

Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia

Clinical and laboratorial profile of canine monocytic ehrlichiosis of dogs from Salvador and metropolitan region of Bahia State, Brazil

MENESES, Íris Daniela Santos de^{1*}; SOUZA, Bárbara Maria Paraná da Silva²; TEIXEIRA, Carla Maria Moreira¹; GUIMARÃES, José Eugênio³

¹Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Salvador, BA, Brasil.

²Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Salvador, BA, Brasil.

³Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas, Salvador, BA, Brasil.

*Endereço para correspondência: irisdanielasm@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de traçar o perfil clínico e laboratorial para o diagnóstico da erliquiose canina. Utilizaram-se 75 cães, de ambos os sexos, diferentes idades e raças, da cidade de Salvador e região metropolitana, Bahia, incluídos na pesquisa a partir da suspeita clínica e por apresentar infestação de carrapatos ou histórico de exposição prévia ao vetor. Anticorpos anti-*Ehrlichia canis* foram encontrados em 98,66% (74/75) dos animais. A PCR foi positiva em 33,3% (25/75) dos cães, enquanto a presença de mórulas foi positiva em 5,33% (4/75) dos suspeitos. Nos animais com PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) positivo, febre, desidratação, mucosas hipocoradas e petéquias em membranas mucosas ou na pele e anemia, leucopenia, neutropenia, eosinopenia, linfopenia e trombocitopenia foram os sinais clínicos e laboratoriais estatisticamente significantes ($p < 0,05$) mais freqüentemente encontrados.

Palavras-chave: bioquímica clínica, Dot-ELISA, *Ehrlichia canis*, hematologia, PCR

SUMMARY

Canine Ehrlichiosis despite its high morbidity is an illness of great importance in the medical clinic of small animals. The great difficulty for the definitive diagnosis of this disease consists of the little use of more sensible and specific tests considering the clinical signals and more frequent hematological results as exclusive of the illness. This research aimed to provide the clinical-laboratorial profile in the diagnosis of canine ehrlichiosis of 75 dogs, of both sexes, at different ages and races, from Salvador and metropolitan region, Bahia state. The evaluated animals were dogs with clinical suspicion of Ehrlichiosis and tick infestation or description of previous exposition to that vector. Antibodies anti-*E. canis* were found in 98.66% (74/75) of the animals. The PCR was positive in 33.3% (25/75) of the dogs, while the presence of inclusions (morulae) was observed in 5.33% (4/75) of the suspected animals. Fever, dehydration, pale mucous membranes, petechiae of skin and mucous membranes; and anemia, leucopenia, neutropenia, eosinopenia, lymphopenia, and thrombocytopenia were the most significant ($p < 0.05$) clinical and laboratory indicators found in animals with positive PCR.

Keywords: clinical biochemistry, Dot-ELISA, *Ehrlichia canis*, hematology, PCR

INTRODUÇÃO

Grande parte das alterações clínicas que levam animais domésticos aos ambulatórios veterinários corresponde às doenças infecciosas. Dessas doenças, a erliquiose canina se destaca por sua relevância casuística, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (MOREIRA et al., 2003).

A erliquiose monocítica canina tem como agente etiológico a *Ehrlichia canis*, bactéria intracelular que parasita os leucócitos mononucleares, transmitida principalmente pela saliva contaminada do carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. A presença desse vetor no animal caracteriza importante fator de risco para ocorrência da doença (HARRUS et al., 1997a; LABRUNA & PEREIRA, 2001; DAGNONE et al., 2003).

Os sinais clínicos mais comumente observados nos cães acometidos pela erliquiose são apatia, anorexia e emaciação. A doença compreende três fases: fase aguda, quando ocorre a bacteremia, tem como principais alterações hematológicas a anemia, trombocitopenia e leucopenia; fase subclínica, quando se observam elevados títulos de anticorpos, com alterações hematológicas mais discretas, porém sem sintomatologia; e fase crônica, que ocorre quando o sistema imune do hospedeiro não consegue debelar a infecção e apresenta alterações clínicas e laboratoriais mais severas (ANDEREG & PASSOS, 1999; NAKAGHI et al., 2008).

