

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E PERFIL PLAQUETÁRIO EM CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DAS FIO

MOLECULAR DIAGNOSIS AND PROFILE OF *Ehrlichia canis* PLATELET IN DOGS SERVED IN THE VETERINARY HOSPITAL

¹OLIVEIRA, S.L.; ¹SILVA, L.E.; ²GATTI, L.L.

¹ Graduandas do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas de Ourinhos
² Professor Doutor, do Departamento de Ciências Biológicas e Farmácia e Gestor dos Laboratórios de Análises Clínicas e Biologia Molecular - Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar dados hematológicos com dados moleculares de Erliquiose Canina de animais atendidos na rotina do Hospital Veterinário das FIO. Esta é uma zoonose causada pela *Ehrlichia canis* e tem como seu transmissor o *Rhipicephalus sanguineus*. Para realização do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizado doze amostras de sangue, dentre elas quatro (33%) apresentaram positividade mostrando a amplificação genética do parasita, sendo três machos (75%) e uma fêmea (25%). Com a observação dos dados hematológicos pode se analisar que três (75%) dos animais apresentaram trombocitopenia, alteração esta esperada, uma vez que este é a principal alteração hematológica esperada em casos de animais com Erliquiose, sendo os pacientes que apresentaram positividade foram encaminhados para o Clínico para o tratamento.

Palavras-Chave: Erliquiose. Diagnóstico. Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare hematological data with molecular data Canine Ehrlichiosis animals routinely attended at the Veterinary Hospital of the FIO. This is a zoonosis caused by *Ehrlichia canis* and has as its transmitter *Rhipicephalus sanguineus*. For performing the method of Polymerase Chain Reaction (PCR) twelve blood samples, among them four (33%) were positive showing gene amplification of the parasite, three males (75%) and female (25%) was used. With the observation of hematological data can be analyzed that three (75%) of the animals showed thrombocytopenia, this expected change, since this and the main hematological abnormalities expected in cases of animals with Ehrlichiosis, and patients who tested positive were referred for the Clinic for treatment.

Keywords: Ehrlichiosis. Diagnosis. Polymerase Chain Reaction.

INTRODUÇÃO

A erliquiose canina é causada pela *Ehrlichia canis*, sendo o *Rhipicephalus sanguineus* seu transmissor. (BEER,1998).

O ciclo evolutivo completo do *Rhipicephalus sanguineus* é de 2 a 3 meses e constitui a fase dos ovos, da larva hexápode, da ninfa octópode e adulto (FORTES, 2004).

As larvas de seis patas alimentam-se no cão por alguns dias, caem e mudam para o estágio ninfal de oito patas. As ninfas alimentam-se no cão por uma semana,

caem e transformam-se em adultos machos e fêmeas. As fêmeas são fecundadas no cão, alimentam-se durante três semanas e ficam muito ingurgitadas com sangue antes de cair ao solo para depositar seus ovos. Os ovos emergem da abertura genital um por vez e se acumulam na frente do carrapato fêmea por mais algumas semanas. (BOWMAN, 2010).

A *E. canis* se desenvolve nos leucócitos e/ou nas glândulas salivares do carrapato vermelho ou marrom do cão. Essa infecção ocorre quando as secreções salivares entram em contato com seu ponto de fixação durante o repasto sanguíneo ou pela transfusão de sangue (ETTINGER; FELDMAN, 2004)., e em seguida a mesma faz inclusão citoplasmática principalmente nos monócitos formando mórulas no hospedeiro (CORRÊA, 1992).

Seu período de incubação é de até três semanas constituindo uma progressão rápida, dividida em fase aguda, subaguda e crônica. Na fase aguda (2 à 3 semanas) o parasita se multiplica nas células e dissemina-se, ocorrendo hiperplasia linforreticular no fígado, baço e linfonodos, vasculite, migração de células brancas para o subendotélio e trombocitopenia. Na fase subaguda (6 à 9 semanas) a persistência do parasita no hospedeiro acarreta trombocitopenia e leucopenia variável. Na fase crônica, ocorre a infiltração linforreticular e plasmocitária encontrada em muitos órgãos, hipergamaglobulinemia, pancitopenia e depressão da medula óssea. (CORRÊA, 1992).

Os sinais clínicos mais comuns são fluxo nasal seroso e/ ou mucopurulento, fotofobia acompanhado de lacrimejamento bilateral seroso e a seguir purulento, vômitos (BEER,1998). , taquicardia, taquipnéia, hiperestesia e transtorno nervoso central provocando tremores musculares e sangramento das meninges (CORRÊA, 1992).

Segundo Ettinger e Feldman (2004), o diagnóstico da erliquiose exige a visão das mórulas, a detecção dos anticorpos contra a *E. canis* ou da amplificação do DNA da *E. canis* ou da *E. chaffeensis* por meio da PCR.

