

IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E SOROLÓGICA (DOT-BLOT ELISA) NO DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE EM CÃES

IMPORTANCE OF EVALUATION HAEMATOLOGICAL AND SEROLOGICAL
(ELISA dot-blot) IN THE DIAGNOSIS OF EHRlichiosis IN DOGS

José Geraldo Meirelles Palma ISOLA

Doutorando do programa de Cirurgia Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista – FCAV UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. email: jgmpi@ig.com.br

Fabiano Antônio CADIOLI

Departamento de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, FMV UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Ana Paula NAKAGE

Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Esse estudo comparou a análise hematológica e sorológica no diagnóstico da *Ehrlichia canis*. A pesquisa da *Ehrlichia canis* foi feita em esfregaços sanguíneos de 150 cães. O teste sorológico foi realizado em 12 amostras selecionadas por meio de hemograma com contagem inferior a 170.000 plaquetas/uL. O teste sorológico foi realizado com o kit Imunocomb – Dot-blot-ELISA. Nenhuma inclusão citoplasmática característica de mórula de *E. canis*, foi encontrada nos esfregaços sanguíneos. Na avaliação sorológica, oito amostras tiveram titulação positiva para *E. canis*, concluindo-se que a trombocitopenia é um achado hematológico importante no diagnóstico da erliquiose e a detecção de mórulas intraleucocitárias em esfregaços é infreqüente. A avaliação sorológica Dot-blot ELISA é rápida e precisa, sendo um dos métodos de auxílio-diagnóstico de erliquiose canina mais indicado na rotina clínica veterinária.

Palavras chave: *Erlichia canis*, Cão, Hemoparasitose, Sorologia, Dot-Blot ELISA

ABSTRACT

This study compared the hematological and serological analysis of diagnosis of canine ehrlichiosis. The survey of *Ehrlichia canis* was performed through the evaluation of blood smears from 150 dogs. The serological test was performed on 12 samples selected by the platelet count (less than 170,000 platelets / uL). Serologic testing was performed with the Imunocomb kit - Dot-blot-ELISA. No cytoplasmatic inclusion characteristic of morula of *E. canis* was found in blood smears. In serologic testing, eight samples were positive for *Ehrlichia canis*, concluding that thrombocytopenia is an important hematological finding of ehrlichiosis diagnosis and the detection of *Ehrlichia canis* morulae is uncommon. The serological evaluation Dot-blot ELISA is an accurate and brief diagnosis method of canine ehrlichiosis, been the most appropriate to be used in veterinary practice routine.

KEY WORDS: *Erlichia canis*, Dog, Hemoparasitosis, Serology, Dot-Blot ELISA

INTRODUÇÃO

A erliquiose é uma hemoparasitose que atinge cães, gatos, equinos, ruminantes e humanos, sendo assim, considerada uma zoonose. Há um relato recente de pelo menos seis casos clínicos de erliquiose humana na Venezuela, causada por *E. canis* (PEREZ et al., 2005).

A erliquiose canina é causada pela rickettsia *Ehrlichia canis* (CASTRO, 1997; MENDONÇA et al., 2005; GARCIA FILHO et al., 2010). Esses microorganismos são parasitas intracelulares obrigatórios de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, tais como monócitos e macrófagos e, para algumas espécies, em células mielóides, tais como neutrófilos (ANDEREG; PASSOS, 1999; DUMLER et al., 2001; MACHADO, 2004; MENDONÇA et al., 2005; AGUIAR et al., 2007), singularmente ou pela agregação de corpúsculos fundamentais firmemente envoltos por uma membrana que lhes confere, microscopicamente, um aspecto de mórula (JAIN, 1993; ANDEREG; PASSOS, 1999; MENDONÇA et al., 2005; NAKAGHI et al., 2008).

Os cães infectados com *E. canis* podem desenvolver sinais brandos a intensos ou mesmo não apresentar sinais, dependendo da fase da doença em que se encontram (JAIN, 1993; GARCIA FILHO et al., 2010). A gravidade da doença depende da cepa infectante, da idade do animal, da suscetibilidade e da alimentação. Através de estudos baseados nos sinais clínicos e patológicos, foi possível distinguir três fases da doença, a aguda, a subclínica e a crônica (JAIN, 1993; ANDEREG; PASSOS, 1999; ORIÁ, 2001).

