

PREVALÊNCIA DE *EHRlichia* SP EM CÃES DE DOIS DISTRITOS SANITÁRIOS DE SALVADOR, BAHIA.

SOUZA, B.M.P.S.¹; LEAL, D.C.¹; BARBOZA, D.C.P.M.¹; UZÊDA, R.S.¹; ALCÂNTARA, A.C.¹; SILVA, N.S.*¹; FERREIRA, F.²; LABRUNA, M. B.²; GONDIM, L.F.P.¹; FRANKE, C. R.¹

INTRODUÇÃO

A erliquiose canina é uma doença transmitida por carrapatos e provocada por bactérias Gram negativas de ocorrência intracelular obrigatória nas células mononucleares do hospedeiro (Murphy *et al.*, 1998; Skotarczak, 2003). Considerada uma das doenças infecciosas mais importantes para os cães, a prevalência desta enfermidade tem relação direta com os vetores ixodídeos, os quais são dependentes das populações de hospedeiros susceptíveis à infestação e das condições climáticas. Apesar de no Brasil a *E. canis* ser a única espécie descrita de *Ehrlichia* sp infectando os cães, há evidências sorológicas da presença de *E. chaffeensis* em cães no Estado de Minas Gerais (Galvão *et al.*, 2002) e detecção de DNA desta espécie em cervídeo (*Blastocerus dichotomus*) capturado no Rio Paraná entre o sudoeste do Estado de São Paulo e leste de Mato Grosso do Sul (Machado *et al.*, 2006). Tendo-se conhecimento que o *R. sanguineus* é capaz de transmitir a *E. canis* e a *E. ewingii* e, potencialmente *E. chaffeensis*, e que possui distribuição mundial, incluindo o Estado da Bahia, a principal hipótese no presente trabalho é que além da *E. canis*, a *E. ewingii* e a *E. chaffeensis* possam estar infectando os cães no município de Salvador, Bahia, mas, não estão sendo corretamente diagnosticadas em vista da possibilidade de reações-cruzadas nos testes sorológicos. O objetivo deste estudo foi identificar as espécies de *Ehrlichia* sp em cães e carrapatos vetores em dois distritos sanitários do município Salvador, Bahia.

METODOLOGIA

Área de estudo

O estudo foi realizado nos Distritos Sanitários (DS) de Itapuã e Cajazeiras, no município de Salvador, Estado da Bahia. A gestão da saúde em Salvador é planejada com base na subdivisão geográfica do município em 12 Distritos Sanitários (DS), cada um composto por diversos bairros. (Figura 1).

Animais

O tamanho total da amostra a ser examinada foi definido utilizando 1% da população canina de cada distrito sanitário investigado, sendo 269 animais no distrito de Itapuã e 203 no distrito de Cajazeiras, totalizando 472 cães. Foi estabelecido um total de 79 setores censitários a serem estudados, sendo 44 no distrito de Itapuã e 35 em Cajazeiras. A amostragem por setor censitário foi determinada pela população dessa área segundo IBGE, proporcionalmente a amostragem total do DS. As coletas das amostras de sangue canino e carrapatos foram realizadas nos meses de março,

¹ Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia. Av. Adhemar de Barros, nº 500, Ondina, CEP: 40.170-110, Salvador, Bahia, Brasil.

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques Paiva, nº 87, CEP: 05.508-270, Cidade Universitária, São Paulo, São Paulo, Brasil.

maio e julho de 2006. Apenas um cão por domicílio foi incluído na investigação. Dos cães investigados que apresentavam infestação por carrapatos, estes eram removidos dos cães e acondicionados a -20°C até extração do DNA.

Imunofluorescência Indireta

O teste de imunofluorescência indireta seguiu o protocolo descrito por Aguiar et al, (2007a), sendo que foi utilizada ponto de corte uma diluição dos soros de 1:80 em PBS com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA). A leitura das lâminas foi realizada em microscopia de epifluorescência (BX50, OLIMPUS®) com o aumento de 400X.

Extração de DNA e Nested-PCR

A extração de DNA das amostras de sangue dos cães soropositivos para *E. canis* foi realizada com Kit Comercial (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, USA) conforme a descrição do fabricante. Os carrapatos coletados foram classificados quanto à espécie e submetidos à extração de DNA (Sambrook et al. 2001). A amplificação de fragmentos de DNA de *Ehrlichia spp*, em amostras de sangue periférico de cães e carrapato dos animais selecionados, ocorreu de acordo com a técnica descrita por Murphy et al. (1998).

Análise estatística

Para o cálculo da amostragem do inquérito canino e sorteio dos setores censitários investigados neste trabalho, utilizou-se o *software* Minitab *statistical*.

