

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS CITOLÓGICAS E MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO

Patrícia Gonzaga Paulino¹ Renata Lins da Costa² Marcus Sandes Pires³ & Huarrisson Azevedo Santos⁴

1. Bolsista PROIC de Iniciação Científica e Graduanda do curso de Medicina Veterinária IV/UFRRJ; 2. Doutoranda do Curso de Pós graduação em Ciências Veterinárias IV/UFRRJ; 3. Pós doutorando do Curso de Pós graduação em Ciências Veterinárias IV/UFRRJ 4. Professor Adjunto do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública/IV/UFRRJ.

Palavras-chave: Erliquiose Monocítica Canina; Diagnóstico molecular; citologia.

Introdução

Ehrlichia canis é o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC). Os sinais clínicos são: anemia, febre, anorexia, caquexia e epistaxe (Dagnone et al., 2001). Vários métodos de diagnóstico são utilizados tal como a detecção de anticorpos específicos (Imunofluorescência-IFA), considerado padrão ouro, além do diagnóstico citológico e molecular. Na rotina clínica o diagnóstico citológico é amplamente utilizado uma vez que a presença de mórulas intracitoplasmáticas pode ser observada em esfregaços de sangue periférico, entretanto, a sensibilidade deste método é baixa segundo Mylonakis et al. (2003). Técnicas moleculares, reconhecidamente mais sensíveis, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido recentemente empregadas para o diagnóstico de *E. canis* visando oferecer um diagnóstico mais preciso e seguro. O objetivo do presente estudo é comparar as técnicas de PCR em tempo real (qPCR), PCR convencional (cPCR) e exame citológico para o diagnóstico desta bactéria em cães naturalmente infectados oriundos da região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Metodologia

Foram selecionadas 100 amostras de sangue de cães oriundos da região Metropolitana do Rio de Janeiro. A partir de amostras de sangue foram realizados esfregaços sanguíneos que foram fixados em metanol, corados com Giemsa e examinados na magnitude de 1000x em microscópio fotônico. Para análise molecular realizou-se a extração de DNA com kit comercial (Promega®), seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop2000®), aliqüotadas (100ng/µl) e mantidas em freezer -20°C até as análises. As amostras de DNA dos cães foram analisadas por cPCR com alvo no fragmento de 409 bp do gene *dsb* para *Ehrlichia sp.*, as reações ocorreram segundo protocolo de Aguiar et al. (2007). Posteriormente realizou-se qPCR com alvo no fragmento de 93bp do gene *16S rRNA* de *E. canis*, as reações foram realizadas em duplicata segundo protocolo de Baneth et al. (2009).

Utilizou-se o teste de McNemar para avaliar as proporções discordantes entre PCR convencional, a qPCR e o exame citológico. Foram considerados pares discordantes aqueles que apresentaram valor de $p < 0,05$ (AYRES, 2007).

Resultados e Discussão

Do total de amostras, 29% (n=29/100) foram positivas para *E. canis* pelas três técnicas de diagnóstico. Estes resultados confirmam a circulação do agente da EMC na região do estudo. Os resultados obtidos foram considerados superiores ao encontrados por Macieira et al. (2005) que encontraram uma frequência de positividade de 15% em amostras testadas por citologia e molecular em cães da mesma região do estudo. Albernaz et al. (2007) encontraram uma frequência de positividade de 13,89% em cães da região norte fluminense pela técnica citológica. Acetta (2008) determinou uma frequência de 7,45% de positividade em cães da Região Litorânea, estado do Rio de Janeiro. Constatou-se que 73% das amostras (n=73/100) apresentaram inclusões basofílicas sugestivas de parasitismo por *E. canis* em monócitos na avaliação do esfregaço sanguíneo. No entanto, entre as 100 amostras avaliadas, somente 40% apresentaram amplificação do gene *dsb* de *E. canis* em cPCR. Este resultado demonstra uma discordância entre as técnicas de citologia e cPCR ($p=0,0001$). Quando comparados os resultados de citologia com qPCR para amplificação de 93pb do gene *16S rRNA* para *E. canis* foi observado discordância entre as técnicas ($p=0,0001$). Foram observadas em 33% (n=33/100) das amostras testadas positividade para as técnicas de esfregaço sanguíneo e cPCR. Contudo, das 73 amostras em que foram encontradas inclusões basofílicas em monócitos 54,79% (n=40/73) foram negativas para *E. canis* na

