

# Diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* em cães com alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas, no município de Ilhéus, Bahia\*

Josiane Moreira Rocha<sup>1</sup>, Fabio Santos Carvalho<sup>1</sup>, Haniel Cedraz Oliveira<sup>1</sup>, Renata Santiago Alberto Carlos<sup>2</sup>, Paulo Luíz Souza Carneiro<sup>3</sup>, George Rego Albuquerque<sup>2</sup> e Amauri Arias Wenceslau<sup>2+</sup>

**ABSTRACT.** Rocha J.M., Carvalho F.S., Oliveira H.C., Carlos R.S.A., Carneiro P.L.S., Albuquerque G.R. & Wenceslau A.A. [**Molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* in dogs with clinical signs, hematological and biochemical changes in the Municipality of Ilhéus, Bahia.**] Diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* em cães com alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas no município de Ilhéus, Bahia. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(4):345-352, 2016. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900, Brasil. E-mail: wenceslau@uesc.br

The objective was to identify DNA of *Ehrlichia canis* in dogs with clinical and hematological or consistent with infection, and to identify possible risk factors for infection in the Municipality of Ilhéus, BA, an endemic area to infection. 558 were collected blood samples from dogs. These samples were divided into vials with and without anticoagulant made to research of blood smears for direct research on the blade. While the animals were submitted thorough assessment to clinical test, ticks were collected from dogs. The blood with anticoagulant was used to perform complete blood count and molecular tests for the detection of *E. canis* and without anticoagulant for biochemical examinations of Urea, Creatinine and ALT. Screening was held before molecular analysis and research of blood smears in blade, where the animals selected with hematological, biochemical and clinical signs suggestive of infection were selected. After the screening, 297 dogs were selected for the detection by molecular analysis and research of blood smears in blade *Ehrlichia* spp. and *E. canis*. Of animals evaluated by molecular methodology 85.52% (254/297) were positive to the genre and 80.13% (238/297) were positive to the species *E. canis* by *Nested-PCR*. In 28.16% (84/297) of animals was found infection in peripheral blood smear and all were positives by the *Nested-PCR*. Animals positive for *E. canis*, showed cachexia in 25.39%, pallor in mucous membranes in 17.46%, petechiae in 15.87% and had epistaxis in 1.58%, and other 38.09% (24/63) presented more than one of the concomitant changes. The animals with clinical changes were statistically significant ( $p = 0.02$ ) relative to the negative for *E. canis*. With regards to Hematologic changes in 80.13% of the dogs were infected by *E. canis*, these being statistically significant ( $p = 0.001$ ). Animals with anemia showed

---

\*Recebido em 12 dezembro de 2015.

Aceito para publicação em 4 de abril de 2016.

<sup>1</sup> Médicos-veterinários, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900. E-mails: rocha.josiane.m.vet@gmail.com; fabiouesc@gmail.com; hanielcedraz@gmail.com - bolsista CAPES.

<sup>2</sup> Médicos-veterinários, DSc. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, UESC, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900. E-mails: gralbu@uesc.br; rsacarlos@uesc.br; <sup>+</sup>Autor para correspondência, E-mail: wenceslau@uesc.br

<sup>3</sup> Zootecnista, DSc. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Jequié, Rua José Moreira Sobrinho, s/n, Jequeizinho, Jequié, BA 45206-190. E-mail: plscarneiro@gmail.com

statistical significance ( $p = 0.001$ ), however, there was no significance in thrombocytopenic dogs ( $p = 0.28$ ). When evaluating animals with anemia associated with platelet count less, the results were significant statistically ( $p < 0.005$ ). It was found ticks on 14.14% of screened animals and were not statistically significant ( $p > 0.05$ ), but 48.82% (145/297) animals insecticide control before the collection, and that was significant ( $p = 0.003$ ). With respect to biochemical evaluation results were not statistically significant ( $p > 0.05$ ) for the infection. They detected by molecular analysis at 19.04% ticks were infected with *E. canis*, the total of 42 samples of infected dogs. The region has high rates of infection by *E. canis* and animals of this study possibly are in the chronic phase of the infection in the Municipality of Ilheus, BA.

KEY WORDS. Molecular analysis, erlichiosis, ticks, natural infection.

