Intervals and Conversion Tables In:
1003 *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis*. 3 rd ed. Sant Louis:
1004 Saunders, pp. 305-320.
- 1005 **30 Oliveira-Arbex A.P., David E.B., Oliveira-Sequeira T.C.G., Katagiri S., Coradi**
1006 **S.T. & Guimarães S. 2017.** Molecular identification of *Ancylostoma* species from dogs

- 1007 and an assessment of zoonotic risk in low-income households, São Paulo State,
1008 Brazil. *Journal of Helminthology*, 91(1): 14-19.
- 1009 **31 Prates L., Pacheco L.S., Kuhl J.B., Dias M.L.G.G., Araújo S.M. & Pupulin A.R.T.**
1010 **2009.** Frequency of intestinal parasites in domiciled dogs from Maringá city,
1011 Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(6): 1468-1470.
- 1012 **32 Schad G.A. & Page M.R. 1982.** *Ancylostoma caninum*: adult worm removal,
1013 corticosteroid treatment, and resumed development of arrested larvae in
1014 dogs. *Experimental Parasitology*, 54(3): 303-309.
- 1015 **33 Schmidt E.M., Tvarijonaviciute A., Martinez-Subiela S., Cerón J.J. & Eckersall**
1016 **P.D. 2016.** Changes in biochemical analytes in female dogs with subclinical *Ancylostoma*
1017 spp. infection. *BMC Veterinary Research*, 12(1): 203.
- 1018 **34 Stockham S.L. & Scott M.A. 2011.** *Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária*.
1019 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 792.
- 1020 **35 Traversa D., Di Regalbono A.F., Di Cesare A., La Torre F., Drake J. & Pietrobelli**
1021 **M. 2014.** Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasites & Vectors*,
1022 7(1): 67.
- 1023 **36 Tropical Council for Companion Animal Parasites (TROCCAP).** Guidelines for
1024 the diagnosis, treatment and control of canine endoparasites in the tropics. Disponível em:
1025 [http://www.troccap.com/2017press/wp-content/uploads/2018/04/TroCCAP-Canine-](http://www.troccap.com/2017press/wp-content/uploads/2018/04/TroCCAP-Canine-Endo-Guidelines-English.pdf)
1026 [Endo-Guidelines-English.pdf](http://www.troccap.com/2017press/wp-content/uploads/2018/04/TroCCAP-Canine-Endo-Guidelines-English.pdf). [Acessado em: 02/2019].
- 1027 **37 Willis H.H. 1921.** A simple levitation method for the detection of hookworm
1028 ova. *Medical Journal of Australia*, 2(18).
- 1029



1042 Figure 1. Flow chart of the exclusion criteria application.

Table 1. Comparison of complete blood cell variables between adults dogs with ancylostomosis and the control group (n = 24).

	Group control	Ancylostomosis		P-Value#	RI
	Median±SD	N	Median±SD		
RBC($10^6/\mu\text{L}$)	7,24±0,74	22	6,53±0,74	0,002	5,50-8,50
HT (%)	48±5	23	44±6	0,007	37-55
Hemoglobin (g/dL)	17,0±2,1	23	15,3±2,1	0,007	12-18
MCV (fL)	67,1±3,6	22	67,1±3,4	0,715	60-77
MCHC (g/dL)*	34,6(33,6-35,7)	23	35,1(33,3-35,6)	0,684	32-36
PPT (g/dL)	6,5± 0,5	23	6,7±1,0	0,513	5,5-8
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)*	234(183-263)	20	264(217-322)	0,040	160-430
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	8,55±2,0	23	12,76±4,75	0,001	6,0-17,0
Bands ($10^3/\mu\text{L}$)*	0 (0-0)	23	0 (0-0)	-	0-0,3
Neutrophil ($10^3/\mu\text{L}$)	5,35±1,39	23	8,88±4,07	0,001	3,0-11,5
Lymphocyte ($10^3/\mu\text{L}$)	2,25±0,84	23	1,62±0,97	0,023	1,0-4,8
Eosinophil ($10^3/\mu\text{L}$)*	0,44(0,22-1,04)	23	1,10(0,88-2,10)	0,001	0,1-1,2
Basophil ($10^3/\mu\text{L}$)*	0 (0-0)	23	0 (0-0)	-	Rare
Monocyte ($10^3/\mu\text{L}$)*	0,33(0,20-0,47)	23	0,50(0,37-0,80)	0,006	0,15-1,35

*Nonparametric data: median (25% and 75% percentiles)

Bold numbers are P values <0.05

Mann-Whitney test: comparison of median; Unpaired T test: comparison of mean.