O diagnóstico da erliquiose canina pode ser realizado pela pesquisa de inclusões em esfregaços sanguíneos e papas de leucócitos, pelo isolamento do agente por cultivo celular, por técnicas sorológicas como imunofluorescência indireta (IFI), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), western blotting e, mais recentemente, por técnicas moleculares como a reação da polimerase em cadeia (PCR) (IQBAL & RIKIHISA, 1994; TAKAHIRA et al., 2003; DAGNONE et

al., 2003; MYLONAKIS et al., 2004; MORAIS et al., 2004).

Em decorrência da grande quantidade de animais clinicamente suspeitos para a erliquiose canina na cidade de Salvador, Bahia, e da pouca utilização de testes diagnósticos definitivos pelos clínicos veterinários nesta região, realizou-se este trabalho com o objetivo de traçar o perfil clínico e laboratorial para o diagnóstico da erliquiose canina em cães oriundos da cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 75 cães de ambos os sexos, de diversas raças e idades, provenientes da cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. Durante 15 semanas, no período de junho a setembro de 2005, os animais foram atendidos no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia e em algumas clínicas particulares e avaliados em exame clínico. Os animais foram incluídos na pesquisa quando apresentavam alguma alteração clínica observada pelo proprietário ou confirmada durante consulta ao médico veterinário e, concomitantemente, pela presença ou exposição prévia a carrapatos.

De acordo com o protocolo pré-estabelecido, no momento da consulta clínica, colheu-se sangue periférico da ponta de orelha ou da cauda para a confecção de dois esfregaços sanguíneos com o objetivo de pesquisar mórulas de *Ehrlichia canis*. Foram colhidas também duas amostras de sangue de cada animal por venipunção da radial e/ou jugular: a primeira amostra foi acondicionada em tubo próprio com anticoagulante (EDTA-Na²) para determinações hematológicas e a outra foi acondicionada em tubos de polipropileno, estocada e armazenada (-20°C) para realização de PCR. A segunda amostra foi acondicionada em tubo de ensaio sem

anticoagulante, a qual foi centrifugada para obtenção do soro e posterior utilização nas determinações bioquímicas e sorológicas.

Realizou-se o hemograma com contagem manual de plaquetas e dosagens séricas de proteínas totais (técnica do biureto modificado), albumina (teste colorimétrico verde de bromocresol), transaminases (Frankel & Reitman), creatinina (técnica de Jaffé modificado), uréia (urease modificada) e fosfatase alcalina (Bessey Lowry modificado) utilizando-se *kits* comerciais específicos seguindo recomendações do fabricante. As determinações sorológicas para detecção de IgG anti-*E. canis* foram realizadas pelo teste sorológico comercial DOT-ELISA (ImmunoComb®, Biogal, Israel).

A extração do DNA da *E. canis* nas amostras de sangue com EDTA foi feita com o *kit* comercial (GFX - Genomic Blood DNA Purification Kit). A amplificação do DNA foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), campus de Botucatu, pela técnica Nested PCR com o uso de *primers* específicos para um segmento do 16S rRNA de *E. canis* (BULLA et al., 2004b).

Os resultados obtidos nos animais positivos pela PCR foram analisados estatisticamente utilizando o teste Chi-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) pelo programa estatístico SPSS, versão 12,0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 75 animais suspeitos, 74 (98,67%) apresentaram título de anticorpos anti-*E. canis* detectados no teste DOT-ELISA, resultado bastante próximo ao encontrado na cidade de Jaboticabal, São Paulo (92,3%), e superior aos obtidos em Londrina, Paraná (23,0%), e Ilhéus, Bahia (36%), o que está relacionado ao clima tropical dessas regiões, que favorece o

desenvolvimento do vetor e a transmissão de hemoparasitas (OLIVEIRA et al., 2000; DAGNONE et al., 2003; CARLOS et al., 2007).

Apesar da alta sensibilidade do teste sorológico utilizado, a reação encontrada não distingue uma infecção presente da exposição prévia ao agente, portanto, superestima o número de cães doentes (WEN et al., 1997; WANER et al., 1995).

Os títulos de anticorpos variaram de 1:20 a 1:320, segundo a leitura do teste DOT-Blotting utilizado no estudo. Na erliquiose canina, alto título de anticorpos tem sido observado na fase subclínica, em razão da contínua estimulação antigênica, enquanto a ausência de reação na fase aguda pode indicar o início da soroconversão (LOPEZ et al., 1999; HARRUS et al., 1998, 2004).