**RESUMO.** Objetivou-se com este trabalho identificar DNA de *Ehrlichia canis* em cães com alterações clínicas e ou hematológicas condizentes com a infecção, e identificar possíveis fatores de risco à infecção no município de Ilhéus, uma área endêmica à infecção. Foram coletadas 558 amostras de sangue de cães. Essas amostras foram divididas em frascos com e sem anticoagulante e foram confeccionados esfregaços sanguíneos para pesquisa direta na lâmina. Durante o momento da coleta os animais foram submetidos a exame clínico completo e avaliação para presença de carrapatos. O sangue com anticoagulante foi utilizado para realização de hemograma completo e testes moleculares para detecção de *E. canis* e o sem anticoagulante para os exames bioquímicos de Ureia, Creatinina e ALT. Antes da análise molecular e em lâmina, foi realizada uma triagem, onde foram selecionados animais que apresentassem sinais clínicos, hematológicos e bioquímicos sugestivos da infecção. Após essa triagem, foram selecionados 297 cães para a pesquisa de *Ehrlichia* sp. e *E. canis*. Dos animais avaliados pela metodologia molecular 85,52% (254/297) foram positivos para o gênero e 80,13% (238/297) foram positivos para a espécie *E. canis* pelo *Nested-PCR*. A visualização de mórulas nas lâminas foi verificada em 28,16% (84/297) de animais e todos também foram positivos pelo *Nested-PCR*. Dos animais positivos para *E. canis*, 25,39% apresentaram caquexia, 17,46% apresentaram palidez em mucosas, 15,87% apresentaram petéquias e 1,58% apresentaram epistaxe, e outros 38,09% (24/63) apresentaram mais de uma das alterações concomitantes. Animais que apresentaram alterações em sinais clínicos foram estatisticamente significativos ( $p=0,02$ ) em relação à positividade para *E. canis*. Com relação às alterações hematológicas 80,13% dos cães estavam infectados, sendo estas estatisticamente significantes ( $p=0,001$ ). Os animais com anemia apresentaram significância esta-

tística ( $p=0,001$ ), porém, não foi constatada significância nos animais trombocitopênicos ( $p=0,28$ ). Quando se avaliou animais que possuíam anemia em associação com trombocitopenia, os resultados foram significativos estatisticamente ( $p<0,005$ ). Foi verificada presença de carrapatos em 14,14% dos animais triados e não foram estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ), porém 48,82% (145/297) animais apresentaram controle carrapaticida anterior ao momento da coleta e, este dado foi significativo ( $p=0,003$ ). Com relação a avaliação bioquímica os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p>0,05$ ) para a infecção. Foram detectados pela análise molecular 19,04% de carrapatos infectados das 42 amostras de carrapatos coletados. Concluiu-se que a região tem alta infecção por *E. canis* e os animais neste estudo, possivelmente estavam cursando com a fase crônica da infecção, no município de Ilhéus, BA.

PALAVRAS-CHAVE. Análise molecular, carrapatos, erlichiose, infecções naturais.

## INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina cujo agente etiológico foi inicialmente descrito como *Rickettsia canis* no início da década de 30 na Argélia (Donatien & Lestoquard 1935), sofreu reclassificação e, atualmente é classificado como *Ehrlichia canis* (Anaplasmataceae: Rickettsiales) (Dumler et al. 2001). Essa espécie, já foi assinalada em diversas regiões o que dá a ela uma distribuição cosmopolita, principalmente, em decorrência da fácil adaptação às condições climáticas do vetor, o carrapato marrom dos cães, *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres et al. 2006, Carlos et al. 2011, Parola et al. 2013). No Brasil, o primeiro relato foi em Minas Gerais por Costa et al. (1973).

A repercussão mundial da infecção por *E. canis* ocorreu a partir da guerra do Vietnã (1965-1975), em que cães da raça Pastor Alemão tiveram sinais

clínicos graves e muitos vieram a óbito devido a pancitopenia tropical canina (Almosny & Massard 2002). A enfermidade, também é conhecida como riquetsiose canina, tifo canino, síndrome hemorrágica idiopática, febre hemorrágica canina e moléstia do cão rastreador em decorrência das alterações ou sinais clínicos da infecção (Kakoma et al. 1994, Dunn 2001, Almosny & Massard 2002, Harrus & Waner 2011). Os principais sinais clínicos são caracterizados por palidez das mucosas, tendência a sangramento, perda de peso, febre, letargia e epistaxe. As principais alterações hematológicas e bioquímicas associadas à essa infecção podem ser caracterizadas por anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia, leucopenia, monocitose, e em alguns casos observa-se alterações de enzimas renais e hepáticas (Kakoma et al. 1994, Santarém et al. 2008, Borin et al. 2009).

Os fatores de risco associados à erliquiose em cães são influenciados pelo clima, exposição aos carrapatos e, hábitos dos cães como acesso à rua, animais que tiveram transfusão sanguínea sem diagnóstico prévio nos doadores (Rodríguez-Vivas et al. 2005, Carlos et al. 2011, Harrus & Waner 2011). Ambos os sexos, as diversas faixas etárias e diferentes raças dos cães são susceptíveis à enfermidade (Rodríguez-Vivas et al. 2005, Nakaghi et al. 2008, Santarém et al. 2008, Carlos et al. 2011, Harrus & Waner 2011).