1057 Table 2. Comparison of serum biochemistry variables between adults dogs with
 1058 ancylostomosis and the control group (n = 24).

	Group control	Ancylostomosis			
	Median±SD	N	Median±SD	P-Value#	RI
Urea (mg/dL)	40,0±13,0	15	37,9±10,9	0,588	21 – 59,9
Creatinin (mg/dL)	1,03±0,15	15	0,98±0,25	0,315	0,5 – 1,5
ALT(U/L) *	32(39-45)	16	30(24-38)	0,574	21 – 102
ALP (U/L) *	33(20-38)	14	33(21-69)	0,574	20 – 156
GGT (U/L)	3,3±2,4	15	2,9±1,8	0,588	1,2 – 6,4
PTS (g/dL)	6,1±0,5	16	6,4±1,0	0,223	5,1-7,1
Albumin (g/dL)	3,2±0,4	16	2,8±0,5	0,004	2,6 – 3,3
Globulin (g/dL)	2,9±0,5	16	3,6±1,2	0,014	2,7- 4,4

1059 *Nonparametric data: median (25% and 75% percentiles)

1060 Bold numbers are P values <0.05

1061 # Mann-Whitney test: comparison of median; Unpaired T test: comparison of mean.

1062

1063

1064

1065

1066

1067

4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na população de cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ Unesp-campus Botucatu, o parasita *Ancylostoma* spp. teve como hospedeiros uma população heterogênea de cães, com diferentes idades, acompanhados de coinfeções intestinais e doenças sistêmicas. No presente estudo retrospectivo, a busca por selecionar dados confiáveis (uso de critérios de seleção), e isolar a ação do parasitismo por *Ancylostoma* spp. no cão foram imprescindíveis para confiabilidade dos resultados. No entanto, um número relevante de casos foi descartado devido às informações incompletas disponíveis nos registros médicos, o que acarretou na diminuição do tamanho amostral.

Os resultados da hematologia e bioquímica foram confrontados aos intervalos de referência descritos na literatura para cães conforme a faixa etária. E o mesmo princípio foi utilizado para as comparações dos cães infectados com o grupo controle. Nos poucos estudos que analisaram dados de hemograma e provas bioquímicas nas infecções naturais por *Ancylostoma* spp. ou outros helmintos, não são mencionadas as idades dos cães acometidos e do grupo controle, e mesmo quando citada a idade, cães de diferentes faixas etárias foram alocados no mesmo grupo para testes estatísticos posteriores.

Os filhotes apresentam fisiologicamente menores valores por exemplo de hematócrito, e por volta dos seis a 12 meses seu eritrograma se torna semelhante ao do cão adulto (WEISER, 1995). Antes desse período, se compararmos o hematócrito de cães adultos hígidos ao de filhotes hígidos, estes últimos apresentariam uma falsa anemia. Em relação à albumina, a concentração em filhotes também é menor, e se comparadas ao IR de cães adultos poderia apontar uma falsa hipoalbuminemia. Diferenças quanto ao IR são observadas também no leucograma, pois cães filhotes tem fisiologicamente maior contagem de linfócitos que os adultos. Dadas essas colocações, estudos mais criteriosos devem ser realizados para avaliação de casos de infecção natural, levando em consideração não só a maior susceptibilidade dos filhotes (MILLER, 1965), que culmina em casos mais graves de parasitismo, mas também considerando a idade um fator de confusão na análise de dados relacionados à hematologia e bioquímica sérica.