Na fase aguda os sinais clínicos são febre, anorexia, depressão, linfadenopatia e trombocitopenia (JAIN, 1993; NAKAGHI et al., 2008). Essa fase geralmente passa despercebida e no final da quarta semana, aproximadamente, os sinais clínicos desaparecem. Entretanto, os parasitas permanecem no animal. Esta é a principal fase onde se consegue identificar mórulas do parasita em leucócitos através de esfregaços sanguíneos (ORIÁ, 2001; NAKAGHI et al., 2008). No hemograma, observa-se freqüentemente, uma trombocitopenia entre 10 a 20 dias após a infecção, em consequência da destruição imunológica periférica das plaquetas. Nesta fase, a anemia presente é do tipo normocítica normocrômica regenerativa, devido à perda de sangue (MENDONÇA et al., 2005).

A fase subclínica é caracterizada pela persistência da *Ehrlichia canis* no animal. Nessa fase o animal parece saudável, pois os sintomas são mais brandos, podendo ocorrer leve perda de peso. É nesta fase que se observa alta concentração de anticorpos para *E. canis* no sangue dos cães infectados (JAIN, 1993).

Ao final da fase subclínica, instala-se a fase crônica, com sinais clínicos severos, devido à ineficiência do sistema imune do animal. Nesta fase, dificilmente encontra-se inclusões de mórulas de *Ehrlichia canis* nos leucócitos (MACHADO, 2004).

O diagnóstico da erliquiose canina pode ser realizado através da presença de mórulas nos leucócitos parasitados encontrados na avaliação de esfregaços sanguíneos (MACHADO, 2004; MOREIRA et al., 2005; NAKAGHI et al., 2008; GARCIA FILHO et al., 2010), por testes de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ALVES, 2005; NAKAGHI et al., 2008) e ainda outros testes como os de sorologia do tipo ELISA, ou ainda pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) de anticorpos, que consiste em uma técnica sensível, que detecta anticorpos anti - *Ehrlichia canis*, através do soro do sangue do animal e hoje é a mais utilizada em todo o mundo (ORIÁ, 2001; NAKAGHI et al., 2008). A detecção de mórulas da *E. canis* em células mononucleares através de esfregaços sanguíneos, é achado circunstancial, dada sua infrequência (JAIN, 1993; ORIÁ, 2001). Na rotina clínica, os médicos veterinários levam em consideração o valor da contagem de plaquetas, pois um dos principais sinais da erliquiose é a trombocitopenia (JAIN, 1993; CASTRO, 1997; MENDONÇA et al., 2005).

Hoje, existem no mercado, diversos “kits” sorológicos utilizados na detecção da erliquiose canina, como, por exemplo, o “kit” Immunocomb, baseado na técnica de “Dot-blot-ELISA”, que é capaz de determinar anticorpos da classe IgG específicos para o agente infectante (CASTRO, 1997; MACHADO, 2004). De acordo com resultados encontrados por Aguiar et al. (2007) e Nakaghi et al. (2008) é reforçada a possibilidade do uso de testes sorológicos como auxiliares no diagnóstico da erliquiose canina, desde que aliados ao histórico e ao exame clínico do cão. O sucesso do tratamento depende da precocidade do diagnóstico, o que leva a uma melhora do prognóstico. Como tratamento, existem algumas drogas empregadas por hospitais e clínicas veterinárias no Brasil para esse fim, tais como a tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e dipropionato de imidocarb. Destas

drogas, a tetraciclina e seus derivados são mais amplamente empregados. A doxiciclina é a droga de eleição nos casos de pacientes que apresentam afecções renais (ANDEREG; PASSOS, 1999; MACHADO, 2004).

Assim, neste ensaio buscou-se estudar a importância da avaliação hematológica e sorológica (Dot-blot-ELISA) no diagnóstico da erliquiose canina em cães que apresentam trombocitopenia.

