

## Correlação dos achados clínicos e hematológicos com diagnóstico definitivo de erliquiose canina por meio de PCR

### Correlation of clinical and hematological with definitive diagnosis of canine ehrlichiosis by PCR

Carla Fredrichsen Moya-Araujo<sup>1\*</sup>; Gustavo D'Alessandro Hernandez Batista<sup>2</sup>;  
Márcio Garcia Ribeiro<sup>3</sup>; Tiago Torrecillas Sturion<sup>1</sup>;  
Daniel César Araújo<sup>2</sup>; João Pessoa Araújo Júnior<sup>4</sup>

#### Resumo

A Erliquiose é uma doença cosmopolita de grande importância na clínica médica veterinária, sendo uma importante enfermidade infecciosa, cuja prevalência tem aumentado significativamente nos últimos anos nos estados brasileiros. Devido a esse fato, o presente trabalho teve o intuito de correlacionar os achados hematológicos, sinais clínicos e PCR, sendo este último o mais sensível. No trabalho foram avaliados 20 cães com suspeita de Erliquiose que foram atendidos no setor de Moléstias Infecciosas do Hospital Veterinário da UNESP – Campus Botucatu SP, durante oito semanas. Dos animais citados, 65,00% (13/20) foram positivos em exame da PCR, nestes os achados clínicos mais evidentes foram 76,92% (10/13) anorexia, 53,84% (7/13) hepatoesplenomegalia, 46,15% (6/13) apatia e 38,46% (5/13) epistaxes. Dos treze animais positivos na PCR 92,30% (12/13) apresentaram-se trombocitopênicos (<150.000 plaquetas) e 61,53% (8/13) anêmicos (<5.50 x10<sup>6</sup>). Frente ao exposto, conclui-se que a técnica de PCR foi um bom método diferencial na detecção de Erliquiose canina podendo ser adotada, juntamente com os achados clínicos e hematológicos para o diagnóstico preciso da enfermidade em questão.

**Palavras-chave:** *Ehrlichia canis*, PCR, canino

#### Abstract

The Ehrlichiosis is a worldwide diseases of great importance in a veterinary medicine is an important infectious diseases whose prevalence has increased significant in the last year in the Brazilian states. Due to the fact that this study was designed to correlate the findings hematological clinical signs and PCR, being the most sensitive. This study evaluated twenty dogs seen at veterinary hospital UNESP – Botucatu campus during the 03 from august to September 28 2009. Animal cited 65% were positive in the PCR test. Among the most prominent clinical findings 76.92% (10/13) with anorexia, 53.84% (7/13) with hepatoesplenomegaly, 46.15% (6/13) with apathy and 38.46% (5/13) epistaxis. The thirteen animals positive PCR 92.30% (12/13) showed thrombocytopenia (<150.000 platelets) and 61.53 (8/13) anemic (<5.50 x10<sup>6</sup>). Thus, we conclude that the PCR was a good method for detection differential canine ehrlichiosis may be adopted together with the clinical and hematological findings for the accurate diagnosis of the disease.

**Key words:** *Erlichia canis*, PCR, canine

<sup>1</sup> Profs. da Faculdades Integradas de Ourinhos, FIO, Ourinhos, SP. E-mail: carlafredrichsen@yahoo.com.br; tiagotsturion@hotmail.com

<sup>2</sup> Discente(s) da FIO, Ourinhos, SP. E-mail: gustavodhb@hotmail.com; dcaguelzinho@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Prof. da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP. E-mail: mgribeiro@fmvz.unesp.br

<sup>4</sup> Prof. do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP. E-mail: jpessoa@ibb.unesp.br

\* Autor para correspondência

## Introdução

A Erliquiose é uma doença riquetsial infecciosa severa que acomete os cães, causada pela *Erlichia*, sendo a principal a *Erlichia canis*. Sua incidência vem aumentando significativamente nos últimos anos, em todas as regiões do Brasil. Foi descrita pela primeira vez na Argélia em 1935 e no Brasil em 1973, hoje é conhecida como uma doença de grande importância mundial (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