A partir deste estudo descritivo foi possível compreender as características demográficas (sexo, idade, raça, cidade de origem) e a prevalência de casos positivos para ovos de *Ancylostoma* spp. nas fezes de cães atendidos no hospital veterinário ao longo do tempo. Os achados do exame físico, sinais clínicos e achados laboratoriais mais frequentes, muitas vezes inespecíficos, trazem informações que podem auxiliar na suspeita clínica, bem como em um tratamento mais adequado em cães com ancilostomose clínica. Por fim, mostra-se fundamental a realização de exames coproparasitológicos, não somente para confirmação do diagnóstico dos cães com ancilostomose, mas também para o controle pós-tratamento desta e outras zoonoses transmitidas pelos cães por meio das fezes.

4.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. C., Order Strongylida (the Bursate Nematodes). In *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*. 2 ed. New York: Cabi, 2000. chap.3, p. 41-229.

ADOLPH, C. et al. Diagnostic strategies to reveal covert infections with intestinal helminths in dogs. *Veterinary parasitology*, v. 247, p. 108-112, 2017.

ALVES, D. P.; CARNEIRO, M. B.; DIAS, J. D. C. D. C.; MARTINS, I. V. F. Ocorrência de parasitos de cães recolhidos pelo centro de controle de zoonoses de Cachoeiro de Itapemirim, Estado do Espírito Santo. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 32, n. 2, p.97-100, 2010.

ALVES, A. P. D. S. M.; COELHO, F. A.S.; COELHO, M. D. G. Frequência De Enteroparasitos em fezes de cães coletadas em praças públicas do município de Pindamonhangaba, SP, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 43, n. 3, p. 341–350, 2014.

ARASU, P. Anthelmintic efficacy against tissue-arrested larvae of *Ancylostoma caninum* in murine hosts. *The Journal of Parasitology*, v. 84, n. 6, p. 1263-1267, 1998.

ARASU, P.; HELLER, A. Antibody responses in pregnancy-induced transmammary transmission of *Ancylostoma caninum* hookworm larvae. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 70, n. 3-4, p. 289-298, 1999.

ARAÚJO, J. V. Helmintoses intestinais em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. *Revista Ceres*, v. 53, n. 307, p. 363-365, 2006.

BALASSIANO, B. C. C.; CAMPOS, M. R.; PEREIRA, M. J. S. Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 91, n. 2-4, p. 234-240, 2009.

BARROS, B. A. F.; PEREIRA, J. A.; BARRETO, L. A.; SANTOS, T.C.; CIRNE, BATISTA, L. C. S. O. B. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em fezes de cães coletadas em vias públicas do município de Valença-RJ. *PUBVET*, v.12, n. 9, Art. 169, p. 1-9, 2018.

BLAZIUS, R. D.; EMERICK, S.; PROPHIRO, J. S; ROMÃO, P. R. T; SILVA, O. S. D. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães errantes da Cidade de Itapema, Santa Catarina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 1, p. 73-74, 2005.

BOWMAN, D. D.; MONTGOMERY, S. P.; ZAJAC, A. M.; EBERHARD, M.L.; KAZACOS, K. R. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 4, p.162-167, 2010.

BOWMAN, D. D. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 10 ed. Saint Louis: Elsevier Saunder, 2014. p. 496.

BRAHMBHATT, N. N. Studies on clinico-biochemical aspects of ancylostomosis in dogs. 2015. 69 f. (Dissertation) Master - Anand Agricultural University. Disponível em: <http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/5810054647>.

BRESCIANI, K. D. S.; ISHIZAKI, M. N.; KANETO, C. N.; MONTANO, T. R. P.; PERRI, S. H.V.; VASCONCELOS, R. O.; NASCIMENTO, A. A. Frequência e intensidade parasitária de helmintos gastrintestinais em cães na área urbana do município de Araçatuba, SP. *Ars Veterinaria*, v. 24, n. 3, p. 181-185, 2008.

BRICARELLO, P. A.; MAGAGNIN, E. A.; OLIVEIRA, T.; SILVA, A.; LIMA, L. M. Contamination by parasites of zoonotic importance in fecal samples from Florianópolis Beaches, Santa Catarina State, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 55, n. 1, p. 1, 2018.