MATERIAL E MÉTODOS

As parcelas experimentais foram 100 cães, adultos, machos e fêmeas, encaminhados à rotina de atendimento clínico do “Campus Veterinário do Centro Universitário Barão de Mauá” e 50 cães, adultos, machos e fêmeas, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão Preto, encaminhados ao “Campus Veterinário do Centro Universitário Barão de Mauá”.

O sangue dos cães foi colhido por punção da veia cefálica com agulha descartável (25 x 7) e acondicionado em tubo plástico contendo anticoagulante EDTA 10%. Imediatamente após a colheita, o material foi submetido ao “Laboratório de Patologia Clínica do Campus Veterinário do Centro Universitário Barão de Mauá” para realização do hemograma.

A avaliação hematológica foi realizada através de contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas pela técnica de hemocitômetro; determinação do hematócrito pelo método de microhematócrito, contagem diferencial de leucócitos em esfregaços sangüíneos corados com May Grunwald Giemsa (MGG) e determinação de proteínas totais por refratometria.

A pesquisa da *Ehrlichia canis* foi realizada através da avaliação dos esfregaços sangüíneos do sangue total, sangue periférico (ponta da orelha) e papa leucocitária das parcelas experimentais.

A avaliação sorológica foi realizada em 12 cães selecionados aleatoriamente dentro do grupo de cães que apresentavam trombocitopenia (contagem de plaquetas menor que 170.000 plaquetas/uL). O teste sorológico foi realizado com o kit Imunocomb – Dot-blot-ELISA para determinação de anticorpos IgG específicos para o agente infectante de *E. canis*.

Os dados obtidos para contagem global de hemácias, leucócitos e plaquetas; contagem diferencial de leucócitos; determinação do volume globular e determinação de proteínas totais foram analisados através da estatística descritiva básica com o intuito de caracterizar as variáveis referidas acima.

RESULTADOS

Após a avaliação hematológica dos 150 animais selecionados, analisando-se as contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas pela técnica de hemocítmetro, a determinação do hematócrito pelo método de microhematócrito, a contagem diferencial absoluta de leucócitos em esfregaços sangüíneos corados com May Grunwald Giemsa (MGG) e determinação de proteínas totais por refratometria, selecionou-se ao acaso, 12 animais que apresentassem trombocitopenia (contagem de plaquetas menor que 170.000 plaquetas/uL) para realização do exame sorológico Dot-blot-Elisa, cujos respectivos resultados estão apresentados no quadro 1.

Cão	He (x10 ⁶ /uL)	Ht (%)	Leu (x10 ³ /uL)	NS (/uL)	NB (/uL)	EOS (/uL)	BAS (/uL)	MON (/uL)	LINF (/uL)	PLAQ (x10 ³)	PT (g/dL)
1	4,380	23	7,850	5887	157	550	0	157	1099	120,000	8,0
2	5,250	31	23,000	14030	230	3220	0	460	5060	150,000	5,4
3	3,200	12	13,100	10742	31	131	0	131	1965	90,000	6,2
4	4,200	23	5,150	4017	103	773	0	0	258	110,000	6,2
5	3,105	17	6,100	5307	122	0	0	0	671	100,000	4,0
6	5,850	39	6,100	5246	305	0	0	61	488	140,000	8,0
7	6,800	39	18,800	16168	188	376	0	188	1880	140,000	9,6
8	4,900	30	14,700	12789	0	294	0	147	1470	120,000	5,2
9	4,600	29	6,150	4428	123	431	0	61	1107	160,000	8,4
10	7,600	47	14,250	10403	285	1283	0	285	1995	120,000	7,6
11	3,300	23	24,200	15488	0	242	0	484	7986	120,000	6,0
12	6,200	38	10,250	7585	308	922	0	0	1435	70,000	7,8
Média	4,94	29,25	12,47	9340,8	154,33	685,16	0	164,5	2117,8	120.000	6,86
Desvio											
Padrão	1,44	10,22	6,72	4491,3	111,91	885,25	0	167,48	2222,6	25,58	1,61

Quadro 1. Valores individuais, médios e desvios-padrão da contagem total de hemácias, leucócitos, leucócitos diferenciais absolutos, plaquetas e os valores dos hematócritos e proteína total das 12 amostras de sangue selecionadas para serem avaliadas com o teste Dot-blot-Elisa

Na pesquisa de hemoparasitas, não foi encontrada nenhuma inclusão citoplasmática, característica de mórula de *E. canis*, nos esfregaços de sangue periférico, ponta de orelha e papa de leucócitos de nenhuma das 150 amostras.