RESULTADOS

A prevalência de cães soropositivos para *E. canis* nos distritos sanitários investigados foi de 35,6% (168/472), sendo de 41,4% (84/203) no DS de Cajazeiras e de 31,2% (84/269) em Itapuã. A *nested-PCR* para *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* nas amostras soropositivas resultou em 34,5% (58/168) de positividade para *E. canis* (Figura 3), não sendo detectados animais positivos para *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (Figura 4).

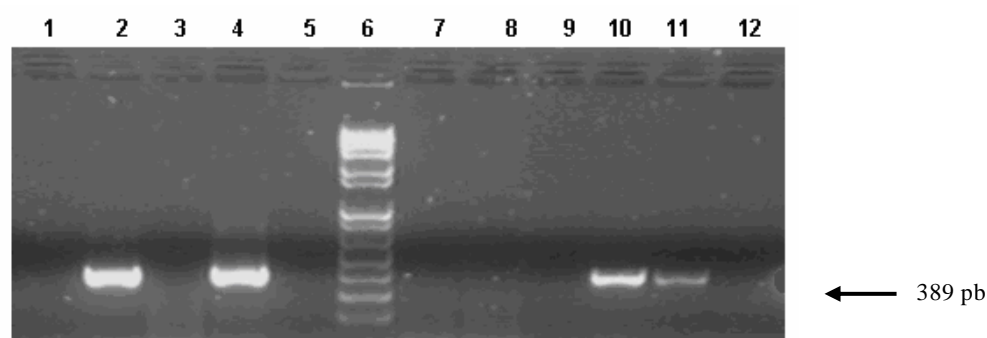


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos amplicons do gene 16S rRNA de *E. canis* das amostras do DNA de cães soropositivos dos distritos sanitários de Itapuã e Cajazeiras. Linha 1: controle negativo; Linha 2: controle positivo para *E. canis*; Linhas 4, 10, 11: amostras positivas para *E. canis*; Linhas 3, 5, 7, 8, 9, 12: amostras negativas para *E. canis*; Linha 6: Marcador de pares de base (100 pb)

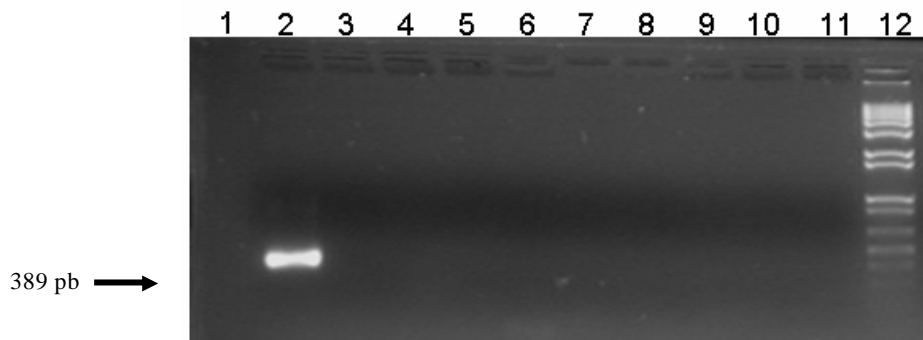


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos amplicons do gene 16S rRNA de *E. chaffeensis* das amostras do DNA de cães soropositivos dos distritos sanitários de Itapuã e Cajazeiras. Linha 1: controle negativo; Linha 2: controle positivo para *E. chaffeensis*; Linhas 3- 11: amostras negativas para *E. chaffeensis*; Linha 12: Marcador de pares de base (100 pb).

Foram coletados e classificados os carrapatos em 35 cães. Todos pertenciam à espécie *Rhipicephalus sanguineus* e apresentavam diferentes estágios do ciclo de vida. Dos cães em que os carrapatos foram coletados, 22 eram soronegativos e 13 soropositivos, sendo que destes soropositivos três cães eram também PCR-positivos para *E. canis*. Em 20% (7/35) dos carrapatos foi detectada infecção por *E. canis*, através da nested-PCR. Dos sete carrapatos PCR-positivos, dois foram obtidos de cães soronegativos e cinco de cães soropositivos, sendo que dois dos cinco cães soropositivos eram, também, PCR-positivos para *E. canis*. Em nenhum dos carrapatos a nested PCR com *primers* específicos para DNA de *E. chaffeensis* e *E. ewingii* produziu amplicons.