O diagnóstico pode ser feito por técnicas tintórias, sorológicas e moleculares (Carvalho et al. 2008, Carlos et al. 2011, Harrus & Waner 2011). Diante das diferentes fases clínicas a eficácia dos testes diagnósticos podem variar (Kaneko et al. 2008, Borin et al. 2009), e estudos de prevalência usando diversas técnicas diagnósticas de *Ehrlichia* sp. em cães apontaram resultados que variaram entre 7,8% e 53% nas diversas regiões do Brasil (Carlos et al. 2011). O uso de técnicas moleculares fornece informações mais precisas e podem ser utilizadas em qualquer fase da infecção, inclusive em animais assintomáticos (Kaneko et al. 2008, Borin et al. 2009, Carlos et al. 2011). Os exames hematológicos (Borin et al. 2009, Harrus & Waner 2011) e bioquímicos (Santarém et al. 2008, Harrus & Waner 2011) podem ser complementares à suspeita clínica de infecção por *E. canis*, pois verificam o estado clínico e o prognóstico do animal.

Este trabalho teve como objetivo identificar a presença de *E. canis* através de biologia molecular em cães com alterações clínicas e ou hematológicas condizentes com a infecção, e identificar possíveis fatores de risco à infecção no município de Ilhéus, uma área endêmica à infecção.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de origem dos animais

As coletas foram realizadas no município de Ilhéus, que está localizado sob a latitude 14°47'S e longitude 39°02'W, distribuído em 1.760 Km<sup>2</sup>, na microrregião de Ilhéus-Itabuna, na Costa do Cacau, representante típico de bioma Mata Atlântica, com temperatura média anual de 28°C e pluviosidade média anual de 1500 a 2000mm. Tem uma população de cães de, aproximadamente, 20.000 animais, estimados a partir da população humana de 184.616 habitantes, conforme IBGE, 2012.

### Comissão de ética

Neste estudo foram utilizadas as normas que regulamentam o uso de animais em pesquisa, cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética que regulamenta o Uso de Animais em pesquisa da UESC n. 018/12 em 24/07/2012.

### Animais

Foram coletadas amostras de 559 cães domiciliados entre os meses de março a agosto de 2013, distribuídos em 12 bairros do município de Ilhéus, Bahia. O programa EPI Info 2002 foi utilizado para o cálculo do tamanho amostral, considerando-se o número estimado de cães no município (20.000), prevalência de 50% para *E. canis*, confiabilidade de 95% e 5% de erro, resultando em número amostral mínimo de 320 cães.

### Coleta

Todos os cães passaram por avaliação individual dos parâmetros clínicos que permitiram verificar perda de peso, palidez de mucosas e epistaxe. Além disso, coletaram-se dados do histórico clínico e, referente aos fatores de risco para erliquiose como idade, sexo, raça, presença de carrapato, controle de carrapato, ambiente dos cães e contato com outros animais.

Foram coletadas 559 amostras por punção de veia jugular ou cefálica de 10mL de sangue e armazenadas em tubos com e sem anticoagulante EDTA (Santos & Mello 1975). As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, até o processamento nos Laboratórios de Genética e Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UESC. Além disso, foi coletado sangue de capilar periférico de ponta de orelha dos cães, para verificação parasitológica direta por esfregaço em lâmina (Borin et al. 2009).

Durante os exames físicos foram coletados carrapatos dos animais que os possuíam variando de 1 a 5 espécimes por cão para realização de PCR para *E. canis*.

### Exame laboratoriais

**Exames hematológicos e bioquímicos.** A análise hematológica foi realizada no equipamento automático de contagem, ABCVet - Animal BloodCounter (HORIBA®) com o kit Pack ABXVet (HORIBA®), segundo orientações do fabricante. Os valores considerados de normalidade para o hemograma foram os determinados por Weiss et al. (2000). Além das contagens automáticas foram realizadas contagens específicas de leucócitos em

microscópico óptico (Borin et al. 2009) coradas por *kit* Panótico™ rápido, segundo orientação do fabricante.

Uma fração de soro foi utilizada nos exames bioquímicos de uréia (*kit* Uréia UV™ LabTest), creatinina (*kit* Creatinina™ LabTest), ALT (*kit* LabTest Transaminase Pirúvica™), cuja leitura foi realizada no equipamento Bioplus 2000™, seguindo orientações técnicas recomendadas pelo fabricante. Os valores considerados de normalidade para a espécie foram determinados por Kaneko et al. (2008).

**Triagem.** As alterações clínicas consideradas sugestivas para infecção por *E. canis* foram palidez de mucosas, presença de petéquias, epistaxe, caquexia ou emagrecimento. As alterações hematológicas e bioquímicas consideradas sugestivas para infecção por *E. canis* foram anemia (Hematimetria abaixo de  $5,5 \times 10^6/\mu\text{L}$ , Hemoglobina abaixo de 12 g/dL e/ou Hematócrito abaixo de 37%), trombocitopenia (valor de plaquetas abaixo de 200.000/ $\mu\text{L}$ ), valores aumentados de ureia, creatinina e ALT (respectivamente acima de 60 mg/dL, 1,5 mg/dL e 100 UI/L) foram incluídos também animais que não apresentaram alterações anteriores, porém apresentaram infestação por carrapato no momento da coleta.

Apenas as amostras dos cães que foram triados foram submetidas as avaliações parasitológicas e moleculares.