A Erlichiose canina é transmitida pela picada do carrapato, mais especificamente o carrapato marrom dos cães, o *Rhipicephalus sanguineus*, que inocula o microrganismo por meio de sangue infectado para um cão sadio no momento do repasto. O carrapato pode transmitir a *E. canis* por mais de cinco meses após o ingurgitamento com sangue infectado (MOREIRA; MACHADO; PASSOS, 2005).

Após um período de incubação da enfermidade de 8 a 20 dias onde o agente intracelular obrigatório, se replica no interior das células sanguíneas mononucleares e nos órgãos do sistema monocítico-fagocitário (SMF) sendo eles: fígado, baço e linfonodos (GREGORY; FORRESTER, 1990; CORRÊA; CORRÊA, 1992). Além de infectar monócitos e linfócitos a *E. canis* causa alteração da membrana celular das plaquetas, eritrócitos e leucócitos levando a uma hiperestimulação antigênica contra essas células, pela alteração do sistema complemento e formação de complexos auto-ímmunes, desencadeando lise e fagocitose das células infectadas ou não (GREGORY; FORRESTER, 1990; NEER, 1999).

A infecção por *E. canis* pode ser classificada em três fases: aguda, sub-clínica e crônica. Na fase aguda, ocorre vasculite decorrente da migração de células mononucleares infectadas para pequenos vasos. A fase sub-clínica pode persistir por até cinco anos em cães naturalmente infectados. Apesar de alguns cães apresentarem o microrganismo na circulação sanguínea durante esta fase, às vezes persiste de forma intracelular, resultando na fase crônica da infecção (NELSON; COUTO, 2001). Os

achados clínicos da doença podem ser febre, apatia, anorexia, linfodepatia, sensibilidade abdominal, vômito, diarreia e epistaxe. As alterações hematológicas mais frequentemente observadas em infecções naturais são anemia, trombocitopenia e leucopenia (ALMOSNY, 2002).

O presente trabalho teve por objetivo realizar um levantamento dos casos suspeitos de Erliquiose canina atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu – SP no período de 03 de agosto a 25 de setembro de 2009, comparando os sinais clínicos e as alterações hematológicas dos animais positivos por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR).

## Materiais e Métodos

Utilizaram-se cães de ambos os sexos, de diversas raças e idades, provenientes da cidade de Botucatu – SP e região. Durante oito semanas, no período de agosto a setembro de 2009, os animais que foram atendidos na área de Moléstias Infecciosas (MI) do Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu com suspeita de Erliquiose, após serem avaliados durante exame clínico e, concomitantemente, pela presença ou exposição a carrapatos, sem tratamento prévio para a enfermidade foram incluídos na pesquisa.

Foram colhidas duas amostras de sangue de cada animal por venopunção da radial e/ou jugular, que foram acondicionadas em tubo próprio com anticoagulante (EDTA-Na<sub>2</sub>) sendo um para determinações hematológicas, conforme metodologia descrita por Coles (1986) e outro para a realização de PCR, que foi estocado em geladeira a 5°C. Realizou-se o hemograma com contagem manual de plaquetas e dosagem de proteínas totais (técnica do biureto modificado). A amplificação do DNA foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu – SP, pela técnica Nested PCR com o uso de *primers* específicos para um segmento do 16S rRNA de *E. canis* (BULLA et al., 2004).

