

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n11a957.1-6>

Diagnóstico comparativo de *Ehrlichia* spp. para construção de soroteca

Vanessa Alessandra de Barros Portela¹ , Camila Pereira dos Santos² , Emanuel Servio Coqueiro dos Santos², Ivone de Mello Queiroz² , Catarina Paula da Silva Ramos² , Thais Melquiades de Lima³ , Bárbara Ferreira de Almeida⁴ , Amanda Mota Vieira⁵ , Rita de Cássia Carvalho Maia^{6*} 

¹Médica Veterinária Técnica de Campo na Empresa Ceva Saúde Animal, Paulínia - SP Brasil.

²Pesquisador da Empresa Biogene Indústria e Comércio Ltda., Recife - PE Brasil.

³Doutoranda em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto - SP Brasil.

⁴Residente em Virologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE Brasil.

⁵Pós-doutoranda em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife - PE Brasil.

⁶Professora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife - PE Brasil.

*Autor para correspondência, E-mail: r.carvalhomaia@gmail.com

Resumo. A erliquiose monocítica canina é uma enfermidade infecciosa de caráter zoonótico com distribuição mundial, transmitida por carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* que carregam a *Ehrlichia canis*, bactéria responsável pela doença. A doença apresenta três fases: aguda, subclínica e crônica cuja abordagem terapêutica e diagnóstico acurado dependem diretamente dessas fases da doença. As técnicas de diagnóstico se baseiam em análise direta do sangue, biologia molecular e também na presença de anticorpos. Neste estudo foi realizada uma análise comparativa da eficácia diagnóstica entre as técnicas de Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com o diagnóstico clínico/hematológico. Através da análise da presença de material genético de *E. canis* e da detecção de anticorpos anti-IgG de *Ehrlichia* spp., em amostras de sangue de 49 cães da região metropolitana de Recife, PE. Os resultados da comparação entre os exames clínico/hematológico com os de ELISA foram divergentes em 33% dos casos. Além disso, dos dois métodos (ELISA e qPCR), concluiu-se que qPCR apresentou ser o método mais sensível quando utilizado na fase aguda da doença. O ELISA mostrou-se essencial para uma avaliação tardia da doença, com uma quantidade muito reduzida do patógeno, mas apresenta anticorpos específicos para a doença, reduzindo a possibilidade de resultados falso-negativos. Além disso, a confiabilidade no exame clínico, mesmo aliado ao hematológico, em especial a contagem de plaquetas, não pode ser considerada definitiva, sendo de grande importância associar outros testes diagnósticos para a complementaridade do diagnóstico. Dessa forma, nos nossos resultados ficou claro a importância da utilização de testes complementares para a elaboração do diagnóstico seguro da doença.

Palavras-chave: Erliquiose, canino, infecção, ELISA, qPCR

Comparative diagnosis of *Ehrlichia* spp. for soroteca building

Abstract. Canine monocytic ehrlichiosis is an infectious disease of zoonotic character with worldwide distribution, transmitted by ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus* that carry *Ehrlichia canis*, the bacterium responsible for the disease. The disease has three phases: acute, subclinical and chronic, whose approach and accurate diagnosis depend directly on the disease. Diagnostic techniques are based on direct blood analysis, molecular biology and also the presence of. This study was carried out a comparative analysis of the diagnostic efficacy between the techniques of enzyme immunoassay (ELISA) and real-time polymerase chain reaction (qPCR) with clinical / hematological diagnosis. Through the analysis of the presence of genetic material from *E. canis* and the detection of anti-IgG

from *Ehrlichia* spp. in blood samples from 49 dogs in Recife metropolitan region of Pernambuco. The results of the comparison between clinical / hematological and ELISA were divergent in 33% of cases. Furthermore, regarding the two methods (ELISA and qPCR), it is concluded that qPCR is the most sensitive method when used in the acute phase of the disease. ELISA proved to be essential for a late evaluation of the disease, when is reduced the amount of pathogen but it already produced specific antibody for a disease, decreasing the possibility of false-negative results. In addition, reliability in the clinical examination, even combined with hematology, in particular the platelet count, cannot be considered definitive, and it is very important to associate other diagnostic tests to complement the diagnosis. Thus, in our results, the importance of using complementary tests for the development of a safe diagnosis of the disease was clear.