A amplificação do DNA da *E. canis* foi confirmada em 25/75 (33,3%) dos animais suspeitos. Esse resultado foi similar (30,9%) ao encontrado por Bulla et al (2004 a,b), em Botucatu, São Paulo, e ligeiramente inferior (44,0%) ao observado em áreas endêmicas nos Estados Unidos e em Jaboticabal (53,3%), São Paulo, utilizando a mesma técnica (WEN et al., 1997; NAKAGHI et al., 2008).

A frequência de cães positivos pela PCR obtida neste trabalho pode ter sido subestimada, pois a amostra analisada (sangue total) não é adequada para cães que se encontram na fase subclínica, em virtude da baixa bacteremia. Harrus et al. (1998, 2004) avaliaram simultaneamente a sensibilidade desta técnica com amostras de diferentes órgãos, como baço, medula óssea e sangue, e constataram maior sensibilidade da técnica quando utilizadas amostras esplênicas, o que pode ser explicado pelo fato de o baço ser o órgão que alberga o parasito antes de sua eliminação do organismo.

Na análise da frequência de anticorpos anti-*E. canis* nos animais positivos pela PCR, não houve relação entre aqueles com títulos elevados com o DOT-BLOTTING e PCR positivo, uma vez que os títulos mais baixos foram os mais

freqüentes (Figura 1). Isto pode ser explicado pelo número de cães na fase aguda que ainda não produziram altos títulos de anticorpos específicos ou que estavam no início da fase subclínica,

quando a *E. canis* se encontra em menor número na circulação sanguínea, e pelo fato de o baço ser o local de replicação (HARRUS et al., 1998; 2004).

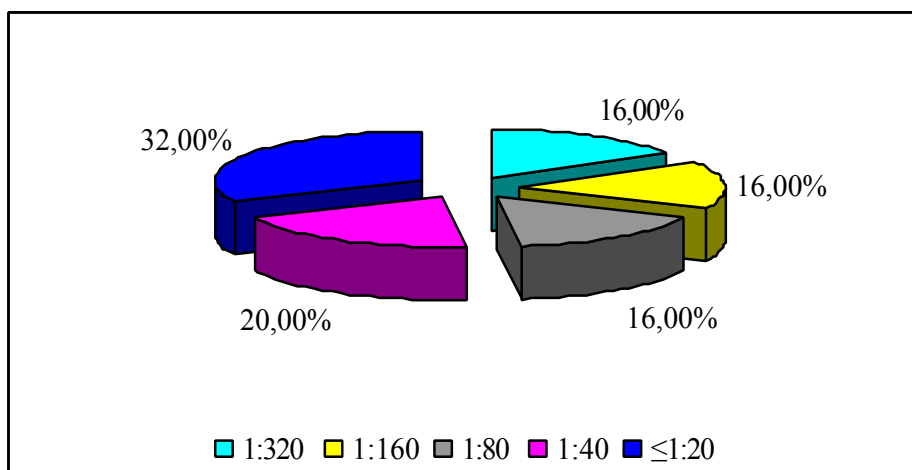


Figura 1. Frequência de títulos de anticorpos *anti-E. canis* obtidos pelo DOT-ELISA em 25 cães positivos pela PCR, na cidade de Salvador e região metropolitana, Bahia, no período de julho a setembro de 2005

Na pesquisa feita em esfregaços de sangue periférico e papas de leucócitos, foram encontradas inclusões sugestivas de corpúsculos elementares e mórulas de *E. canis* e no citoplasma de células mononucleares em 5,33% (4/75) dos animais. Desses, 75% (3/4) foram positivos pela PCR, que pode ser justificado pela subjetividade da técnica parasitológica. Este achado foi inferior ao encontrado por Macieira et al. (2005), de 15,0% e muito próximo ao citado por Harrus et al. (1997a) e Nakaghi et al. (2008), que encontraram apenas 4 e 3,3% dos casos positivos, respectivamente, o que pode ser explicado pela curta duração de parasitemia e da pouca sensibilidade da técnica como método de diagnóstico da infecção. Febre, desidratação, mucosas hipocoradas e petéquias e/ou sufusões em membranas mucosas ou na pele foram os sinais clínicos mais significativos estatisticamente ($p < 0,05$) observados nos animais deste experimento, assemelhando-

se aos encontrados por Harrus et al. (1996); Harrus et al. (1997a, b); Harrus et al. (1998); Oriá et al. (2004); Castro et al. (2004); Nakaghi et al. (2008).