A PCR foi realizada de acordo com o descrito por Doyle et al. (2005), visando à amplificação de fragmento de 409 pares de base (pb) do gene *dsb* de *Ehrlichia spp.*, utilizando-se os iniciadores Dsb-330 (5'- GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e Dsb-728 (CTG CTG GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT-3'). As amostras com fragmentos amplificados de 409 pb foram submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos em sequenciador automático de DNA (ABI Prism 310 Genetic Analyser – Applied Biosystems/Perkin Elmer), conforme instrução do fabricante. As sequências obtidas foram comparadas pelo *Blast Analysis* com outras sequências de *Ehrlichia spp.* disponíveis no GenBank, utilizando-se o programa MegAlign do pacote Lasergene R versão 8.0 para windows (DNASTAR, EUA).

Os sinais clínicos, as alterações hematológicas e os resultados de PCR foram comparados para a avaliação do diagnóstico da Erliquiose canina.

## Resultados e Discussão

Dos 20 casos atendidos na área de MI da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu – SP com suspeita de Erliquiose apenas 65% (13/20) foram positivos no exame de PCR.

Devido a grande variação nos achados hematológicos, optou-se por padronizar como

limitante o nível mínimo de cada parâmetro e dessa forma comparar cada variante com os resultados de PCR (tabela 1). Analisando os dados obtidos no exame hematológico, observou-se que 61,53% (8/13) dos animais com anemia, 61,53% (8/13) com VG % baixo, 92,30% (12/13) com trombocitopenia e 84,61% (11/13) com leucopenia foram positivos no exame de PCR. Contudo dos 20 animais com suspeita de Erliquiose atendidos apenas 60% (12/20) possuíam trombocitopenia e eram positivos no exame de PCR para tal enfermidade. Frente a esses valores, a trombocitopenia não é o único parâmetro para o diagnóstico de Erliquiose, pois 36,84% (7/19) dos animais com plaquetas abaixo de 150.000 foram negativos no exame de PCR, que é considerado uma peça útil para a elaboração do diagnóstico da enfermidade. Esta técnica permite um diagnóstico rápido e com sensibilidade de 99,99% (IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA, 1994; WEN et al., 1997). Apesar disso, Breitschwerdt (1997), relataram que a trombocitopenia é a alteração hematológica mais consistente tanto na fase aguda como na fase crônica, sendo adotada por muitos Médicos Veterinários como base no diagnóstico da Erliquiose. Ou diferentemente disso Bulla et al. (2004) consideram que os achados clínicos e outros métodos diagnósticos associados a trombocitopenia são necessários para a determinação da enfermidade.

**Tabela 1.** Resultado do exame de PCR em relação aos achados de exame hematológico dos 20 casos atendidos com suspeita de Erliquiose, na área de MI da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu – SP.

Parâmetros	Limitante	PCR positivo	PCR negativo	Total
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /mL)	<5,50	8	5	13
	>5,50 ≤ 8,5	5	2	7
VG (%)	<37,0	8	3	11
	>37,0 ≤ 55,0	5	4	9
PT (g/dL)	<6,0	0	1	1
	>6,0 ≤ 8,0	13	6	19
Plaquetas	<150.000	12	7	19
	>150.000	1	0	1
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /mL)	<6,0	11	4	15
	>6,0	2	3	5

Fonte: Elaboração dos autores.

De acordo com Davoust (1993) a linfocitose intensa, acompanhada de linfócitos atípicos ou reativos, foi associada com Erliquiose, porém nesse estudo nenhum animal apresentou aumento no número de linfócitos, sendo a leucopenia predominante nos animais positivos, corroborando com os achados de Almosny (2002).

Durante o exame clínico dos animais suspeitos foram observadas as seguintes alterações: apatia, anorexia, hipertermia, hepatoesplenomegalia, vômito, diarreia, epistaxe, petéquias e sufusões (tabela 2). Quando se realizou a associação com os resultados de PCR positivo, observou-

se que 38,46% (5/13) dos animais apresentavam epistaxe, 76,92% (10/13) anorexia, 53,84% (7/13) hepatoesplenomegalia, 38,46% (5/13) hipertermia, 46,15% (6/13) apatia, 23,07% (3/13) vômito, 30,76% (4/13) petéquias e sufusões e 38,46% (5/13) diarreia. A literatura cita que a hipertermia (39,5 a 41,5°C), anorexia, perda de peso, sangramentos espontâneos, hematúria, edema de membros, vômitos, anemia, hepatomegalia e esplenomegalia, uveíte e sinais neurológicos causados por meningoencefalomielite são sinais clínicos que normalmente se associam a Erliquiose (COUTO, 1998; BELLAH; SHULL; SELCER, 1994), corroborando com os achados desse estudo.