Keywords: Ehrlichiosis, canine, infection, ELISA, qPCR

Introdução

A Erliquiose é uma doença transmitida por carrapatos, causada por espécies do gênero *Ehrlichia* e que possui ocorrência mundial ([Damas, 2012](#); [Isola et al., 2012](#); [Rikihisa, 1991](#)). São bactérias gram-negativas transmitidas ao animal durante a alimentação sanguínea por carrapatos infectados. As hemoparasitoses ameaçam o bem-estar animal, e em casos de doenças zoonóticas representam uma preocupação para a saúde pública humana, sendo consideradas importantes doenças transmitidas por carrapatos em áreas tropicais e subtropicais ([Silva et al., 2013](#); [Souza et al., 2012](#)).

Dentre as hemoparasitoses infecciosas de caráter zoonótico, a erliquiose é a mais frequente em cães domésticos ([Dagnone et al., 2002](#); [Dagnone et al., 2003](#); [Vidotto et al., 2001](#)), onde o principal agente causal é a espécie *Ehrlichia canis*, do gênero *Ehrlichia*, ordem *Rickettsiales*, pertencente à família *Anaplasmataceae* ([Damas, 2012](#); [Isola et al., 2012](#); [Machado, 2004](#)). Outras espécies também parasitam os cães como a *Ehrlichia equi*, *E. platys*, *E. ewing*, e *E. chaffensis*. Todavia, a espécie *E. canis* é o agente mais rotineiro da infecção natural em cães e é considerada a espécie que provoca a doença com sintomas mais graves ([Almosny et al., 2002](#); [Borin et al., 2009](#)). É considerado um parasita intracelular obrigatório de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, de monócitos caninos, onde forma os corpúsculos de inclusão, também conhecidos como “mórulas” ([Damas, 2012](#); [Isola et al., 2012](#); [Rikihisa, 1991](#)).

A doença é transmitida pela saliva do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* infectado durante o seu repasto sanguíneo em cães com erliquiose ([Sato et al., 2020](#)). Entretanto, também pode ser transmitida através de transfusão sanguínea por meio de um doador infectado, já que este mantém a infecção em sua forma crônica por um período de até cinco anos ([Damas, 2012](#); [Isola et al., 2012](#); [Machado, 2004](#)). O animal acometido pode apresentar clinicamente três estados da doença: subagudo, agudo, e crônico, tornando a escolha do teste para o diagnóstico um desafio em função das suas diferentes fases, manifestações clínicas e sensibilidade do teste ([Harrus & Waner, 2011](#); [Vieira et al., 2011](#)).

O diagnóstico pelo exame direto baseia-se na presença de mórulas em esfregaços sanguíneos e os indiretos na pesquisa de anticorpos anti-erliquia. Os métodos de diagnóstico baseados em biologia molecular podem detectar o DNA do patógeno, sendo uma ferramenta sensível e auxiliando no diagnóstico em combinação com os sinais clínicos característicos e achados hematológicos como a trombocitopenia ([Guedes et al., 2015](#); [Xavier et al., 2009](#)).

O objetivo deste estudo foi realizar testes de ELISA e qPCR de amostras sanguíneas de 49 cães com suspeita de *Ehrlichia* spp da região metropolitana de Recife, Pernambuco. E também, a construção de um banco sorológico e uma análise comparativa da eficácia entre as técnicas de ELISA, diagnóstico clínico/hematológico e qPCR.

Material e métodos

Aspectos éticos

A metodologia utilizada foi embasada nas normas éticas de pesquisa científica com animais, com protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRPE), sob licença nº 17/2017.

Desenho amostral

A amostragem foi composta por 49 cães domiciliados de ambos os sexos, raças e idades variadas, constituindo-se uma amostragem por conveniência.

Foram feitas visitas a clínicas veterinárias da região metropolitana do Recife-PE em busca de animais com suspeita clínica de erliquiose, os quais passaram por avaliação clínica e em seguida foram submetidos ao exame hematológico e aos testes propostos de qPCR e ELISA. O critério de inclusão utilizado foi a suspeita clínica de erliquiose ou alguma hemoparasitose pelo Médico Veterinário. Foram preenchidas fichas individuais contendo informações sobre o paciente (sexo, raça, idade, estado clínico geral - anamnese), identificação do tutor e foi realizada a coleta do material para os testes moleculares (sangue). Os tutores assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a participação do animal na pesquisa.