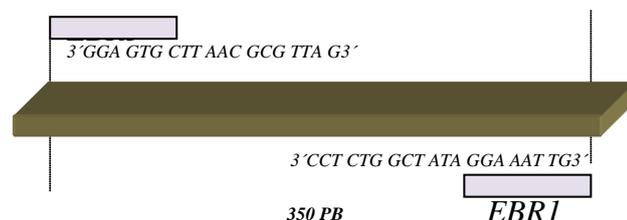
Visto a importância da erliquiose canina como uma zoonose, o presente trabalho teve como objetivo comparar os dados hematológicos (contagem de plaquetas) com dados moleculares dos cães atendidos no Hospital Veterinário das FIO do período de julho de 2013 a abril de 2014.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 10 ml de sangue periférico de 12 cães atendidos em rotina do Hospital Veterinário das FIO (machos e fêmeas aleatórios, de acordo com a solicitação do Médico Veterinário) e acondicionados em tubos de ensaio com anticoagulante EDTA com o objetivo de realizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para detecção do material genético de *E. canis* e realização do Hemograma Completo. Para amplificação do fragmento gênico (DNA) de *E. canis*, foi utilizado sequência de *primers* descrita na literatura; Os primers utilizados para amplificação foram: *Primer EBR5* : GGA GTG CTT AAC GCG TTA G - 19 bases e *Primer EBR1* : CCT CTG GCT ATA GGA AAT TG - 20 bases. As condições padronizadas para Realização da PCR, foram: - Um ciclo único inicial de 94C, durante 5 minutos, para promover a desnaturação total das fitas de DNA; - 35 ciclos, nas seguintes temperaturas e tempo: 94C durante 1 minuto (para desnaturação), 54C durante 1 minuto (para associação do *primer* específico, delimitando a sequência a ser amplificada), 72C durante 1 minuto (de extensão para ação da Enzima *Taq* DNA polimerase, para amplificação dos fragmentos copiados)- Um ciclo final de 72C por 7 minutos de extensão. Após a realização dos ciclos da PCR espera-se uma amplificação de um fragmento de DNA de 751pb (pares de bases). As condições da PCR e *primers* utilizados para amplificação encontram-se esquematizados na Figura 1. Os resultados dos Hemogramas, foram obtidos através da verificação dos laudos emitidos no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário das FIO.

Figura 1. Ciclagem da PCR e fragmento amplificado através da utilização dos Primers específicos.

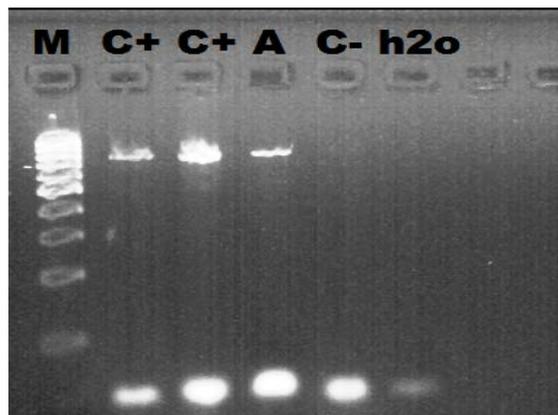
Ciclos: 94C – 5 minutos, 35 ciclos: 94C – 1 minuto, 54C – 1minuto, 72C – 1 minuto, 7 minutos 72C de extensão.



RESULTADOS

Foram colhidos e analisados através da Técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), amostra de sangue periférico de 12 cães, sendo 8 machos e 4 fêmeas. O DNA genômico foi extraído e a PCR realizada com a utilização de primers específicos, com a amplificação de um fragmento de 751pb, conforme observado na Figura 2.

Figura 2. Gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídeo, e observado em transluminador com luz ultra-violeta, onde C+, referem-se a controles internos positivo, C-, controle negativo (água estéril) e A (demonstrando uma amostra com amplificação do fragmento de 751pb, referente a positividade do teste).



Das 12 amostras analisadas, apresentou-se positividade para amplificação do material genético 4 amostras (33%), sendo 3 machos (75%) e 1 fêmea (25%). Os dados laboratoriais do Hemograma foram obtidos através da análise do Laudo e os resultados encontram-se demonstrados na tabela abaixo (Quadro 1):

Quadro 1. Demonstração dos Resultados da PCR com Contagem de Plaquetas e Leucócitos.

