



DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *EHRlichia CANIS* EM CÃES DO MUNICÍPIO DE MINEIROS-GO.

Wellen Dhiane de Freitas Arantes¹

Ísis Indaiara Gonçalves Granjeiro Taques²

Amanda Noeli Da Silva Campos³

Daniel Moura de Aguiar⁴

Karla Irigaray Nogueira Borges⁵

Isis Assis Braga⁶

RESUMO: A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença causada pela bactéria *Ehrlichia canis* a qual é transmitida aos cães, através do repasto sanguíneo pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. O presente estudo visou pesquisar a presença de *Ehrlichia* spp. em cães do município de Mineiros o qual foi coletado amostras de sangue de 50 animais provenientes do Consultório Veterinário de Mineiros. As amostras foram submetidas aos testes de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), as quais demonstraram positividade em 24% (12/50) e 80% (40/50), respectivamente. Este é o primeiro estudo realizado nesta região, sendo considerada área endêmica.

Palavras-chave: Cão. Carrapato. Erliquiose. PCR. RIFI

INTRODUÇÃO

No Brasil, EMC é causada pela bactéria *Ehrlichia canis*, tendo como vetor o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. É uma bactéria Gram negativa, vista como parasita intracelular obrigatório das células mononucleares (ANDEREG; PASSOS, 1999; ALMOSNY, 2002). Encontra-se disseminada em quase todo o território brasileiro, afirmou

¹ Acadêmica de Medicina Veterinária na UNIFIMES. e-mail: wellen_dhiane@hotmail.com

² Doutoranda na Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFMT. e-mail: isis_indaiara@hotmail.com

³ Residente do Laboratório de Virologia e Rickettsioses da UFMT. e-mail: amanda.noeli@hotmail.com

⁴ Docente Adjunto do curso de Medicina Veterinária na UFMT. e-mail: danmoura@ufmt.br

⁵ Docente Assistente do curso de Medicina Veterinária na UNIFIMES. e-mail: karla@fimes.edu.br

⁶ Docente Adjunto do curso de Medicina Veterinária na UNIFIMES. e-mail: isis@fimes.edu.br

Macedo et al. (2005) sendo descrita por Costa pela primeira vez em 1973, no estado de Minas Gerais em Belo Horizonte (COSTA, 1973).

O período de incubação é de 8 a 20 dias, o cão infectado com *E. canis* demonstra alguns sinais sistêmicos, que se inicia na fase aguda podendo chegar até a fase crônica, quando se multiplica dentro das células mononucleares circulantes e do fígado, do baço e dos linfonodos, induzindo linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular (BREITSCHWERDT, 2004). Os sinais clínicos são inespecíficos (WANER; STRONGER; KESARY, 2000).

Portanto, o atual estudo tem como finalidade investigar as espécies de *Ehrlichia* spp. que estão circulando em cães do município de Mineiros-Go, com o intuito de trazer melhorias para a rotina veterinária, realizando exames adequados com tratamentos de acordo com o diagnóstico e com isso diminuir o uso indiscriminado de antibióticos pelos médicos veterinários, melhorando assim a qualidade de vida dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

No decorrer dos meses de janeiro e junho de 2017, foram analisados randomicamente 50 cães atendidos no Consultório Veterinário de Mineiros. Nesta ocasião foram obtidas informações da anamnese (idade, sexo, raça, peso, vacinação, vermifugação, presença de ectoparasitos (carrapato), acesso à rua e o habitat do animal), exame físico (temperatura corporal, avaliação das mucosas, palpação de linfonodo e baço e entre outras). Além disso, foram coletadas amostras sanguíneas por meio de venopunção da cefálica, para análise molecular.

As amostras sanguíneas foram submetidas ao processo de extração de DNA utilizando Kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” de acordo com as normas do fabricante. Foi usada uma técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase, com o intuito de amplificar 176pb do gene *dsb* de *Ehrlichia canis*; *dsb*-330 (5'-GATGATGTTTGAAGATATGAAACAAAT-3') e *dsb*-481 (5'-TGCTTGTAATGTAGTGCTGCAT-3') de acordo com Doyle et al. (2005).

A amplificação resultante das reações foi visualizada em Gel de Agarose com tampão de corrida. Após a corrida, o gel foi corado e visualizado sob luz ultravioleta (UV) em câmara escura.

Para a Reação de Imunofluorescência Indireta, foram feitas lâminas, sendo estas confeccionadas de acordo com Aguiar et al. (2007), no laboratório de Virologia e Doenças

infeciosas do Hospital Veterinário (HOVET), na Universidade Federal de Mato Grosso. Foi usado para a confecção dessas lâminas a cepa São Paulo de *E. canis* (AGUIAR et al. 2008). Em cada lâmina serão adicionados soros controles sabidamente positivo e negativo.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Do total de 50 amostras, 24% (12/50), foram positivas na PCR para *Ehrlichia canis*, e dessas 66,6% (8/12) fêmeas e 33,3 (4/12) machos, demonstrando em cães jovens 33,3% (4/12), nos adultos 58,33% (7/12) e idosos 8,33% (1/12), sendo esses animais de raça 58,33% (7/12) e raças indefinidas 41,66% (5/12).