#### Avaliação parasitológica

As lâminas de ponta de orelha de todos os cães que tiveram sangue coletado foram coradas com *kit* Panótico™ segundo a orientação do fabricante. Porém, apenas as pertencentes aos cães que apresentaram alteração clínica e ou hematológica sugestiva de infecção por *E. canis*, foram examinadas com uso do microscópio óptico Primo Star Zeiss®, com objetiva de 100x.

#### Avaliação molecular

**Extração de DNA.** As amostras de sangue dos cães com suspeita de infecção por *Erhlichia* sp. foram submetidas à extração e purificação do DNA total do sangue a partir da capa de leucócitos pelo método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Carvalho et al. 2008). Os carrapatos, quando presentes nos cães no momento do exame físico, foram acondicionados em microtubos contendo álcool etílico absoluto (Stich et al. 2002). No momento da extração de DNA, estes permaneceram durante 30 minutos no freezer na temperatura de  $-80^\circ\text{C}$ , e em seguida, foram colocados em recipiente contendo água a  $100^\circ\text{C}$ , durante 5 minutos e, posteriormente, macerados com auxílio de bastão de vidro e processados pelo método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Carvalho et al. 2008).

**Nested-PCR.** O DNA genômico quantificado pelo Nanodrop 2000™, forneceu o volume de DNA para a estabilização da reação no volume de 25 $\mu\text{L}$  e cujas temperaturas de programação no termociclador foram estabelecidas segundo protocolo usado por Carlos et al., (2011) e Carvalho et al., (2008), que utilizaram os mesmos primers para gênero *Erhlichia*. Os primers utilizados foram: o *primer* direto ECC (5'AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC3') e o *primer* reverso ECB (5'CGTATTACCGCGG-

CTGCTGGCA3'), que são responsáveis pela amplificação do fragmento do gene *16SrRNA*, produzindo um *amplicon* com 478bp, associada à enzima citrato sintetase (gltA), de baixa variação mutagênica e permite identificar o gênero *Erhlichia* (Dawson et al. 1994, Dumler et al. 2001, Nakaghi et al. 2008).

As reações foram padronizadas para o volume de 25 $\mu\text{L}$ , sendo 3,0 $\mu\text{L}$  de DNA [100ng] genômico, *primers* ECC e ECB [0,4mM], dNTP [0,2mM], MgCl<sub>2</sub> [3,0mM], tampão da TaqPCR™ [10mM] e 2,5 U Taq DNA Polymerase™ (Invitrogen®). Ao volume final foi acrescido água ultrapura tamponada (Invitrogen®). O programa para o termociclador foi utilizado considerou uma desnaturação inicial de 3 min. a  $94^\circ\text{C}$ ; em seguida 40 ciclos de desnaturação a  $94^\circ\text{C}$  por 1 min. seguido de anelamento a  $68^\circ\text{C}$  por 1 min. e 30 s., e, extensão a  $72^\circ\text{C}$  por 1 min. e 30 s., e, um passo final a  $72^\circ\text{C}$ , durante 5 min.

O *primer* direto ECAN5 (5'CAATTATTATAGCCTCTGGCTATAGGA3') (Anderson et al., 1992), e o *primer* reverso HE3 (5'TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT3') (Murphy et al., 1998), produzem um *amplicon* com 389pb e permite identificar *E. canis* (Bulla et al., 2004). As reações foram estabilizadas para o volume de 25 $\mu\text{L}$ , sendo 100ng do produto da primeira PCR, 10 $\mu\text{mol}$  de cada *primers*, dNTP [0,2mM], MgCl<sub>2</sub> [2,5mM], 1x tampão da TaqPCR™ [10mM] e 1,25 U Taq DNA Polymerase™ (Invitrogen®), e 8,25 $\mu\text{L}$  de água ultrapura tamponada (Invitrogen®). A temperatura dos *primers* durante a desnaturação foi de  $94^\circ\text{C}$  por 1 min., seguida 35 ciclos de anelamento a  $58^\circ\text{C}$  por 2 min. a e extensão a  $72^\circ\text{C}$  por 1 min. e 30 s., e, um último passo de 5 min. para extensão final a  $72^\circ\text{C}$ .

Os produtos obtidos da PCR e Nested-PCR passaram por eletroforese em cuba horizontal em gel de agarose ultrapura™ (Invitrogen®) [1,5%], diluído em TAE™ (Invitrogen®) [20%] e, corados com Brometo de Etídio [2%] e, foram revelados em fotodocumentador. Como controle positivo foi utilizada uma amostra positiva em PCR (Carvalho et al. 2008) e água ultrapura foi usada como controle negativo.

A nested-PCR foi realizada tanto para as amostras sanguíneas, quanto para as amostras de carrapatos.