BURKE, T.M.; ROBERSON, E.L. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: Experimental infection of the bitch at midpregnancy and at parturition. *International Journal for Parasitology*, v. 15, n. 5, p. 485-490, 1985.

BWALYA, E. C.; NALUBAMBA, K. S.; NALUBAMBA, B. The effects of gastrointestinal helminths on packed cell volume (PCV), eosinophil count and total plasma protein (TPP) in local breed dogs in Zambia. *Journal Veterinary Science and Medical Diagnosis*, v. 3, n. 3, 2014.

CAMPOS, D. R.; OLIVEIRA, L. C.; SIQUEIRA, D. F.; PERIN, L. R.; CAMPOS, N. C.; APTEKMANN, K. P.; MARTINS, I. V. F. Prevalence and risk factors

associated with endoparasitosis of dogs and cats in Espírito Santo, Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 61, n. 3, p. 544-548, 2016.

CASSENTE, A. J. F.; PINTO NETO, J. M.; LIMA-CATELANI, A. R. D. A.; FERREIRA, A.W. Contaminação do solo por ovos de geo-helminthos com potencial zoonótico na municipalidade de Fernandópolis, Estado de São Paulo, entre 2007 e 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 3, p. 371–374, 2011.

CASTRO, J. M. Gastreenterites Parasitárias/ Vermínoses. In: JERICÓ, M. M.; KOGIKA, M. M.; DE ANDRADE NETO, J.P. 2015. *Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos*. Rio de Janeiro: Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2015. cap. 81, p. 735-740.

COELHO, W. M. D.; AMARANTE, A. F. T. D.; APOLINÁRIO, J. D. C.; COELHO, N. M. D.; BRESCIANI, K. D. S. Occurrence of *Ancylostoma* in dogs, cats and public places from Andradina city, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 4, p. 181-184, 2011.

CONSTANTINOIU, C. C.; GOULLET, M. S.; CONSTANTINOIU, E. C.; SCOTT, J. L. Mucosal tolerance of the hookworm *Ancylostoma caninum* in the gut of naturally infected wild dogs. *Parasite immunology*, v. 37, n. 10, p. 510-520, 2015.

CURI, N. H. A.; PASCHOAL, A. M. O.; MASSARA, R. L.; SANTOS, H. A.; GUIMARÃES, M. P.; PASSAMANI, M.; CHIARELLO, A. G. Risk factors for gastrointestinal parasite infections of dogs living around protected areas of the Atlantic Forest: implications for human and wildlife health. *Brazilian Journal of Biology*, v. 77, n. 2, p. 388-395, 2017.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: Opening the black box. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1–25, 2014.

DAVID, É. B.; GUIMARÃES, S.; OLIVEIRA, A. P., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; BITTENCOURT, G. N.; NARDI, A. R. M.; RIBOLLA, P. E. M.; FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; TOSINI, F.; BELLA, A. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, p. 103, 2015.

DE, S.; GUPTA, M. P.; SINGLA, L. D.; SOOD, N. K. Anthelmintic therapy and haemato-biochemical response in dogs with ancylostomosis. *Journal of Veterinary Parasitology*, v. 30, n. 1, p. 21-27, 2016.

DIAS, S. R. C.; CUNHA, D. E. S.; DA SILVA, S. M.; DOS SANTOS, H. A.; FUJIWARA, R. T.; RABELO, É. M. L. Evaluation of parasitological and immunological aspects of acute infection by *Ancylostoma caninum* and *Ancylostoma braziliense* in mixed-breed dogs. *Parasitology Research*, v. 112, n. 6, p. 2151-2157, 2013.

DRACZ, R. M.; MOZZER, L. R.; FUJIWARA, R. T.; DOS SANTOS LIMA, W. Parasitological and hematological aspects of co-infection with *Angiostrongylus vasorum* and *Ancylostoma caninum* in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 200, p. 111-116, 2014.