Na avaliação sorológica do tipo ELISA das doze amostras selecionadas, somente quatro apresentaram titulação negativa para *Ehrlichia canis*. As oito restantes tiveram titulação positiva de anticorpos IgG de *E. canis*, sendo que, uma amostra apresentou título de imunofluorescência (IF) igual a 1:320, uma amostra teve titulação semelhante a 1:640 e as outras seis demonstraram título IF equivalente a 1:1280.

DISCUSSÃO

A erliquiose canina é uma hemoparasitose de alta incidência na rotina clínica veterinária causada pela rickettsia *Ehrlichia canis*, que causa prejuízos à saúde animal e humana (CASTRO, 1997; MENDONÇA et al., 2005). Entretanto, Gieg et al. (2009) relataram um caso de erliquiose canina em um filhote de Pastor Alemão em Ohio, causado por *Ehrlichia ewingii*, que ao contrário da *E. canis*, pode ser encontrada em neutrófilos e ocasionalmente em eosinófilos no sangue, fluidos articulares e no líquido cérebro espinhal. Para um bom prognóstico desta doença, se faz necessário o diagnóstico rápido e preciso. Portanto, neste ensaio estudamos a importância da avaliação hematológica e sorológica de *Ehrlichia canis* no diagnóstico da erliquiose canina.

A avaliação hematológica consistiu na análise do eritrograma, leucograma, trombograma e pesquisa da *Ehrlichia canis* nos esfregaços de sangue total, ponta de orelha e papa leucocitária. A avaliação sorológica do tipo ELISA foi realizada em doze amostras do total de 150, que apresentassem trombocitopenia, uma vez que é um dos principais sinais da erliquiose devido à destruição imunológica periférica das plaquetas (JAIN, 1993; CASTRO, 1997; GARCIA FILHO et al., 2010).

Em relação ao eritrograma das doze amostras selecionadas para a pesquisa com o teste sorológico, os valores médios e desvios-padrão da contagem de hemácias, foram respectivamente $4,94 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 1,44 \times 10^6/\mu\text{L}$, concordando com os valores referidos por Feldman et al. (2000) e Mendonça et al. (2005). Os valores do hematócrito e de proteína total foram respectivamente $29,25\% \pm 10,22\%$ e $6,86 \text{ g/dL} \pm 1,61 \text{ g/dL}$, também

corroborando com os respectivos valores citados por Feldman et al. (2000) e Nakaghi (2004).

Quanto ao leucograma, os resultados médios dos leucócitos globais e diferenciais absolutos, juntamente com seus respectivos desvios-padrão, estão em concordância com os valores referenciais apresentados por Feldman et al. (2000) e Castro et al. (2004).

No trombograma, o valor médio e desvio-padrão da contagem de plaquetas das doze amostras selecionadas foram, respectivamente, $120,00 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 25,58 \times 10^3/\mu\text{L}$, sendo semelhantes àqueles referidos por Castro et al. (2004) e Nakaghi (2004).

Na pesquisa das mórulas intraleucocitárias de *Ehrlichia canis* nos esfregaços de sangue total, ponta de orelha e papa leucocitária, nenhuma mórula de *E. canis* foi encontrada. Porém, os cães avaliados podem apresentar erliquiose, já que a identificação de mórulas de *Ehrlichia canis* nos esfregaços sangüíneos ocorre de maneira circunstancial principalmente na fase aguda desta hemoparasitose e é dificilmente encontrada na fase crônica (ORIÁ, 2001; MACHADO, 2004; NAKAGHI, 2004; MOREIRA et al., 2005; NAKAGHI et al., 2008).