Pirexia é observada em cães infectados em virtude do aumento na produção de interleucinas (IL-1 e IL-6) pelas células apresentadoras de antígenos e pelas células B ou pela presença de pirógenos exógenos produzidos pela bactéria (HARRUS et al., 1998; ALMOSNY & MASSARD, 2002; CASTRO et al., 2004).

Também foram evidentes nos animais membranas mucosas pálidas, que indicam anemia (HARRUS, BARK e WANER, 1997a), assim como manifestações hemorrágicas, que ocorrem secundariamente à trombocitopenia, disfunções plaquetárias e presença de vasculites em múltiplos locais (LAKKAWAR et al., 2003).

Os achados hematológicos como anemia, leucopenia, neutropenia, eosinopenia,

linfopenia e trombocitopenia foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Foi confirmada anemia em 15 dos 25 (60%) animais positivos pela PCR e, destes, 73,33% (11/15) apresentaram anemia do tipo normocítica e normocrômica, o que é comumente achado em cães com erliquiose e descrito na literatura (ALMOSNY & MASSARD, 2002; CABRAL et al., 2002; CASTRO et al., 2004; BULLA et al., 2004 a,b). Acredita-se que a causa da anemia não-regenerativa observada seja multifatorial, como a anemia da inflamação aguda, conseqüência de processo hemolítico ou diminuição da eritropoiese.

Observou-se neste estudo decréscimo dos valores absolutos de quase todos os tipos de leucócitos (não houve somente monocitopenia), o que pode sugerir supressão medular ou aumento da destruição destas células durante a doença (HARRUS et al., 1998).

A linfopenia foi constatada em 44,0% (11/25) das amostras analisadas, semelhante ao encontrado por Bulla (2004a), assim como a eosinopenia, também descrita por Cabral et al. (2002) e evidente neste trabalho em 52% (13/25) dos animais, o que pode caracterizar o envolvimento do estresse da doença na gênese destas alterações hematológicas.

Contagens de plaquetas com valores inferiores a 200.000/ μ L foram encontradas em 60,0% (15/25) dos animais. Este achado é citado em muitos trabalhos na literatura que indicam a importância desta variável hematológica para o diagnóstico presuntivo da doença em áreas endêmicas (ALMOSNY & MASSARD, 2002, DAGNONE et al., 2003, MACIEIRA et al., 2005; BULLA et al., 2004 a, b).

Morfologicamente, observou-se também a presença de anisocitose plaquetária em 64,0% (16/25) dos animais e macroplaquetas em 16,0% (4/25), comprovando que, apesar da tendência à trombocitopenia, há uma trombocitopoeise ativa, anteriormente citado por Harrus et al. (1998).

Considerando os parâmetros bioquímicos analisados neste experimento para avaliar cães infectados com *E. canis*, observa-se que os animais não sofreram alterações significativas, o que indica pouco envolvimento do agente nos órgãos aos quais está relacionados, ou mesmo a fase da doença em que se encontravam estes animais.

Diferentemente dos relatos na literatura, que enfatizam a presença de hiperproteinemia em função de uma hipergamaglobulinemia, alteração comum na fase subclínica da erliquiose, quando a titulação se encontra elevada, neste trabalho não foram observadas alterações nos animais positivos pela PCR.

Considerando o protocolo experimental instituído, o perfil clínico-laboratorial dos animais com erliquiose é semelhante ao encontrado na literatura. Sinais como febre, desidratação, mucosas hipocoradas e petéquias e/ou sufusões em membranas mucosas ou na pele, trombocitopenia, leucopenia com linfopenia e eosinopenia podem servir como teste de triagem para o diagnóstico em cães com suspeita de erliquiose, principalmente em regiões com a presença de carrapato.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Biogal, em especial para Dr. Marco Gallo, À DOLES e ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior (Laboratório Biologia molecular - UNESP-Botucatu).

REFERÊNCIAS

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: Ed.L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p.13-56.

ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F.
Erliquiose canina: a revisão. **Clínica Veterinária**, v.4, n. 19, p. 31-38, 1999.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.;
PAPAROTTO, T.; LANGRAFE, L.;
PAES, P.R.O.; LOPES, R.S. Fase aguda da ehrlichiose monocítica canina: um estudo retrospectivo de 10 anos. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.2, n.6, p.82-85, 2004a.