EUROPEAN SCIENTIFIC COUNSEL COMPANION ANIMAL PARASITES (ESCCAP). ESCCAP Guideline 01 Third Edition -Worm Control in Dogs and Cats. Disponível em: https://www.esccap.org/uploads/docs/0x0o7jda_ESCCAP_Guideline_01_Third_Edition_July_2017.pdf. Acesso em: 30 jul. 2019

FERREIRA, M. A. S.; RODRIGUES, J. S., ANDRADE, R. L. F. S.; JESUS, H. A.; BARROS, S. L. B. Avaliação de endoparasitos em cães domiciliados, de abrigo e errantes na cidade de Aracaju-Sergipe. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 3, n. 3, p. 20-25, 2009.

FERREIRA, F. P.; DIAS R. C. F.; MARTINS, T. A.; CONSTANTINO, C., PASQUALI, A. K. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 2, p. 3851-3858, 2013.

FERREIRA, J. I. G. D. S.; PENA, H. F.J; AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Occurrences of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic dogs in São Paulo, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 25, n.4, p.435-440, 2016.

FUJIWARA, R. T.; GEIGER, S. M.; BETHONY, J.; MENDEZ, S. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite Immunology*, v. 28, n. 7, p. 285–293, 2006.

GEORGI, J. R.; LEJAMBRE, L. F.; RACTLIFFE, L. H. *Ancylostoma caninum* burden in relationship to erythrocyte loss in dogs. *The Journal of Parasitology*, 1205-1211, 1969.

GIBBS, H.C. Hypobiosis in parasitic nematodes—an update. In *Advances in Parasitology*, v. 25, p. 129-174, 1986.

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E. G. L.; REZENDE, G. F. D.; RODRIGUES, M. C. Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. *Revista de Saúde pública* v. 39, p. 293-295, 2005.

HEUKELBACH, J.; FRANK, R.; ARIZA, L.; LOPES, Í. L.; SILVA, A. D. A.; BORGES, A. C.; LIMONGI, J. E.; ALENCAR, C. H. M.; KLIMPEL, S. High prevalence of intestinal infections and ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil). *Parasitology Research*, v. 111, n. 5, p. 1913-1921, 2012.

HOTEZ, P. J.; BROOKER, S.; BETHONY, J. M.; BOTTAZZI, M. E.; LOUKAS, A.; XIAO, S. Hookworm infection. *New England Journal of Medicine*, v. 351, n 8, p. 799-807, 2004.

INPANKAEW, T.; SCHÄR, F.; DALSGAARD, A.; KHIEU, V.; CHIMNOI, W.; CHHOUN, C.; SOK, D.; MARTI, H.; MUTH, S.; ODERMATT, P.; TRAUB, R.J. High prevalence of *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections in humans, Cambodia, 2012. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 6, p. 976-82, 2014.

KATAGIRI, S.; T. C. G. OLIVEIRA-SEQUEIRA. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in Sao Paulo State, Brazil. *Zoonoses and Public Health*, v. 55, n. 8-10, p. 406-413, 2008.

KITCHEN, S.; RATNAPPAN, R.; HAN, S.; LEASURE, C.; GRILL, E.; IQBAL, Z.; HAWDON, J. M. Isolation and characterization of a naturally occurring multidrug-resistant strain of the canine hookworm, *Ancylostoma caninum*. *International Journal for Parasitology*, 49(5), 397-406, 2019.

KLIMPEL, S. HEUKELBACH, J.; POTHMANN, D.; RÜCKERT, S. "Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for humans? *Parasitology Research*, v. 107, n. 3, p. 713-719, 2010.

KOPP, S. R.; KOTZE, A. C.; MCCARTHY, J. S.; COLEMAN, G. T. High-level pyrantel resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 143, p. 299-304, 2007.

LABRUNA, M. B.; PENA, H. F. D. J.; SOUZA, S. L. P.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R.; RAGOZO, A. M. A.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, n. 2, p. 183-193, 2006.

LANDSBERG, J. W; CROSS, S. X. The blood picture in acute fatal infestations with *Ancylostoma caninum*. *The Journal of Parasitology*, v. 21, n. 2, p.130-132, 1935.

LEE, K. T.; LITTLE, M. D.; BEAVER, P. C. Intracellular (muscle-fiber) habitat of *Ancylostoma caninum* in some mammalian hosts. *The Journal of Parasitology*, v. 61, n. 4, p. 589-598, 1975.