**Sequenciamento.** O sequenciamento de amostras positivas para *E. canis* foi realizado no Laboratório AC-TGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems). Como controle negativo foi utilizado apenas água ultrapura™ (Invitrogen®). Os DNAs-molde [45 ng] foram marcados utilizando-se os respectivos *primers* ECAN5 [3,2 pmol] e HE3 [3,2 pmol] e 2  $\mu\text{L}$  do reagente BigDyeTerminator v3.1 CycleSequencing RR-100 (AppliedBiosystems) em 10  $\mu\text{L}$  de volume final. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (AppliedBiosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a  $96^\circ\text{C}$  por 3 minutos seguido de 25 ciclos de  $96^\circ\text{C}$  por 10 segundos,  $55^\circ\text{C}$  por 5 segundos e  $60^\circ\text{C}$  por 4 minutos. O programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) foi usado para comparação e análise das sequências obtidas.

### Análise estatística

Foram avaliados os dados da inspeção física, e fatores de risco referentes à enfermidade, o histórico do animal, junto aos resultados hematológicos, e bioquímicos utilizando o teste de  $\chi^2$  e exato de Fisher com nível de significância de 5% no programa EpiInfo 7.0 (www.cdc.gov).

## RESULTADOS

Neste estudo das 559 amostras coletadas, 297 cães foram triados. No total 71 (23,9%) possuíam alterações clínicas, 290 (97,64%) hematológicas, 43 (14,47%) bioquímicas e 42 (14,14%) animais tinham carrapato. Dois animais apresentaram somente alterações clínicas, 170 somente hematológicas e quatro somente alterações bioquímicas. Nenhum animal apresentou apenas presença de carrapatos. 117 animais apresentaram dois ou três critérios de inclusão simultaneamente, e quatro cães apresentaram os quatro critérios de inclusão. Essas 297 amostras foram consideradas para investigação parasitológica direta e molecular.

Considerando-se os 297 cães selecionados, a análise das lâminas de esfregaço identificou 84 (28,28%) cães positivos com inclusões intracitoplasmáticas sugestivas para *Ehrlichia* sp. em células mononucleares. Observou-se ainda a presença de *Anaplasma* sp. em três (1,01%) cães e, em sete (2,35%) amostras foram encontrados merozoítos de *Babesia* sp.

Na análise molecular 85,52% (254/297) foram positivos para o gênero *Ehrlichia* e 80,13% (238/297) foram positivos para a espécie *E. canis* pelo *Nested-PCR*. As 84 lâminas positivas no parasitológico, também foram positivas no *Nested-PCR*.

Das três amostras positivas para *Anaplasma* sp., duas também estavam positivas para *Ehrlichia* sp. no esfregaço sanguíneos, e todas estavam coinfectadas por *E. canis* pela análise molecular. Das oito amostras positivas para *Babesia* sp., sete estavam coinfectadas por *E. canis*, sendo quatro apenas pelo diagnóstico molecular e três, simultaneamente pelo *Nested-PCR* e pelo esfregaço sanguíneo. Nenhum cão apresentou coinfecção pelos três agentes simultaneamente.

Dos 71/297 (23,905%) que apresentaram sinais clínicos sugestivo de erliquiose, 65/71 (91,54%) foram positivos no gênero e desses 61/71 (85,91%) foram positivos para a espécie *E. canis*. Dos 61 cães positivos para *E. canis*, 20/61 (32,78%) também foram positivos no esfregaço sanguíneo. Com relação às frequências de sinais clínicos associados à positividade por *E. canis*, 18,03% (11/61) tiveram apenas palidez de mucosas, 16,39% (10/61) apenas presen-

ça de petéquias, 26,22% (16/61) tiveram apenas caquexia e/ou emagrecimento, e 1,63% (1/61) animal apresentou apenas epistaxe (Figura 1).

Com relação às alterações hematológicas, (290/297) animais foram triados, 85,51% (248/290) foram positivos para gênero e 81,37% (236/290) positivos para *E. canis* pelo diagnóstico molecular. A anemia foi verificada em 58,27% (169/297) e destes 86,39% (146/169) foram positivos para *E. canis*. A trombocitopenia foi verificada em 237 animais e destes 81,01% (192/237) foram positivos para *E. canis*. A anemia associada à trombocitopenia foi verificada em 116 animais e destes 102 foram positivos para *E. canis*.

Dentre as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas observadas nos cães a anemia foi significativa nos animais positivos ( $p=0,003$ ), alterações de ALT também foram encontradas ( $p=0,002$ ) (Tabela 1).

Quanto à análise dos fatores de risco, nenhuma das variáveis estudadas foi significativa (Tabela 2).

Foram detectados a presença de *Ehrlichia canis* em 19,04% (8/42) amostras de carrapatos coletados. Dessas oito amostras de carrapatos infectados, cinco foram provenientes de cães também positivos pelo *Nested-PCR* e três oriundos de animais negativos para a pesquisa de *E. canis*.