BULLA, C; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; TRINCA, A.P.; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v.35, p.141-146, 2004b.

CABRAL, D. D. ; KANAYAMA, M.S. ; MUNDIM, A. V. Achados hematológicos e bioquímicos em cães com erliquiose canina atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia-MG. **Revista Horizonte Científico**, v.1, p.1-11, 2002.

CARLOS, R.S.A.; MUNIZ NETA, E.S.; SPAGNOL, F.H.; OLIVEIRA, L.S.; BRITO, R.L.L.; ALBUQUERQUE, G.R.; ALMOSNY, N.R.P. Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia Burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus-Itabuna, State of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.3, p117-120, 2007.

CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.C.T.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v.119, p.1-15, 2004.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.17, p.285-290, 2003.

HARRUS, S; WANER, T; WEISS, D.J.; KEYSARY, A.; BARK, H. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.51, p. 13-20, 1996.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine Monocytic ehrlichiosis: an update. **Continuing Education Article**, v.19, p.431- 438, 1997a.

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic Ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v.141, p.360-363, 1997b.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, p.15-27, 1998.

HARRUS, S; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4488-4490, 2004.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs, 1994. **Veterinary Microbiology**, v. 42, p. 281-287, 1994.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C.
Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, n.30, p24-32, 2001.

LAKKAWAR, A.W.; NAIR, M.G.;
VARSHNEY, K.C.; SREEKRISHNAN,
R.; RAO, V.N. Pathology of canine
monocytic ehrlichiosis in a german
shepherd dog. **Slovak Veterinary
Research**, v.40, n.2, p.123-132, 2003.

LOPEZ, J.; CASTILLO, A; MUNOZ, M.;
HILDREBRANT, S. Hallazgo de
Ehrlichia canis en Chile, informe
preliminary. **Archivos de Medicina
Veterinária**, v.31, n.2, p. 1-5, 1999.

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

MORAIS, H.A.; HOSKINS, J.;
ALMOSNY, N.R.P.; LABARTHE, N.
Diretrizes gerais para diagnóstico e
manejo de cães infectados por *Ehrlichia
spp.* **Clínica Veterinária**, n.48, p.28-30,
2004.

MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.;
ARAÚJO, R.B.; SANTOS, M.; PASSOS,
L.M.F. Retrospective study (1998-2001)
on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte,
MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de
Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.25,
n.2, p.141-147, 2003.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.;
BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY,
B.C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.S.
Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia
canis*): A retrospective study of 19 natural
cases. **Journal of the American Animal
Hospital Association**, n.40, p.174-184,
2004.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.;
COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.;
BALDANI, C.D. Canine Ehrlichiosis:
clinical, hematological, serological and
molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38,
n.3, p.766-770, 2008.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, T.; COSTA,
M. T.; MACHADO, R. Z.; CASTRO,
M.B. Anti- *Ehrlichia canis* antibodies
detection by “ Dot-Elisa” in naturally
infected dogs. **Revista Brasileira de
Parasitologia Veterinária**, v. 9, n.1, p.1-5,
2000.

ORIÁ, A.P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J.L.
Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia
canis*. **Ciência Rural**, v. 34, n.4, p.1289-
1295, 2004.

TAKAHIRA, R.K.; LOPES, R.S.;
COSTA, C.L.; KOHAYAGAWA, A.;
GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I. F.;
LOURENÇO, M.L.G. Detecção de
anticorpos contra *Ehrlichia platys* e
Ehrlichia canis em cães. **Nosso Clínico**,
v.32, p.34-38, 2003.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D.J.;
BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration
of serum antiplatelet antibodies in
experimental acute canine ehrlichiosis.
**Veterinary Immunology and
Immunopathology**, v.48, p.177-182,
1995.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.;
GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.;
COUTO, C. G.; UNVER, A.; BARTSCH,
R. Comparison of nested-PCR with
immunofluorescent-antibody assay for
detection of *Ehrlichia canis* infection in
dogs treated with doxycycline. **Journal
of Clinical Microbiology**, v. 35, n.7,
p.1852-1855, 1997.

Data de recebimento: 28/12/2007

Data de aprovação: 08/09/2008