LERNER, H.; BERG, C. A comparison of three holistic approaches to health: one health, ecoHealth, and planetary health. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 4, p. 163, 2017.

LLOYD, S.; KRISTENSEN, S.; SOULSBY, E. J. L. The effect of corticosteroid therapy on infection with *Toxocara canis* in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 66, n. 1, p. 57-61, 1981.

LORENZINI, G.; TASCA, T.; CARLI, G. A., 2007. Prevalence of intestinal parasites in dogs and cats under veterinary care in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. 2, p.137-145, 2007.

LOUKAS, A.; HOTEZ, P. J.; DIEMERT, D.; YAZDANBAKHSH, M.; MCCARTHY, J. S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CROESE, J; BETHONY, J. M. Hookworm infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, p. 16088, 2016.

LUCIO-FORSTER, A.; LIOTTA, J. L.; YAROS, J. P.; BRIGGS, K. R.; MOHAMMED, H. O.; BOWMAN, D. D. Morphological differentiation of eggs of *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma tubaeforme*, and *Ancylostoma braziliense* from dogs and cats in the United States. *Journal of Parasitology*, v. 98, n. 5, p.1041-1045, 2012.

MANDARINO-PEREIRA, A.; SOUZA, F. S.; LOPES, C. W. G.; PEREIRA, M. J. S. Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests. *Veterinary Parasitology*, v. 170, n. 1–2, p. 176–181, 2010.

MARTINS, C. M.; BARROS, C. D. C. D.; BIER, D.; MARINHO, A. P.; FIGUEIREDO, J. M. G.; HOFFMANN, J. L.; MOLENTO, M. B.; BIONDO, A.W. Dog parasite incidence and risk factors, from sampling after one-year interval, in Pinhais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v, 21, n. 2, p. 101-106, 2012.

MILLER, T. A. Influence of age and sex on susceptibility of dogs to primary infection with *Ancylostoma caninum*. *The Journal of parasitology*, p.701-704, 1965.

MITTRA, S.; SASMAL, N.K.; SINHA, P.K. 1984. Infectivity of *Ancylostoma caninum* in dogs by different routes of inoculation. *Veterinary Parasitology*, v. 16, n. 3-4, p. 289-293, 1984.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S. Ordem Strongylida. In: MONTEIRO, S. G. *Parasitologia na Medicina Veterinária*, São Paulo: Roca, 2016. cap. 24, p. 233-262.

OLIVEIRA, V. S. F. D.; MELO, D. P. G.; FERNANDES, P.R.; SCHULZE, C. M. B.; GUIMARÃES, M. S.; SILVA, A. C. D. Ocorrência de helmintos gastrintestinais em cães errantes na cidade de Goiânia–Goiás, *Revista de Patologia Tropical*, v. 38, n. 4, p. 279–283, 2009.

OLIVEIRA-ARBEX, A. P.; DAVID, E. B.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; KATAGIRI, S.; CORADI, S. T.; GUIMARÃES, S. Molecular identification of *Ancylostoma* species from dogs and an assessment of zoonotic risk in low-

income households, São Paulo State, Brazil." *Journal of Helminthology*, v. 91, n. 1, p. 14-19, 2017.

OTTO, G. F. Further observations on the immunity induced in dogs by repeated infections with the hookworm, *Ancylostoma caninum*. *American Journal of Hygiene. Section D. Helminthology*, v. 33, n. 2, p. 39-57, 1941.

PEREIRA JUNIOR, G.; BARBOSA, P. S. Prevalência de endoparasitas em cães errantes na cidade de Manaus-Am. *Acta Biomedica Brasiliensia*, v. 4, n. 2, p. 52-57, 2015.

PÖPPL, Á. G.; COELHO, I. C.; DA SILVEIRA, C. A.; MORESCO, M. B.; DE CARVALHO, G. L. C. Frequency of endocrinopathies and characteristics of affected dogs and cats in southern brazil (2004-2014). *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44, p. 1-9, 2016.