Quanto ao sequenciamento os amplicómeros dos produtos dos primers HE3/ECAN do gene 16S rRNA sequenciados das amostras positivas da *Nested PCR* mostraram-se idênticas entre si e apresentaram 99% de similaridade com alto grau de identidade com outras sequências depositadas no *GenBank* e as análises e comparações das sequências

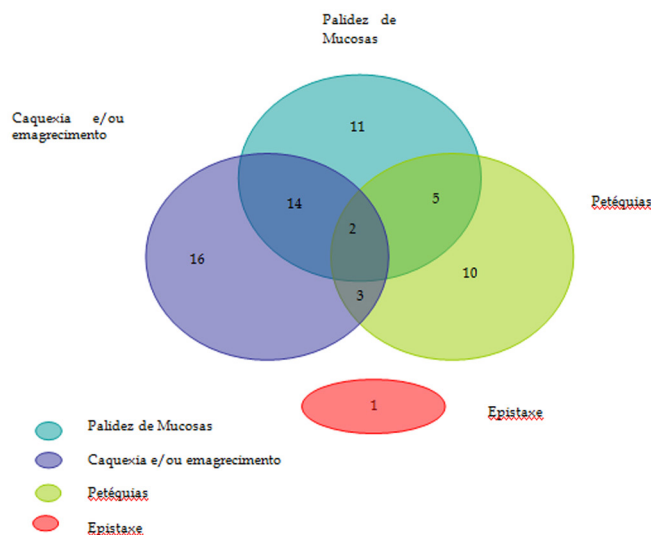


Figura 1. Alterações clínicas verificadas em animais naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* no município de Ilhéus, BA.

Tabela 1. Associação dos resultados de PCR para *Ehrlichia canis* com os achados hematológicos e bioquímicos de cães provenientes do município de Ilhéus, BA.

Variáveis	Alteração	N.	Cães positivos	Prevalência	OR	IC 95%	Valor de p
Anemia	Sim	169	146	87,93	2,484	1,38-4,45	0,003b
	Não	128	92	75,13			
Trombocitopenia	Sim	237	192	81,01	1,299	0,65-2,56	0,566
	Não	60	46	76,66			
ALT	Sim	12	5	41,66	0,1594	0,048-0,52	0,002b
	Não	285	233	81,75			
Ureia	Sim	25	19	76	0,7664	0,29- 2,01	0,779
	Não	272	219	80,51			
Creatinina	Sim	11	8	72,72	0,6493	0,16- 2,52	0,808
	Não	286	230	80,41			

<sup>a</sup>Número de animais examinados; <sup>b</sup> significativo pelo teste exato de Fisher.

Tabela 2. Fatores de risco associados à positividade de *Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados no município de Ilhéus, BA.

Variáveis		N <sup>a</sup>	Cães positivos	Prevalência	OR	IC 95%	Valor de p
Sexo	F	122	103	83,60	1,606	0,87-2,93	0,1617
	M	175	135	77,14			
Idade	<1 ano	115	90	78,26	0,827	0,46-1,47	0,6212
	>1 ano	182	148	81,31			
Habitat	Acesso à Rua	96	76	79,16	0,9148	0,50-1,67	0,8938
	Domiciliado	201	162	80,59			
Contato outros animais	Sim	171	139	81,28	1,185	0,66-2,10	0,6654
	Não	126	99	78,57			
Uso de carrapaticidas	Sim	209	170	81,33	1,282	0,69-2,35	0,5203
	Não	88	68	77,27			
Carrapato	Sim	42	33	78,57	0,8943	0,40-1,98	0,9479
	Não	255	205	80,39			
Cor do pelo	Claro	138	112	81,15	1,128	0,63-2,00	0,7898
	Escuro	159	126	79,24			
Raça	Sem raça	188	152	80,85	1,129	0,62-2,02	0,7983
	Com padrão	109	86	78,89			

<sup>a</sup>Número de animais examinados

realizadas pelo software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

## DISCUSSÃO

O critério da seleção de cães que incluíam alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas foi capaz de detectar um elevado número de animais infectados pela investigação molecular (infecção por *Ehrlichia* sp. em 85,52% e, *E. canis* em 78,28%) e parasitológica (infecção por *Ehrlichia* sp. em 28,16%), corroborando com os estudos Bulla et al. (2004), Vieira et al. (2009) e Carlos et al. (2011) que utilizaram animais com alterações prévias para avaliar infecção por *Ehrlichia* sp.

Estudos de infecção por *Ehrlichia* sp. em cães realizadas por meio de diagnóstico molecular (Nested PCR) na mesma região, verificaram em 7,8% (Carvalho et al. 2008) e 10,7% (Carlos et al. 2011) de positividade, ou seja, um número de casos de cães infectados inferiores aos verificados nesta pesquisa. A visualização das mórulas nos monócitos varia e cujas frequências encontravam-se entre 1%

a 15,3% (Carlos et al. 2011, Harrus & Waner 2011), valores esses também inferiores aqueles encontrados no presente estudo. Contudo isso pode ter ocorrido por conta da população de cães triados, pois nesse estudo foram estudados animais com alterações sugestivas da infecção *Ehrlichia* sp. Outra diferença verificada entre os estudos é que nos anteriores (Carvalho et al. 2008, Carlos et al. 2011) foi realizada extração de DNA de sangue total e neste atual estudo foi feita extração de DNA de capa leucocitária o que pode ter aumentado a chance de se encontrar a bactérias nos cães avaliados (Iqbal et al. 1994, Harrus & Waner 2011).