As coletas de sangue foram realizadas por venopunção da veia cefálica ou em veia femoral, com volume de 5 mL de sangue por paciente, coletados e distribuídos em tubos estéreis com 3,2% de citrato de sódio e tubos estéreis com ativador de coágulo. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo placas de gelo artificiais e encaminhadas ao laboratório Biogene®, onde foram armazenadas sob refrigeração (4° C) em geladeira até o devido processamento.

Testes diagnósticos

Hematologia

O sangue coletado foi encaminhado ao laboratório de preferência do Médico Veterinário para realização do exame hematológico de rotina. Para ser considerado positivo para Erliquiose, era necessária a presença de trombocitopenia e/ou de mórulas em esfregaço sanguíneo.

ELISA

O sangue coletado em tubos com ativador de coágulo foi centrifugado 5.000 rpm e em seguida o soro foi armazenado em tubos de polipropileno 1,5 ml e levados ao banho seco a 56°C por 20 minutos para provocar a desnaturação proteica. Para o teste, diluiu-se o soro em solução salina tamponada na proporção de 1:10, e foram incubados à 4° C *overnight* para imunoabsorção. Após essa etapa foram diluídos novamente na mesma proporção. Na etapa seguinte, a placa foi inserida em um leitor de ELISA (espectrofotômetro) em 450 nm, para obtenção da Densidade Ótica (D.O.). O protocolo foi realizado seguindo as instruções do fabricante e os valores de referências foram usados para análise do resultado.

qPCR

Para a extração de DNA utilizou-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo as orientações do fabricante. A realização da qPCR ocorreu por meio do kit SYBR™ Green PCR Master Mix® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e o Primer utilizado foi o p140 (Invitrogen®, Califórnia, EUA) forward: 5'ACTCCTGAAGTAAAGCAGAAG3', Reverse: 3'CTTCACTTGATGAATGTTCTAC5' que tem como alvo a proteína p140 de *E. canis*. As reações consistiram em 1µl para cada primer para concentração final de 5µM, 1µl de água Milli-Q®, 6µl de Sybr™ Green PCR Master Mix e 5µl de DNA. O controle negativo utilizado foi água Milli-Q®. A PCR foi realizada termociclador Line-Gene K FQD48A, nas condições: 95° C durante 15 minutos, 95 °C durante 30 segundos, 62° C durante 15 segundos, 72° C durante 15 segundos (40 ciclos), 95° C durante 20 segundos.

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada pela frequência relativa dos eventos, sendo expressas em porcentagem (%).

Resultados e discussão

Observou-se que 55% dos animais acometidos eram fêmeas e 45% eram machos, o que demonstrou dentro de uma amostra de conveniência, uma distribuição equilibrada das amostras o que corrobora com Sousa et al. (2010) que afirmam que a doença não apresenta predileção por sexo.

Quanto à raça, 5% dos positivos eram Boxer, Yorkshire, Rottweiler, Pitbull e Fox Paulistinha. Poodle e Dogue Alemão, ambas apresentaram 10% de positividade, e por fim, os cães sem raça definida (SRD) representaram 55% dos animais testados para erliquiose. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Sousa et al. (2010) que realizando a avaliação de cães de diferentes raças positivas para erliquiose, observaram que os cães sem raça definida tiveram o maior número de representantes positivos, o que pode ser explicado pelo fato de animais sem raça definida serem uma população maior e possuírem acesso à rua mais frequente e consequentemente maior exposição a carrapatos.

Quando realizada uma análise entre as frequências relativas dos testes realizados de qPCR e ELISA (Tabela 1), observa-se que cerca de 10% dos animais foram positivos na PCR quantitativa (qPCR) que é um exame direto, e cerca de 14% (7 animais) foram positivos no ELISA, considerado um exame indireto por detectar a confirmação tardia do patógeno no organismo através da presença de anticorpos. É importante lembrar que as 49 amostras eram consideradas positivas no diagnóstico clínico-hematológico, então partimos de um universo de 100% supostamente positivos para realizar as análises abaixo.

Tabela 1. Análise comparativa via distribuição de frequências entre resultados obtidos sendo confrontados por diferentes técnicas.

Resultados	Métodos Indiretos		Métodos Diretos			
	ELISA	F. R.	qPCR	F. R.	Hematológico	F. R.
Positivos	07	14,3 %	05	10,2 %	09	19,4 %
Negativos	42	85,7 %	44	89,8 %	40	80,6 %
Totais	49	100 %	49	100 %	49	100 %

F.R. – Frequência relativa em %.