DISCUSSÃO

Neste estudo ficou demonstrado que 35,6% (168/472) dos cães, investigados nos DS's de Cajazeiras e Itapuã, apresentavam anticorpos anti- *E. canis*. Aguiar *et al.*, (2007b) no município de Monte Negro, Roraima obtiveram uma prevalência similar ao observado neste estudo de 37,9% (58/153), utilizando uma amostragem de área urbana selecionada aleatoriamente. Em um estudo realizado nos municípios de Itabuna e Ilhéus, região sudoeste da Bahia, apesar dos animais utilizados terem sido provenientes de atendimento clínico, a prevalência de infecção (36%, 72/200) foi semelhante à encontrada no estudo corrente (Carlos *et al.*, 2007). Estudos prévios têm registrado soroprevalência para *E. canis* de 32% e 76%, em cães provenientes de clínicas e hospitais veterinários da África e Estados Unidos (Wen *et al.*, 1997; Ndip *et al.*, 2005).

A infecção por *E. canis*, confirmada pela nested-PCR em cães soropositivos, foi detectada em 34,5% (58/168) dos animais. Na África e nos Estados Unidos, a confirmação de infecção pela PCR foi obtida em 41% dos cães positivos pela IFI (Wen *et al.*, 1997; Ndip *et al.*, 2007). A combinação das técnicas de IFI e PCR para o diagnóstico da erliquiose canina tem sido sugerida por alguns autores, o que é justificado pela alta sensibilidade e maior rapidez na execução desses testes (Iqbal *et al.*, 1994; Wen *et al.*, 1997).

A diferença entre o número de cães soropositivos e o número destes que foram confirmados como infectados na PCR, pode ser explicada com os seguintes

argumentos: 1) a IFI não permite a identificação de infecção ativa e, considerando que a erliquiose é endêmica em Salvador e que os cães não exibiam sinais clínicos da doença, uma parte dos animais infectados poderia ter evoluído para a cura, conservando títulos detectáveis de anticorpos anti-*E. canis* (Harrus *et al.*, 1998a; Skotarczak, 2003) e 2) considerando que a técnica de *nested*-PCR utilizada neste estudo apresenta alta sensibilidade e especificidade (Wen *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 1998), a capacidade do teste de detectar a presença de DNA de *Ehrlichia* nos cães soropositivos vai depender do tipo de tecido coletado para o exame. Na fase aguda a *Ehrlichia* pode ser detectada com facilidade no sangue, ao passo que, nas fases subclínica e crônica os tecidos mais adequados para serem amostrados seria o esplênico e a medula óssea, respectivamente (Harrus *et al.*, 1998a; 1998b; Harrus *et al.*, 2004; Mylonakis *et al.*, 2004). Considerando que no presente estudo foram utilizadas apenas amostras de sangue para a *nested*-PCR, é possível que cães em fases clínicas mais avançadas não puderam ser corretamente diagnosticados.

Todos os carrapatos coletados durante o estudo pertenciam a espécie *R. sanguineus* e parasitavam os cães no momento da coleta. A frequência de infecção por *E. canis* detectada pela *nested*-PCR nos carrapatos coletados foi 20% (7/35). São poucos os dados disponíveis de infecção por *E. canis* em *R. sanguineus* (Murphy *et al.*, 1998; Unver *et al.*, 2001; Ndip *et al.*, 2007). No estudo realizado por Aguiar *et al.* (2007b) em Monte Negro (Roraima), a frequência de infecção por *E. canis* em *R. sanguineus* coletados de cinco cães foi de 2,4% (4/165). Resultado similar ao registrado neste estudo foi observado na África com uma frequência de infecção de 21% (19/92), onde os carrapatos eram provenientes de 15 cães (Ndip *et al.*, 2007). A frequência de carrapatos infectados encontrada no presente estudo sugere uma dinâmica de infecção intensa nas populações estudadas e aponta para a necessidade de mais estudos envolvendo amostragens maiores do vetor, incluindo variações sazonais e dados sobre as fases clínicas da doença nos cães amostrados.

Não foi detectada a infecção por *E. chaffeensis* e *E. ewingii* em nenhuma das amostras de cães e carrapatos analisadas neste estudo. Em um trabalho realizado em São Paulo com cães clinicamente suspeitos para doenças transmitidas por carrapatos (n=198), também não foi identificada a presença destas duas espécies de *Ehrlichia* (Diniz *et al.*, 2007). A não detecção de *E. chaffeensis* e *E. ewingii* em cães nos estudos realizados no Brasil pode ser atribuída ao fato do carrapato *R. sanguineus* possivelmente não ser um vetor eficiente da *E. chaffeensis* e da *E. ewingii*. Apesar disso, há descrição da *E. chaffeensis* infectando cervos no Brasil (Machado *et al.*, 2006), além de relatos de detecção de *E. chaffeensis* e *E. ewingii* em *R. sanguineus* na República dos Camarões na África (Ndip *et al.*, 2007)