Para a RIFI, também foram avaliadas 50 amostras, 80% (40/50) sendo positivas para *Ehrlichia* spp., e dentre elas 55% (22/40) fêmeas e 45% (18/40) machos, confirmando em cães jovens 25% (10/40), adultos 60% (24/40) e nos idosos 15% (6/40), referindo-se animais de raça 47,5% (19/40) e raças indefinidas 52,5% (21/40).

A alta ocorrência evidenciada neste estudo, deve-se ao fato de que a *E. canis* prevalece em países de clima temperado, tropical e subtropical do mundo, coincidindo com a prevalência do seu vetor (ALMOSNY, 2002), ressaltando que a região do estudo apresenta clima e umidade propícia para o desenvolvimento do vetor *R. sanguineus*.

De acordo com Silva (2001) e Silva et al. (2010), a susceptibilidade da doença vai depender da raça e da faixa etária do animal. Foi observado um aumento de títulos de anticorpos de acordo com avanço da faixa etária dos cães, o mesmo foi averiguado por Aguiar et al. (2007) e Silva et al. (2010), o que confirma o fato de que cães mais velhos apresentam mais tempo de exposição ao vetor e conseqüentemente terão o maior risco de infecção. Apesar de animais fêmeas e de raça definida terem sido mais frequentes à infecção, autores não associam a predisposição sexual e/ou a raça à uma maior chance da infecção (HARRUS et al.,1997; SILVA et al.,2010; SOUSA, 2006).

A técnica de PCR permite um diagnóstico preciso, podendo ser usada para detectar o DNA específico do microorganismo (NELSON; COUTO, 1998; ALVES et al. 2004). Neste caso, a PCR é essencial para saber o antígeno presente, por isso foi possível detectar a presença de *E. canis* na área de pesquisa. A RIFI detecta a presença de IgG no soro, e dentro dessa pesquisa a *Ehrlichia*. spp, foi encontrada. Acredita-se que títulos maiores que 1:40 podem insistir por até 9 a 12 meses pós infecção (BIRCHARD; SHERDING, 1998; NELSON; COUTO, 1998; ALVES et al. 2004).

Ao contrário da PCR, a RIFI é indicada para a detecção de casos mais crônicos, uma vez que a formação de anticorpos inicia somente entre 1 a 3 semanas após a infecção (MCBRIDE et al., 1996), o que explica a maior frequência de cães positivos detectada na RIFI em relação aos animais positivos na PCR.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo, observa-se a infecção de cães por *Ehrlichia* spp, levantando em consideração de que estes animais atuam como reservatório para esses agentes. As hemoparasitoses são responsáveis por alta morbidade e mortalidade em cães de todo o mundo, por isso é importante fazer o diagnóstico diferencial com outras enfermidades, para realizar o tratamento adequado. Concluindo assim, o primeiro estudo realizado em Mineiros-Goiás.

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, M. L.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. L. Avaliação de Indicadores e Protocolo para o Diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**. v.6, n.1, 2004. p. 49-54.
- ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Rio de Janeiro: **NDL.F**. Livros, 2002.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Canine ehrlichiosis – a review. **Revista Clínica Veterinária**, n. 19, p. 31-38, 1999.
- BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Manual Saunders: **Clínica de Pequenos Animais**. 1ed. São Paulo: Roca, 1998. 1591p.
- BREITHSCHWERDT, Edward B. Riquetsioses. In: ETTINGER, Stephen J; FELDMAN, Edward C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, p. 424-426, 2004.
- COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infections in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivo da Escola Superior de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**. v. 25, n. 2, p. 185-197, 1973.

COUTO, C.G. Doenças Rickettsiais In: BIRCHARD, SHERDING, **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. Roca: 139-42, 1998.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: na update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 36, p. 431-447, 197.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. **Carrapatos em cães no Brasil**. Clin Vet n.30, p.24-32, 2001.

MACEDO, A. B.; LEAL, E.R.V. Ehrlichiose canina: estudo retrospectivo e principais achados hematológicos. **Revista Nosso Clínico**, n.45, p. 30-34, 2005.

MCBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-Kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnosis antigen. **Clinical and Diagnostic laboratory Immunology**, v. 6, n. 3, p. 392-399, 1999.

SILVA, V. L. D. D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose Canina**. 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, J. N. da et al. Soroprevalência de anticorpos anti-ehrlichia canis em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p.108-111, 2010.
SOUSA, V. R. F. **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por Ehrlichia canis e Anaplasma platys**. 2006. 46 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

WANER, T.; STRENGER, C.; KESARY, A. Comparison of a clinicbased ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *ehrlichia canis* antibodies in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 3, p. 240-244, 2000.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R. Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs Treated with Doxycycline. **Journa of Clinical Microbiology**, v.35,p.;35:1852-1855,1997.