De acordo com Gizzi et al. (2015), a técnica qPCR tem alta sensibilidade e especificidade, permitindo que quantidades mínimas de DNA sejam detectadas reduzindo a margem de erros que levam aos resultados falso-negativos, apresentando eficácia no diagnóstico da fase aguda. Trata-se então, de um diagnóstico mais preciso em comparação ao diagnóstico clínico/hematológico, que se baseia na presença de sinais clínicos e principalmente trombocitopenia na avaliação hematológica (Peleg et al., 2010).

Com relação a análise hematológica, é necessário cautela ao interpretar uma vez que, a baixa de plaquetas tem relação com outras causas como erros operacionais no processamento ou coleta da amostra ou com raças que têm predisposição genética para a condição, como já demonstrado na raça Greyhound (Almosny, 2006; Deshayes & Godeau, 2018). Outra problemática recorrente envolve a presença de trombocitopenia em outras enfermidades como a cinomose, a leishmaniose e outras hemoparasitoses, levando a um diagnóstico errôneo (Weiss & Wardrop, 2010), o que evidencia não ser um parâmetro preciso, quando utilizado isoladamente para diagnóstico definitivo da erliquiose.

Segundo Gizzi et al. (2015), os testes sorológicos realizados são capazes de determinar a concentração de anticorpos produzidos contra determinado agente infeccioso. Quando se obtêm títulos elevados, é sinal de que o paciente foi submetido ao agente e que seu sistema imune apresentou competência suficiente para a produção de anticorpos específicos. Os testes sorológicos para detectar anticorpos dependem da imunocompetência do hospedeiro em produzir anticorpos responsivos, entretanto, a soroconversão ocorre em períodos variados.

Na fase subclínica da doença, os títulos de anticorpos permanecem no soro por período superior a seis meses, indicando assim que a duração da infecção é prolongada e que ocorre a estimulação pelo antígeno. Assim, os cães ficam incapazes de estabelecer uma resposta imunológica eficaz e permanecem infectados cronicamente, e para esses casos, o ensaio o teste de ELISA é um dos métodos sorológicos mais utilizados e eficazes para o diagnóstico da doença (Zuchi et al., 2020).

Entre os dados obtidos, observou-se que algumas amostras foram positivas tanto na PCR quanto no ELISA, isso pode ocorrer porque o animal realizou a soroconversão, e ainda se encontra com o patógeno circulante. Em relação as amostras que foram positivas tanto no hematológicos quanto nos testes moleculares, pode ser explicado pelo fato do animal entrar em fase crônica da doença onde ocorre o sequestro esplênico de plaquetas. Segundo Xavier et al. (2009), a meia vida das plaquetas se reduz devido ao sequestro esplênico. Além disso, o gênero *Ehrlichia* também possui competência para parasitar macrófagos esplênicos na fase crônica da doença (Harrus & Waner, 2011).

É importante entender a dinâmica da doença, suas aplicações e limitações de cada método para que se possa realizar uma avaliação correta dos resultados obtidos. A qPCR é mais sensível quando utilizada na fase aguda da doença, uma vez que o DNA do patógeno deve estar presente, e o teste ELISA é essencial para uma avaliação nas demais fases da doença, onde já houve soroconversão a ponto de aumentar a sensibilidade do teste e confirmar o diagnóstico.

Portanto, quando se tratam de casos de recidivas ou de restabelecimento recente, ou mesmo casos crônicos, onde os patógenos não estão detectáveis via PCR, os anticorpos produzidos previamente podem ser detectados pelos testes sorológicos e ajudar no diagnóstico adequado (Gizzi et al., 2015), descartando animais falso-negativos no exame direto e hematológico e também falso-positivos possivelmente oriundos do teste hematológico baseado somente em trombocitopenia.

Conclusão

Estes resultados demonstram que a percepção clínica da erliquiose é bastante genérica e não define um diagnóstico conclusivo da enfermidade em cães. Foi observado que os métodos diagnósticos testados foram eficientes para o diagnóstico da enfermidade e que a soroteca obtida apresenta clara identificação dos casos verdadeiros-positivos e poderá ser utilizada para auxiliar no desenvolvimento de teste sorológico no futuro.