Os sinais clínicos que serviram como base para a seleção de animais para a avaliação molecular, demonstrando que as cepas de *E. canis* não são patogênicas na região. Como pode-se observar no presente estudo, 10 animais com sinais clínicos não estavam infectados, assim como 175 animais infectados não apresentaram quaisquer alterações clínicas. Os sinais clínicos com maior frequência corroboram os achados de literatura, onde Dagnone et

al. (2003), Nakaghi et al. (2008) e Borin et al. (2009) também encontraram esses sinais clínicos como associados a infecção por *E. canis*. Porém os sinais clínicos isoladamente não devem ser usados como um parâmetro definitivo da infecção por *E. canis*, pois são inespecíficos, podendo estar presentes em outros tipos de doenças, infecciosas ou não. Além disso, a variação na fase da doença na qual o animal se encontra, interfere diretamente no aparecimento desses sinais.

A anemia foi estatisticamente significativa, corroborando com os resultados encontrados por Santos et al. (2009), Borin et al. (2009) e Vieira et al. (2011). O principal mecanismo envolvido com a patogenia da anemia refere-se à ação de supressão medular orquestrada pelo sistema monocítico fagocitário em conjunto com o sistema complemento, que desencadeiam a supressão da eritropoiese medular (Kakoma et al. 1994, Almosny & Massard 2002, Nakaghi et al. 2008; Vieira et al. 2011). A trombocitopenia e presença de carrapato não apresentaram resultado significativo estatisticamente. A patogenia da trombocitopenia pode ser verificada em decorrência de consumo, de destruição mediada por imunocomplexos ou de sequestro de plaquetas pelo baço em presença da infecção por *E. canis* (Almosny & Massard 2002, Santos et al. 2009, Vieira et al. 2011), e é mais prevalente em animais com a doença aguda e subclínica (Almosny & Massard 2002, Santos et al. 2009; Borin et al. 2009), e o que ocorre, geralmente em associação com a presença de carrapatos nos cães. Além disso, houve um número menor de animais positivos identificados pelo parasitológico direto em lâmina, do que pelo Nested-PCR, sugerindo-se que a maioria dos animais avaliados com alterações hematológicas estivessem cursando com a doença crônica (Kakoma et al. 1994, Almosny & Massard 2002).

Ainda quanto a infestação por carrapatos, grande número de animais (209) já tinham feito uso de algum produto carrapaticida e no momento da coleta poucos tinham carrapatos (42) o que suporta a ideia de que esses animais se infectaram por *Ehrlichia* sp. em infestações anteriores ao exame físico, mostrando que realmente existe a possibilidade de eles estarem cursando com a fase crônica da doença (Woody et al. 1991, Stich et al. 2002).

As alterações bioquímicas renais não apresentaram significância estatística corroborando com os estudos realizados por Kaneko et al. (2008), Santarém et al. (2008), Santos et al. (2009) e Borin et al. (2009). Animais infectados por *E. canis* po-

dem acarretar lesão renal por depósito antígeno-anticorpo provocando glomerulopatias (Wood et al. 1991, Kaneko et al. 2008, Almosny & Massard 2002, Santos et al. 2009). Porém o aumento das enzimas renais ocorre apenas quando aproximadamente 75% dos nefrons já foram lesados (Kaneko et al. 2008, Santos et al. 2009), o que provavelmente não ocorreu com os animais do presente estudo. O aumento de uréia pode estar relacionado também com alterações no metabolismo do nitrogênio, como febre, catabolismo proteico (Kaneko et al. 2008, Almosny & Massard 2002, Santos et al. 2009), alterações essas comuns na fase aguda da erlichiose. Como possivelmente a maioria dos animais encontrava-se em fase crônica, o pico febril que pode ocorrer na doença aguda já havia ocorrido em momento anterior. Além disso, poucos animais apresentaram emagrecimento, sinal clínico que poderia justificar um aumento de uréia. Com relação à ALT, houve diferença significativa, porém a maioria dos animais positivos estava dentro da faixa de normalidade. As alterações da ALT ocorrem mais comumente por conta de lesão em processos agudos (Kaneko et al. 2008, Santos et al. 2009) e geralmente em processos de hepatopatias crônicas a enzima pode estar dentro da faixa de normalidade. O estabelecimento clínico dos animais no momento do diagnóstico pode ter interferido na detecção do aumento da enzima na fase aguda, pois como anteriormente dito, a maioria dos cães encontrava-se na fase crônica da doença (Harrus & Waner 2011).