As amostras de doze cães trombocitopênicos foram avaliadas sorologicamente, sendo que, apenas quatro apresentaram titulação negativa para a moléstia e as oito amostras restantes, demonstraram sorologia positiva para *Ehrlichia canis*, indicando que estes oito animais tiveram ou têm contato com o agente infectante. Os cães sorologicamente positivos clinicamente sadios podem estar na fase subclínica da erliquiose e os que apresentaram sinais clínicos característicos da hemoparasitose podem estar nas fases aguda ou crônica (JAIN, 1993; MACHADO, 2004; NAKAGHI et al., 2008).

De acordo com Oriá (2001) e Machado (2004), comparativamente à Reação de Imunofluorescência Indireta, o “Dot-blot-ELISA” é mais sensível no diagnóstico da *E. canis*, sendo o método sorológico mais indicado para o diagnóstico da erliquiose canina na rotina clínica veterinária. Entretanto, de acordo com resultados de Aguiar et al. (2007), a técnica ELISA apresentou menor sensibilidade quando comparada à Reação de Imunofluorescência Indireta.

Este estudo, corroborando com Machado (2004) e Nakaghi et al. (2008), que encontraram positividade de 70% a 92,31% com o Dot-blot Elisa dos cães com suspeita de

erliquiose canina contra 63,33% a 66,67% de positividade para os mesmos casos com a Reação de Imunofluorescência Indireta, considera o Dot-Elisa sensível na detecção de positividade para infecção de *Ehrlichia canis*, além de ser uma técnica rápida e fácil de ser empregada na rotina clínica para o diagnóstico da erliquiose canina.

CONCLUSÃO

A trombocitopenia é um achado hematológico importante no diagnóstico da erliquiose canina. A detecção de mórulas intraleucocitárias de *Ehrlichia canis* nos esfregaços sanguíneos é infrequente, ocorrendo ocasionalmente em especial na fase aguda da hemoparasitose e dificilmente encontrada na fase crônica. Assim, os métodos mais confiáveis para o diagnóstico da Erliquiose canina são os exames sorológicos ou de biologia molecular. A avaliação sorológica Dot-blot ELISA é rápida e precisa, sendo um dos métodos de auxílio-diagnóstico de Erliquiose canina mais indicado na rotina clínica veterinária.

AGRADECIMENTOS

Ao PIC – Programa de Iniciação científica do Centro Universitário Barão de Mauá, pela bolsa de iniciação científica destinada ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**. v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.

ALVES, L.M.; LINHARES, G.F.C.; CHAVES, N.S.T; MONTEIRO, L.C.; LINHARES, D.C.L. Avaliação de Iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**. v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.

ANDEREG, P.; PASSOS, L. Erliquiose canina: revisão. **Revista Clínica Veterinária**. São Paulo, n. 19, p. 31-38, 1999.

CASTRO, M.B. **Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães, por *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQARD, 1935) MOSKRESKI 1945**. 1997. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

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**. Amsterdam, 2004.

DUMLER, J.S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HEG agente as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 51, p. 2145-2165, 2001.

FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G, JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2000.

GARCIA FILHO S.P., DIAS M.A., ISOLA J.G.M.P., MATINS L.L. Erliquiose canina: Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. 14, n. RC07, 2010.

GIEG, J., RIKIHISA, Y., WELLMAN, M. Diagnosis of *Ehrlichia ewigii* infection by PCR in a puppy from Ohio. **Veterinary Clinical Pathology**. p. 1-5, 2009

JAIN, N.C.; **Essentials of veterinary hematology**. Cap. 6 The Plates; 1^oed., Philadelphia: Lea & Febinger, p. 105 – 132, 1993.

MACHADO, R.Z. Erliquiose Canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, supl.1, 2004.

MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Erliquiose Canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**. v. 21, n. 1, p.167-174, 2005.

MOREIRA, S.M. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**. v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.

NAKAGHI, A.C.H. **Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de *Ehrlichia canis* em cães com suspeita clínica de erliquiose**. 2004. 63F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração: Patologia Animal) – FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP.

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. 766-700, 2008.

ORIÁ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência indireta e Dot-blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis***. 2001. 89f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

PEREZ, P. et al. *Ehrlichia canis* detection in symptomatic humans in Venezuela. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL

DISEASES, 4., 2005, Logroño, Espanha. **Anais...** Logroño: American Society for Rickettsiae and Rickettsiology, 2005. P. 45.