**Tabela 2.** Resultado do exame de PCR em relação aos achados clínico dos 20 casos atendidos com suspeita de Erliquiose, na área de MI da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu – SP.

	PCR positivo	PCR negativo	Total
Apatia	6	6	12
Anorexia	10	5	15
Hipertermia	5	3	8
Hepatoesplenomegalia	7	4	11
Vômito	3	2	5
Diarreia	5	4	9
Epistaxe	5	1	6
Petéquias e Sufusões	4	2	6

**Fonte:** Elaboração dos autores.

Em estágios de cronicidade da Erliquiose, os animais podem ter o exame de PCR negativo do sangue periférico, em função do agente causador encontrar-se no baço, o que justificaria a presença de falsos negativos da PCR em cães testados (HARRUS et al., 1998). Os exames laboratoriais nesses casos indicam trombocitopenia, anemia aplásica, concomitante a leucopenia (GREGORY; FORRESTER, 1990). Nenhum animal negativo no exame de PCR desse experimento apresentou um quadro de pancitopenia, conforme os achados de literatura, dessa forma os falsos negativos foram desconsiderados, uma vez que os animais desse

estudo não tinham histórico anterior da doença nem mesmo um tratamento prévio para tal enfermidade, sendo assim a infecção crônica foi desconsiderada, tendo em vista que nessa fase, para o diagnóstico preciso são recomendadas as técnicas sorológicas (NAKAGHI et al., 2008).

Mediante aos resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que a técnica de PCR foi um bom método diferencial na detecção de Erliquiose canina podendo ser adotada, juntamente com os achados clínicos e hematológicos para o diagnóstico preciso da enfermidade em questão.

## Referências

- ALMOSNY, N. R. P. *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. 120 p.
- BELLAH, J. R.; SHULL, R. M.; SELCER, E. V. S. Immunisation of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 52, n. 1-2, p. 79-90, 1994.
- BREITSCHWERDT, E. B. Riquetsioses. In: ETTINGER, R. S.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária. moléstias do cão e do gato*. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 422-429.
- 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*, Paris, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.
- COLES, E. H. *Patologia clínica veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 566 p.
- CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. 842 p.
- COUTO, C. G. Doenças rickettsiais. In: BIRCHARD, J. S.; SHERDING, G. R. *Manual saunders: clínica de pequenos animais*. São Paulo: Roca, 1998. p. 139-142.
- DAVOUST, B. Canine ehrlichiosis. *Point Vét.*, Toulon Armées, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.
- DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; McBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor taqman real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *Journal of Molecular Diagnostics*, Galveston, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.
- GREGORY, C.; FORRESTER, S. O. *Ehrlichia canis*, *E. equi*, *E. risticii* infections. In: GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 404-414.
- HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Rehovot, v. 62, n. 1, p. 15-27, 1998.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other test for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, Columbus, v. 32, n. 7, p. 1658-1663, 1994.
- MOREIRA, S. M.; MACHADO, R.; PASSOS, L. F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.
- NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinicals, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.
- NEER, T. M. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Louisiana, v. 13, n. 5, p. 501-504, 1999.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Distúrbios dos nervos periféricos e da junção neuromuscular. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). *Medicina interna de pequenos animais*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 73, p. 819-828.
- WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A. BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.*, Columbus, v. 35, n. 7, p. 1952-195, 1997.