Referências bibliográficas

- Almosny, N R P. (2006). *Trombocitopenias* (pp. 1–9). Boletim Anclivepa.
- Almosny, Nádia R P, Massard, C. L., Labarthe, N. V, O'Dwyer, L. H., Souza, A. M., Alves, L. C., & Serrão, M. L. (2002). *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. NDL F. Livros.
- Borin, S., Crivelenti, L. Z., & Ferreira, F. A. (2009). Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(3), 566–571.
- Dagnone, A S, Trapp, S. M., Jojima, F. S., Amude, A. M., Moraes, H. A. S., Freire, R. L., & Vidotto, O. (2002). Avaliação Soroepidemiológica da infecção por *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi* em cães de uma população hospitalar. *XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Rio de Janeiro*.
- Dagnone, Ana Silvia, Moraes, H. S. A., Vidotto, M. C., Jojima, F. S., & Vidotto, O. (2003). Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology*, 117(4), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.001>.
- Damas, J. K. A. (2012). *Erliquiose Canina: Revisão de Literatura*. Universidade Paulista.
- Deshayes, S., & Godeau, B. (2018). Trombocitopenias. *EMC-Tratado de Medicina*, 22(4), 1–10.
- Gizzi, A. B. R., Conrado, F. O., Powolny, D., Leutenegger, C., & Oliveira, S. T. (2015). PCR quantitativa (qPCR) no diagnóstico de doenças infecciosas em cães e gatos-revisão de literatura. *Revista Clínica Veterinária*, 117, 78–94.
- Guedes, P. E. B., Oliveira, T. N. A., Carvalho, F. S., Carlos, R. S. A., Albuquerque, G. R., Munhoz, A. D., Wenceslau, A. A., & Silva, F. L. (2015). Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24, 115–121. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612015030>.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>.
- Isola, J. G. M. P., Cadioli, F. A., & Nakage, A. P. (2012). Erliquiose canina–revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 18, 1–11.
- Machado, R. Z. (2004). Erliquiose canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13, 53–57.
- Peleg, O., Baneth, G., Eyal, O., Inbar, J., & Harrus, S. (2010). Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Parasitology*, 173(3–4), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.039>.

- Rikihisa, Y. (1991). The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiological Reviews*, 4(3), 286–308. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.3.286>.
- Sato, M., Veir, J. K., Shropshire, S. B., & Lappin, M. R. (2020). *Ehrlichia canis* in dogs experimentally infected, treated, and then immune suppressed during the acute or subclinical phases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(3), 1214–1221. <https://doi.org/10.1111/jvim.15750>.
- Silva, M. V. M., Fernandes, R. A., Nogueira, J. L., & Ambrósio, C. E. (2013). Erliquiose canina: revisão de literatura. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia Da UNIPAR*, 14(2), 139–143.
- Sousa, V. R. F., Almeida, A. do B. P. F., Barros, L. A., Sales, K. G., Justino, C. H. S., Dalcin, L., & Bonfim, T. C. B. (2010). Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. *Ciência Rural*, 40(6), 1309–1313.
- Souza, D. M. B., Coletto, Z. F., Souza, A. F., Silva, S. V., Andrade, J. K., & Gimenez, G. C. (2012). Erliquiose transmitida aos cães pelo carrapato marrom (*Rhipicephalus sanguineus*). *Ciência Veterinária Nos Trópicos*, 15, 21–31.
- Vidotto, O., Moraes, H. S. A., & Dagnone, A. S. (2001). Animal and human Ehrlichiosis; Erliquiose nos animais e no homem. *Semina: Ciências Agrárias*, 22(2), 191–201.
- Vieira, R. F. C., Biondo, A. W., Guimarães, A. M. S., Santos, A. P., Santos, R. P., Dutra, L. H., Diniz, P. P. V. P., Moraes, H. A., Messick, J. B., & Labruna, M. B. (2011). Ehrlichiosis in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20, 1–12. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000100002>.
- Weiss, D. J., & Wardrop, J. K. (2010). *Schalm's Veterinary Hematology*.
- Xavier, M. S., Almosny, N. R. P., Nascimento, M. D., Silva, G. V. O., & Botelho, G. G. (2009). Avaliação da coagulação plasmática e plaquetometria em cães não infectados e infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 1049–1053. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000500006>.
- Zuchi, T. L. V. L., Corassa, L., Bonetto, G., Lopatini, C. L., Spricigo, J. B., Surian, S. R. S., Dezen, D., & Faria, J. L. M. (2020). Serological survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and *Leishmania infantum* in a Brazilian canine population. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 10(2), 61–65.

Histórico do artigo:**Recebido:** 21 de julho de 2021**Aprovado:** 27 de agosto de 2021**Licenciamento:** Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.