Apesar de três carrapatos terem sido positivos pela análise molecular e proveniente de cães negativos pelo PCR, isso não significa que estes cães não possam vir a desenvolver um quadro de erliquiose, pois se sabe que existe a necessidade de fixação do carrapato por pelo menos 48 horas para que ocorra a transmissão de *E. canis*. E ainda, o animal poderia estar contaminado, porém com uma quantidade de DNA insuficiente para detecção pelo método molecular, no momento da coleta da amostra.

## CONCLUSÃO

*Ehrlichia canis* encontra-se presente na população canina do município de Ilhéus, Bahia, Brasil. Os cães com alterações clínicas e/ou hematológicas têm alta taxa de infecção por esse micro-organismo onde a ferramenta molecular para diagnóstico da infecção foi eficaz no diagnóstico da infecção por *E. canis*, mesmo em animais em fase crônica da doença.

## REFERÊNCIAS

- Almosny N.R.P. & Massard C.L. *Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses*. 1ª ed. LF Livros de Veterinária, Rio de Janeiro, 2002. 135p.
- Anderson B.E., Sumner J.W., Dawson J.E., Tzianabos T., Greene C.R., Olson J.G., Fishbein D.B., Olsenrasmussen M., Holloway B.P., George E.H. & Azad A.F. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:775-780, 1992.
- Borin S., Crivelenti L.Z. & Ferreira F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos de hematológicos e 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61:566-571, 2009.
- Bulla C., Kiomi Takahira R., Pessoa Araujo Jr. J., Aparecida Trinca L., Souza Lopes R. & Wiedmeyer C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*, 35:141-146, 2004.
- Carlos R.S.A., Carvalho F.S., Wenceslau A.A., Almosny N.R.P. & Albuquerque G.R. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20:210-214, 2011.
- Carvalho F.S., Wenceslau A.A., Carlos R.S.A. & Albuquerque G.R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 7:657-662, 2008.
- Costa J.O., Batista Júnior J.A., Silva M. & Guimarães P.M. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte - Brazil. *Arquivos Escola de Veterinária da UFMG*, 25:199-200, 1973.
- Dantas-Torres F., Figueredo L.A. & Brandão-Filho S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39:64-67, 2006.
- Dagnone A.S., Morais H.S.A., Vidotto M.C., Jojima F.S. & Vidotto O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology*, 117:285-290, 2003.
- Dawson J.E., Stallknecht D.E., Howerth E.W., Warner C., Biggie K., Davidson W.R., Lockhart J.M., Nettles V.F., Olsom J.G. & Childs J.E. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:2725-2728, 1994.
- Donatien A. & Lestoquard F. "Existence en Algeried'une Rickettsia du chien," *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 28:418-419, 1935.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.J., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. 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 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:2145-2165, 2001.
- Dunn J.K. *Tratado de medicina de pequenos animais*. 1ª ed. Roca, São Paulo, 2001. 1075p.
- Harrus S. & Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal*, 187:292-296, 2011.
- Iqbal Z., Chaichanasiriwithaya W. & Rikihisa Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:1658-1662, 1994.
- Kakoma I., Hansen R.D., Anderson B.E., Hanley T.A., Sims K.G., Liu L., Bellamy C., Long M.T. & Baek B.K. Cultural, molecular, and immunological characterization of etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:170-175, 1994.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. *Clinical biochemistry of domestic Animals*, 6th ed. Academic Press, New York, 2008. 896p.
- Murphy G.L., Ewing S.A., Whitworth L.C., Fox J.C. & Kocan A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology*, 79:325-339, 1998.
- 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*, 38:766-770, 2008.
- Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kerni F.T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E. & Raoult D. Update on Tick-Borne rickettsioses around the World: a Geographic Approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 26:657-702, 2013.
- Rodriguez-Vivas R.I., Albornoz R.E.F. & Bolio G.M.E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology*, 127:75-79, 2005.
- Santarém V.A., José M.D. & Laposy C.B. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrlichiose. *Semina: Ciências Agrárias*, 29:845-852, 2008.
- Santos J.A. & Mello M.R. *Diagnóstico Médico-Veterinário: colheita de material*. 2ª ed. Nobel, São Paulo, 1975. 195p.
- Santos F., Coppede J.S., Pereira A.L.A., Oliveira L.P., Roberto P.G., Beneditti R.B.R., Zucoloto L.B., Lucas F., Sobreira L. & Marins M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Veterinary Journal*, 179:145-148, 2009.
- Stich R.W., Rikihisa Y., Ewing S.A., Needham G.R., Grover D.L. & Jit-tapalpong S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:540-546, 2002.
- Weiss D.J., Baluvelt M., Sykes J. & McClenahan D. Flow cytometric evaluation of canine bone marrow differential cell counts. *Veterinary Clinical Pathology*, 29:97-104, 2000.
- Woody B.J. & Hoskins J.D. Ehrlichial diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21:75-98, 1991.
- Vieira R.F.C., Biondo A.W., Guimarães A.M.S., Santos A.P., Santos R.P., Dutra L.H., Diniz Morais A., Messick J.B., Labruna M.B. & Vidotto O. Ehrlichiosis in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20:1-12, 2011.