cPCR. Resultados semelhantes também foram observados quando se comparou citologia com qPCR ocorrendo amplificação em 34% (n=34/100) das amostras testadas para o gene *16S rRNA* de *E. canis* demonstrando também discordância entre as técnicas (p=0,0001). Desta forma é possível observar, que quando a técnica de esfregaço é comparada com as técnicas moleculares selecionadas, houve ocorrência de um elevado número de amostras consideradas positivas na citologia e negativas nos testes moleculares. Em estudos realizados por Xavier (2011) foi observado que em 48% das amostras apresentando inclusões em células sanguíneas, foram consideradas negativas no diagnóstico molecular. Para Mylonakis et al. (2003), os falso-positivos observados na citologia seriam devido a semelhança de mórulas com granulações presentes em monócitos ativados, período de riquetsemia relativamente curto além da observação de outros indivíduos da família Anaplasmataceae, promovendo observação inequívoca do operador. Em outros estudos também é mencionado a presença de material de fagocitose ou grânulos azurófilos que podem ter certa similaridade com mórulas de *E. canis* causando confusão no diagnóstico direto (Ramos et al 2009).

Quando se comparou a detecção de *E. canis* utilizando-se cPCR e qPCR observou-se que 34% (n=34/100) das amostras apresentaram positividade em ambas as técnicas, na avaliação das mesmas não houve discordância entre as técnicas (p=1). As duas técnicas moleculares demonstraram especificidade superior a 90%. A co-positividade qPCR/cPCR foi 97,14%, enquanto que a co-positividade cPCR/qPCR foi de 85%, estes valores demonstram uma sensibilidade relativa da qPCR superior a cPCR. A capacidade da qPCR em detectar baixas quantidades de DNA pode ser justificado pelas características intrínsecas da qPCR, como o uso de fluorocromos, que aumentam a sensibilidade da técnica (Almeida & Melo, 2011). Observou-se ainda que 17,64% (n=6/34) das amostras apresentaram-se positivas para cPCR e negativas para qPCR, uma vez que os primers utilizados na cPCR detecta todas as espécies do gênero *Ehrlichia*.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos conclui-se que *Ehrlichia canis* circula na região do estudo, além disso, observou-se que as técnicas moleculares apresentaram uma sensibilidade relativa quando comparadas a citológica. A técnica citológica apresentou especificidade relativa superior na detecção de *E. canis* quando comparado com as técnicas moleculares.

Referências Bibliográficas

- ACETTA, E. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) trombocitopênicos da região dos lagos do Rio de Janeiro. Dissertação: UFRRJ, Rio de Janeiro, 2008.
- AGUIAR, D.M. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. J. Med. Entomol. 44(1): 126-132, 2007.
- ALBERNAZ, A.P. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Ciência Animal Brasileira, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.
- ALMEIDA, H.K.A. & MELO, M.A.M. Evidência sorológica e molecular de erliquiose canina no município de Patos. IN: IX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, 2011.
- BANETH, G. et al. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. Veterinary Microbiology 136, 321–325, 2009.
- DAGNONE, A. S. et al. Erliquiose nos animais e no homem. Seminário: Ciências Agrárias, v.22, n.2, p. 191-201, 2001.
- MACIEIRA, D.B. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. Veterinary Clinical Pathology. v. 34:1, 2005.
- MYLONAKYS, M. E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Veterinary Microbiology, v. 91, n. 2/3, p. 197-204, 2003.
- RAMOS, C. et al. Comparação de *nested*-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. Rev Bras Parasitol Vet 18.S1: 58-62, 2009.
- XAVIER, M.S. Estudos de Hemoparasitas por evidências morfológicas, sorológicas e moleculares com ênfase na família Anaplasmataceae em *Canis familiaris* L. na região litorânea do Estado do Rio de Janeiro. Tese: UFF, Niterói, 2011.