PRATES, L.; PACHECO, L. S.; KUHL, J. B.; DIAS, M. L.G. G.; ARAÚJO, S. M.; PUPULIN, A. R. T. Frequency of intestinal parasites in domiciled dogs from Maringá city, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 6, p. 1468-1470, 2009.

PROVIDELO, G. A. *Contaminação ambiental por geo-helminthos em praças do município de Botucatu, São Paulo*. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2019

QADIR, S.; DIXIT, A. K.; DIXIT, P.; SHARMA, R. L. Intestinal helminths induce haematological changes in dogs from Jabalpur, India. *Journal of Helminthology*, v. 85, n. 4), p. 401-403, 2011.

REICHERT, F.; PILGER, D.; SCHUSTER, A.; LESSHAFFT, H.; OLIVEIRA, S.G., IGNATIUS, R.; FELDMIEIER, H. Prevalence and risk factors of hookworm-related cutaneous larva migrans (HrCLM) in a resource-poor Community in Manaus, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, 2016.

SALDANHA-ELIAS, A. M.; SILVA, M. A.; SILVA, V. O.; AMORIM, S. L. A., COUTINHO, A. R.; SANTOS, H. A.; GIUNCHETTI, R. C.; VITOR, R. W. A.; GEIGER, S. M. Prevalence of endoparasites in urban stray dogs from Brazil

diagnosed with leishmania, with potential for human zoonoses. *Acta Parasitologica*, p.1-8, 2019.

SANTARÉM, V. A.; SARTOR, I. F.; BERGAMO, F. M. M. Contaminação, por ovos de *Toxocara* spp, de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n. 6, p. 529-532, 1998.

SCHAD, G. A.; PAGE, M. R. *Ancylostoma caninum*: adult worm removal, corticosteroid treatment, and resumed development of arrested larvae in dogs. *Experimental parasitology*, v. 54, n. 3, p. 303-309, 1982.

SCHMIDT, E. M.; TVARIJONAVICIUTE, A.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D. Changes in biochemical analytes in female dogs with subclinical *Ancylostoma* spp. infection. *BMC Veterinary Research*, v. 12, n. 1, p. 203, 2016.

SHEPHERD, C.; WANGCHUK, P.; LOUKAS, A. Of dogs and hookworms: Man's best friend and his parasites as a model for translational biomedical research. *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2018.

SMOUT, F. A.; THOMPSON, R. A.; SKERRATT, L. F. First report of *Ancylostoma ceylanicum* in wild canids. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 2, p. 173-177, 2013.

SMOUT, F.A.; SKERRATT, L. F.; BUTLER, J. R.; JOHNSON, C. N.; CONGDON, B. C.; THOMPSON, R. A. The hookworm *Ancylostoma ceylanicum*: An emerging public health risk in Australian tropical rainforests and Indigenous communities. *One Health*, v.3, p. 66-69, 2017.

SPRENGER, L. K.; GREEN, K. T.; MOLENTO, M. B. Geohelminth contamination of public areas and epidemiological risk factors in Curitiba, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 1, p. 69-73, 2014.

STALLIVIERE, F. M.; DALLA ROSA, L.; BELLATO, V.; DE SOUZA, A.P.; SARTOR, A. A.; DE MOURA, A. B., 2013. Helmintos intestinais em cães domiciliados e aspectos socioeconômicos e culturais das famílias proprietárias

dos animais de Lages, SC, Brasil. *Archives of Veterinary Science*, v. 18, n. 3, 2013.

STOYE, M. Biology, pathogenicity, diagnosis and control of *Ancylostoma caninum*. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v. 99, n. 8, p. 315-321, 1992.

STOYE, M.; KRAUSE, J. Versuche zur Reaktivierung inhibierter Larven von *Ancylostoma caninum*: Die Wirkung von Oestradiol und Progesteron. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe*. v. 23, n. 10, p. 822-839, 1976.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasitas de cães e gatos. In: *Parasitologia Veterinária*, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap 12, p. 585-662.