Sexo	Idade	PCR	Plaquetas	Leucócitos mm³
Macho	9	Negativo	75.000	3.500
Macho	N.I	Negativo	380.000	4.650
Macho	11	Negativo	155.000	6.200
Macho	5	Negativo	425.000	9.600
Macho	9	Positivo	65.000	5.800
Macho	N.I	Positivo	100.000	9.500
Fêmea	N.I	Positivo	100.000	8.000
Fêmea	N.I	Negativo	210.000	10.300
Fêmea	8m	Negativo	69.000	6.900
Macho	N.I	Positivo	195.000	3.000
Macho	2	Negativo	195.000	6.300
Fêmea	N.I	Negativo	50.000	6.400

Comparando os resultados da PCR, com a contagem total de plaquetas, observou-se que das 4 amostras PCR positiva, 3 (75%), apresentaram no hemograma, contagem de plaquetas inferiores ao valor normal de referência (175.000 a 500.000), resultado este esperado, uma vez que a principal manifestação hematológica em casos de erliquiose é a diminuição do número de plaquetas. Quanto a contagem de leucócitos total, não foi observado nenhuma correlação entre a positividade do teste de PCR com o valor total de leucócitos.

DISCUSSÃO

A erliquiose canina é uma das principais enfermidades infecciosas, devido a sua prevalência (BANDEIRA, 2003). É uma moléstia ricketisial infecciosa que geralmente se caracteriza por redução dos elementos sanguíneos (SAITO, 2009). Dentre as alterações hematológicas relatadas com maior frequência, destacam-se a anemia arregenerativa. (WANER; STRENGER; KESARY, 2000; MOREIRA; BASTOS; ARAÚJO, 2003; ORIÁ; PEREIRA; LAUS, 2004) e, em menor frequência, a anemia regenerativa (WANER; STRENGER; KESARY, 2000).

O sangue coletado dos animais com suspeita de erliquiose, foram encaminhado para o laboratório de Biologia Molecular do Hospital Veterinário das FIO, para a realização do exame de PCR. Dentre os doze que foram encaminhados,

quatro (33%) apresentaram positividade com amplificação genética, sendo três (75%) machos e uma (25%) fêmea.

Em um estudo semelhante realizado por Sousa VRF et al (2010) foram analisados 195 cães, destes apenas 48 foram positivos, sendo 18 machos e 29 fêmeas. Nesta infecção os cães mais acometidos eram adultos e idosos pois houve maior tempo de exposição ao vetor da *E.canis*, dentre os infectados 4 não apresentaram sinais clínicos e o restante apresentaram apatia, anorexia, febre, palidez nas mucosas, esplenomegalia, distúrbios oftálmicos, trombocitopenia e leucopenia.

Analisando os dados hematológicos das doze amostras dos animais pode-se observar que a maioria estava com a doença na fase aguda, onde apresentavam trombocitopenia (alteração esperada em casos de erliquiose), porém não observaram variação no número total de leucócitos. Um caso em especial apresentou a doença na fase subaguda, onde constatou trombocitopenia, leucocitopenia e alteração do número de hemácias. Possivelmente depois de diagnosticados os animais foram encaminhados para o tratamento com Doxiciclina.

CONCLUSÃO

Pelo exposto, podemos concluir que as análises clínicas não apresentam um diagnóstico confiável para Erliquiose canina, pois há outras patologias que apresentam os mesmos sinais, sendo assim necessária a técnica da PCR para a possível confirmação da amostra.

REFERÊNCIAS

ACCETA, E.M.T.; ***Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães (Canis familiaris***

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. 1. ed. São Paulo: Roca. 1999.p. 418-419.

BOWMAN, D.D. **Georgis parasitologia veterinária**. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.p. 52-54.

CHAVES, L.A.; LEITE, R.A.C.; NAVECA S.A. **Erliquiose canina**. Manaus. 2007. (Trabalho monográfico de conclusão do Curso de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais), Qualittas Instituto de Pós-Graduação.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 477-486

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5. ed. Vol1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 425-426. 2004.

FIGUEIREDO, M.R.; **Babesiose e erliquiose caninas**. Rio de Janeiro. 2011. (Trabalho monográfico do curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" em Clínica Médica de pequenos animais), apresentado a Qualittas.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4ª Edição. São Paulo: Ícone Editora, 2004. 503 p.

GALANT, P.R.; **Erliquiose monocítica canina**. Porto Alegre. 2010. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Linnaeus,1758) trombocitopênicos da região dos lagos do Rio de Janeiro. Seropédica. 2008. Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

MOYA-ARAUJO, C.F; BATISTA, D.G.H.; SILVA, S.J. **Erliquiose em cães**. Ourinhos. 2011. (Revisão de Literatura), Faculdades Integradas de Ourinhos.

SILVA, F.M.F.; et al. **Diagnóstico clínico de erliquiose canina associada à imunossupressão após descompressão de cauda equina**. Pernambuco. 2009. Relato de caso (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, M. V. M.; FERNANDES, R. A.; NOGUEIRA, J. L.; AMBRÓSIO, C. E. Erliquiose canina: revisão de literatura. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 139-143, 2011.

SOUSA, V.R.F.; et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.6, p.1309-1313, 2010.