CONCLUSÃO

Neste estudo não foi possível comprovar a ocorrência de *E. chaffeensis* e *E. ewingii* em cães e carrapatos. Futuros estudos objetivando o monitoramento da erliquiose canina em Salvador poderiam incluir a análise molecular de outros tecidos, além do sangue, para aumentar a chance de detecção do parasito. Dada a prevalência de *E. canis* nas populações caninas e de carrapatos estudadas, há um risco potencial de ocorrência de infecção em humanos, o que torna necessário o monitoramento da doença em Salvador, Bahia.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro ao projeto e pela bolsa de mestrado concedida; à Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB) e ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Salvador pelo suporte técnico oferecido durante toda a execução deste trabalho e pelo fornecimento de dados epidemiológicos; à Fundação Alexander von Humboldt pela doação dos equipamentos de biologia molecular ao Prof. Dr Carlos Roberto Franke (III-ERSX-BRA/1067633).

REFERÊNCIAS

Aguiar, D. M.; Cavalcante, G. T.; Pinter, A.; Gennari, S. M.; Camargo, L. M. A.; Labruna, M. B. 2007b Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Vector-borne Diseases, Surveillance, Prevention**. v. 44, n. 1, p. 126- 132.

Aguiar, D. M.; Saito, T. B.; Hagiwara, M. K.; Machado, R. Z.; Labruna, M. B. 2007a Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p. 796- 802.

Carlos, R. S.; Muniz Neta, E. S.; Spagnol, F. H.; Oliveira, L. L.; De Brito, R. L.; Albuquerque, G. R.; Almosny, N. R. 2007 Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus- Itabuna, State of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 16, n. 3, p. 117-120.

Dawson J.E., Biggie K.L., Warner C.K., Cookson K, Jenkins S, Levine J.F., Olson J.G.. 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. **American journal of veterinary research**. v. 57, n. 8, p.1175-1179.

Diniz, P. P. V. P.; Schwartz, D. S.; Morais, H. S. A.; Breitschwerdt, E. B. 2007 Surveillance for Zoonotic Vector-Borne Infections Using Sick Dogs from Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 7, n. 4, p. 689- 697.

Galvão, M. A. M.; Lamounier, J.A.; Bonomo, E.; Tropia, M. S.; Rezende, E. G.; Calic, S. B.; Chamone, C. B.; Machado, M. C.; Otoni, M. E. A.; Leite, R. C.; Caram, C.; Mafra, C. L.; Walker, D. H 2002. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 186, p. 1593-1597.

Harrus, S; Kenny, M.; Miara, L.; Aizenberg, I.; Waner, T.; Shaw, S. 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, p.4488-4490.

Harrus, S; Waner, T.; Aizeberg, I; Foley, J.E.; Poland, A.M.; Bark, H 1998a. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.1, p.73-76.

Harrus, S; Waner, T.; Keysary, A.; Aroch, I.; Voet, H.; Bark, H 1998b Investigation splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.62, p.15-27.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), **Censo demográfico**, 2000.

Iqbal, Z; Chaichanasiriwithaya, W; Rikihisa, Y. 1994 Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal Clinical Microbiology**. v.32, n.7, p. 1658-1662.

Machado, R. Z.; Duarte, J. M. B.; Dagnone, A. S.; Szabo, M. P. J. 2006. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**. v. 132, n. 1- 3, p.262- 266.

Murphy, G.L.; Ewing, S.A.; Withworth, L.C.; Fox, J.C.; Kocan, A.A. 1998 A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**. v.79, p. 325-339.

Mylonakis, M.E.; Koutinas, A.F.; Breitschwerdt, E.B.; Hegarty, B.C.; Leontides, L.S.; Kontos, V.S. 2004. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**. .40, P.174-184.

Ndip, L. M.; Ndip, R. N.; Ndivi, V. E.; Awuh, J. A.; Walker, D. H.; McBride, J. 2007. W. *Ehrlichia* Species in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks in Cameroon. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 7, n. 2, p. 221-228.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 2001.**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 3.

Skotarczack, B. 2003. Canine ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v.10, p.137-141.

Thrusfield, M. 1995 **Veterinary Epidemiology**. Cambridge: Black-Weel Science, 479p.

Unver, A.; Perez, M.; Orellana, N.; Huang, H.; Rikihisa, Y. 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal Clinical Microbiology**. v.39, n.8, p. 2788-2793.

Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E, Avidar Y, Keysary A 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**. v.69, p. 307-317.

Wen, B.; Rikihisa, Y.; Mott, J.M.; Greene, R.; Kim, H. Y.; Zhi, N.; Couto, G.C.; Unver, A.; Bartsch, R. 1997 Comparison of Nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal Clinical Microbiology**. v. 35, n.7, p. 1852-1855.