TORRICO, K. J.; SANTOS, K. R.; MARTINS, T.; SILVA, F. M. P. E.; TAKAHIRA, R. K., LOPES, R. S. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em cães e gatos na rotina do laboratório de enfermidades parasitárias da FMVZ/UNESP-Botucatu, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 182-183, 2008.

TROPICAL COUNCIL FOR COMPANION ANIMAL PARASITES. *Guidelines for the diagnosis, treatment and control of canine endoparasites in the tropics*. Disponível em: <http://www.troccap.com/2017press/wp-content/uploads/2018/04/TroCCAP-Canine-Endo-Guidelines-English.pdf>.

Acesso em: 20. fev. 2019.

URAL, K.; OZYILDIZ, Z.; YILMAZ, R. Clinical and histopathological findings in German shepherd dogs with hookworm dermatitis and the usage of eprinomectin in the therapy. *Veterinarija ir Zootechnika*, v. 57, n. 79, 2012.

WEISER, M. G. Erythrocyte responses and disorders. In: ETTINGER, S.J; FELDMAN, E.C. (Eds). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 4 th ed. Sant Louis :Sauders Company, 1995. p. 1864-1891.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medicine Journal Australia*, v. 29, p. 375-376, 1921.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Neglected tropical diseases*. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/news/Paediatric-

chewable-medicine-promises-improved-treatment_against/en/>. Acesso em: 29 out. 2018.

YOSHIDA, Y.; OKAMOTO, K.; CHIU, J.K. *Ancylostoma ceylanicum* infection in dogs, cats, and man in Taiwan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 17, n. 3, p. 378-381, 1968.

4.3 ANEXO I

Tabela 1. Intervalo de referência de hemograma para cães maiores de um ano de idade.

Variáveis	Maiores de 1 ano
Hemácias ($10^6/\mu\text{l}$)	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dl)	12 – 18
Hematócrito (%)	37 – 55
VCM (fl)	60 – 77
CHCM (%)	32-36
Proteína (g/dl)	5,5 – 8
Leucócitos ($/\mu\text{l}$)	6.000 - 17.000
Bastonetes ($/\mu\text{l}$)	0 – 300
Segmentados($/\mu\text{l}$)	3.000 – 11.500
Linfócitos ($/\mu\text{l}$)	1.000 – 4.800
Eosinófilos ($/\mu\text{l}$)	100 – 1.250
Basófilos($/\mu\text{l}$)	Raros
Monócitos($/\mu\text{l}$)	150 – 1.350
Plaquetas ($/\mu\text{l}$)*	160.000-430.000

Jain, N.C. 1993. *Essential of Veterinary Hematology*. Pennsylvania: Lea and Febiger, pp. 417.

***Meyer D.J & Harvey J. 2004.** Appendix: Reference Intervals and Conversion Tables In: *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis*. 3rd edition. Sant Louis: Sauders, pp. 305-320.

Tabela 2. Intervalo de referência de bioquímica sérica para cães maiores de um ano de idade.

Variáveis	Maiores de 1 ano*
Proteína total (g/dL)	5,4 – 7,1
Albumina (g/dL)	2,6 – 3,3
Globulina (g/dL)	2,7 – 4,4
Ureia (mg/dL)	21 – 59,9
Creatinina (mg/dL)	0,5 – 1,5
ALT(U/L)	21 – 102
FA (U/L)	20 – 156
GGT (U/L)	1,2 – 6,4

***Kaneko J.J., Harvey J.W & Bruss M.L. 2008.** *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th edition. California: Elsevier, pp. 916.

4.4 Anexo II

Figura 1 - Parecer comitê de ética



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Aspectos clínico-laboratoriais de cães naturalmente infectados por *Ancylostoma* spp. – estudo retrospectivo" **Protocolo CEUA 0074/2019**, a ser conduzido por Bruna dos Santos, responsável/orientador Regina Kiomi Takahira, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	13/05/2019 a 17/07/2019
Nome Comum / Espécie / Linhagem	CANINA / CANIS LUPUS FAMILIARIS /
Raça	Qualquer raça
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	20
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	10-40 kg
Idade	01 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Cães de tutores voluntários residentes em Botucatu

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 13/05/2019

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu