

UTILIZAÇÃO DO TESTE ELISA E IMUNOCROMATOGRAFIA PARA ERLIQUIOSE EM CÃES COM TROMBOCITOPENIA

Isabela Ferraro Moreno¹, Alefe Caliani Carrera², Marcela Baggio Luz³, Rodrigo Jesus Paolozzi⁴, Patrícia Campos Paolozzi⁵

¹Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. isabelaferrom@gmail.com

²Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. alefe_luiz@hotmail.com

³Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. mbaggioluz@gmail.com

⁴Orientador. Doutorando. Coordenador do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. rodrigo.paolozzi@unicesumar.edu.br

⁵Co-orientador. Mestranda do Curso de Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. pat_campos@hotmail.com

RESUMO

A trombocitopenia é encontrada de maneira rotineira na clínica médica de pequenos animais, as suas causas são diversas, dentre elas: reações pós vacinais, uso de alguns medicamentos como antibióticos, anti-inflamatórios não esteroidais, diuréticos, hepatopatias, produção anormal de plaquetas, remoção imunomediada e hemoparasitoses como *Ehrlichia canis*. A região de Maringá, devido às variáveis climatológicas, favorece o ciclo do carrapato principal vetor da *Ehrlichia canis*, com isso a proliferação desse ectoparasita é considerável, predispondo assim a infecção no cão, no entanto, outras causas importantes que promovem a trombocitopenia são deixadas de lado e muitas vezes não são levadas em consideração para obtenção de um diagnóstico correto em cães. O presente projeto tem a finalidade de avaliar animais, que apresentam trombocitopenia, utilizando o teste de ELISA associado a imunocromatografia para verificar a porcentagem de erliquiose em cães com trombocitopenia. Serão utilizadas 40 amostras de sangue com trombocitopenia coletadas na rotina de atendimento clínico do hospital veterinário da UniCesumar, essas amostras passarão pelos testes de ELISA, associados ao teste rápido de imunocromatografia, sendo ambos para a identificação de *Ehrlichia canis*. As variáveis decorrentes de dados de contagem com distribuição binomial serão avaliadas por percentil, moda de mediana. Os resultados serão expressos em forma de gráfico e tabelas utilizando ferramenta Microsoft Excel do pacote Office 2010.

PALAVRAS-CHAVE: Doenças transmitidas por carrapato; *Ehrlichia canis*; Hematologia.

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose foi relatada pela primeira vez por Donatien e Lestoquard em 1935, na Argélia (DONATIEN, LESTOQUARD, 1937). É causada por uma *Rickettsia* do gênero *Ehrlichia spp*, sendo o seu principal vetor o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (BOUZA-MORA et al, 2017). Dentre as cinco espécies de *Ehrlichia* já descobertas, no Brasil apenas há relatos de *E. canis* até o presente momento (AZEVEDO et al, 2011) como causador da erliquiose monocítica canina (EMC). É considerada uma zoonose (ISMAIL, BLOCH, MCBRIDE, 2010; BOUZA-MORA et al, 2017)

Essa *Rickettsia* é uma bactéria Gram negativa com alta capacidade pleomórfica (HARRUS, WANER, 2011) e de parasitismo intracelular obrigatório (FONSECA et al, 2017), infecta células da linhagem hematopoiética, onde mononucleares, como monócitos e linfócitos, são os principais alvos (WITTER et al, 2013), o que culmina para uma infecção persistente (AGUIAR et al, 2007). O período de incubação é de 8 a 20 dias (HARRUS, WANER, BARK, 1997), decorrendo-se em sequência a fase aguda, que pode perdurar por até três semanas (HARRUS, WANER, BARK, 1997; HARRUS, WANER, NEER, 2012), sendo seguida pela fase subclínica, ou assintomática, havendo recuperação espontânea dos sinais clínicos, onde a sua capacidade imune determinará: possível eliminação do agente; manutenção do agente em fase latente até que seja reativado novamente; ou ocorrência da fase crônico-medular (HARRUS, WANER, BARK, 1997), que leva à supressão da medula óssea, diminuindo ou cessando seu funcionamento (HARRUS, WANER, NEER, 2012).

Referente aos achados laboratoriais, EMC tem principalmente a trombocitopenia em sua fase aguda, enquanto na fase crônica há pancitopenia devido à falência medular (HARRUS, WANER, NEER, 2012). A diminuição na contagem de plaquetas está

relacionada com lesões inflamatórias endoteliais em vasos causadas pela *Ehrlichia*, sequestro esplênico, destruição imunomediada e também por lesões que geram sangramentos. Ainda há diminuição da agregação plaquetária, fatos que culminam com hemorragias (HARRUS et al, 1999). Dentre as demais alterações em hemograma, há: anemia, leucocitose, neutropenia, linfopenia e eosinofilia. Em exames bioquímicos, aumento nos níveis de AST, ALT e FA, além de hiperbilirrubinemia, aumento de uréia e creatinina. Há também hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (WOODY, HOSKINS, 1991).

O diagnóstico precoce de EMC possibilita melhor prognóstico, por ainda encontrar-se em fase inicial, e também por identificar portadores (IQBAL, CHAICHANASIRIWITHAYA, RIKIHISA, 1994). Comumente, é realizado através das alterações dos parâmetros hematológicos, principalmente por trombocitopenia (LITTLE, 2010). Little (2010) identificou o tempo médio de sete dias após a infecção pelo hemoparasita para que houvesse reação imune de produção de anticorpos anti-*Ehrlichia*, sendo estes um método diagnóstico, pois permitem a identificação através dos testes rápidos, através da metodologia ELISA, característica do SNAP 4Dx PLUS TEST (IDEXX) (STILLMAN et al, 2014). O PCR é o método de identificação mais sensível, o qual auxilia para o correto diagnóstico de EMC, reconhecendo o DNA do microrganismo no sangue do hospedeiro. Como métodos alternativos de diagnóstico há imunocromatografia e imunofluorescência indireta, os quais identificam anticorpos espécie-específicos para *Ehrlichia*. O esfregaço sanguíneo não é considerado meio diagnóstico eficiente (DERAKHSHANDEH, SHARIFIYAZDI, HASIRI, 2017).

Este estudo tem como objetivo avaliar a relação da trombocitopenia em cães com o real acometimento por EMC através do teste ELISA e imunocromatografia utilizando amostras de soro sanguíneo, a fim de comparar o resultado de ambos os métodos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo será realizado no Hospital Veterinário UniCesumar, na cidade de Maringá – Paraná, campus sede desta instituição. Ocorrerá através do uso de amostras sanguíneas de 40 animais, provenientes da rotina clínica, as quais serão submetidas à análise hematológica através de hemograma.

Os animais serão selecionados a partir da suspeita clínica, onde durante a anamnese houver suspeita de erliquiose monocítica canina (EMC), e laboratorial a partir de resultados de hemograma, como a trombocitopenia. A partir dos achados laboratoriais, as amostras sanguíneas serão submetidas aos testes rápidos, ambos de resultados qualitativos para hemoparasitoses, sendo eles os testes pelos métodos ELISA e imunocromatografia, a fim de identificar a presença de *Ehrlichia spp.*

Posteriormente, será feita a comparação e estabelecimento de relações estatísticas entre: quantidade de animais com trombocitopenia que foram positivos para EMC em todos os testes e exames realizados; Quantidade de animais com trombocitopenia que foram positivos apenas em um dos testes rápidos; estabelecer diferença de eficiência entre o teste ELISA e o teste de imunocromatografia.

As variáveis decorrentes de dados de contagem com distribuição binomial serão avaliadas por percentil, moda de mediana. Os resultados serão expressos em forma de gráfico e tabelas utilizando ferramenta Microsoft Excel do pacote Office 2010.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Busca-se comprovar a diferença de resultados entre ambos os testes rápidos, frente ao diagnóstico da erliquiose monocítica canina, onde segundo indícios de resultados de pesquisas prévias o teste ELISA apresenta maior confiabilidade diagnóstica quando comparado ao teste de imunocromatografia.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.126-132, 1 jan. 2007. Oxford University Press (OUP).
- AZEVEDO, S. S. de et al. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.14-18, 1 fev. 2011. Universidade de São Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP.
- BOUZA-MORA, L. et al. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks And Tick-borne Diseases**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.36-40, jan. 2017. Elsevier BV.
- DERAKHSHANDEH, N.; SHARIFIYAZDI, H.; HASIRI, M. A. Molecular detection of *Ehrlichia spp.* in blood samples of dogs in southern Iran using polymerase chain reaction. **Vet Res Forum**, [s.i.], v. 8, n. 4, p.347-351, dez. 2017.
- DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. State of the present knowledge concerning Rickettsioses of animals. **Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie Institut Pasteur D'Algériev.** v.15, n.1, p. 142–187, 1937
- FONSECA, J. P. et al. Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. **Ciência Animal Brasileira**, [s.l.], v. 18, n.1, p.1-9, 2017. FapUNIFESP (SciELO).
- HARRUS, S. et al. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.i.], v. 37, n. 9, p. 2745-2749, set. 1999. American Society for Microbiology.
- HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, [s.l.], v. 187, n. 3, p.292-296, mar. 2011. Elsevier BV.
- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997.
- HARRUS, S.; WANER, T.; NEER, T. M. *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4 ed. Philadelphia: Elsevier B.V. Saunders Company, 2012. v. 1, p. 227-238.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J Clin Microbiol.**, [s.i.], v. 32, n. 7, p.1658-1662, jul. 1994.
- ISMAIL, N., BLOCH, K.C., MCBRIDE, J.W.,. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. **Clin. Lab. Med.** v.30, n.1 p. 261–292, 2010

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. [s.l.], v. 40, n. 6, p.1121-1140, nov. 2010. Elsevier BV.

STILLMAN, B. A. et al. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **Journal Of The American Veterinary Medical Association**, [s.l.], v. 245, n. 1, p.80-86, jul. 2014. American Veterinary Medical Association (AVMA)

WITTER, R. et al. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmoze trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 34, n. 62, p.3811-3822, 17 dez. 2013. Universidade Estadual de Londrina.

WOODY, B. J; HOSKINS J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.** [s.l.], v.21, n.1, p. 75-98, 1991.