

## **COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS SOROLÓGICOS REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) NO DIAGNÓSTICO DE ERLIQUIOSE CANINA EM 55 ANIMAIS.**

*COMPARISON BETWEEN THE SEROLOGICAL METHODS IMMUNOFLUORESCENT INDIRECT REACTION (RIFI) AND IMUNOENZYMATIC TEST (ELISA) IN THE CANINE EHRlichiosis DIAGNOSTIC IN 55 ANIMALS.*

**FERNANDES, P. V. B.<sup>1(\*)</sup>; JERICÓ, M. M.<sup>2</sup>; LOPES, P. A.<sup>3</sup>; MOREIRA, M. A. B.<sup>4</sup>; SULTANUM, C. A. R.<sup>3</sup>; ZORZI, V. B.<sup>1</sup>; GONZALEZ, R.<sup>4</sup>; ROLAN, R. T.<sup>3</sup>; KAJIHARA, K.<sup>5</sup>.**

**Palavras-chave:** erliquiose, diagnóstico, sorologia, comparação.

**Keywords:** ehrlichiosis, diagnosis, serology, comparison.

### **1.0 INTRODUÇÃO**

A erliquiose canina é uma enfermidade endêmica que acomete praticamente todas as regiões do Brasil, envolve o microorganismo bacteriano *Ehrlichia sp* e é transmitida pelo vetor biológico *Rhipicephalus sanguineus* que uma vez infectado pode transmitir a doença por até 155 dias após a separação do hospedeiro. No vetor a *E. canis* multiplica-se nos hemócitos e nas células da glândula salivar, ocorrendo transmissão transtadial. No hospedeiro vertebrado ocorre infecção e multiplicação em células do sistema monocítico fagocitário (linfonodos, baço, fígado e medula óssea). Pode ocorrer transmissão iatrogênica através de transfusões sanguíneas (sendo necessária a seleção sorológica de cães doadores) (BIRCHARD e SHERDING, 1998).

O primeiro caso de erliquiose relatado no Brasil foi em Belo Horizonte no ano de 1973, onde foram observadas mórulas da rickettsia dentro de linfócitos (COSTA *et al*, 1973).

As espécies de cães naturalmente infectadas incluem *E. canis* (cepa mononuclear), *A. platys* (cepa plaquetária) e *E. ewingii* (cepa neutrofílica). A *E. canis* é a mais comum e causa a doença clínica mais grave. Formam agrupamentos intracitoplasmáticos em forma de amora, e com coloração magenta-escura ou azul-acinzentada, chamados mórulas (três a seis micrometros). As células alvo são plaquetas, monócitos, linfócitos, neutrófilos (BIRCHARD e SHERDING, 1998).

Após um período de incubação de sete a 21 dias, a doença causada por *E. canis* pode evoluir para as fases aguda, assintomática (ou estado de portador) e crônica. A doença clínica pode ocorrer em qualquer cão, mas sua gravidade varia dependendo dos fatores do microorganismo e do hospedeiro. A virulência varia com as diferentes cepas de campo da *E. canis* (ETTINGER e FELDMAN, 1997).

Segundo KAKOMA *et al*, (2000), as principais manifestações clínicas são: apatia, anorexia, emaciação, letargia, sinais de depressão, febre, palidez de mucosas, histórico de ixodidiose ou sinais de distúrbio de coagulação como epistaxe, petéquias, sufusões, melena, hematúria ou hifema.

O diagnóstico da erliquiose canina tem como base o histórico clínico, exames laboratoriais (hemograma completo, bioquímica sérica, eletroforese de proteínas); sorológicos pelas técnicas de reação de imunofluorescência indireta

(RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA); molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e exame direto, pela técnica de citologia aspirativa de baço, linfonodos e pulmão, esfregaço sanguíneo e cultura (ANDEREG e PASSOS, 1999).

O esfregaço sanguíneo raramente é eficaz para detectar o microorganismo (5% de positividade), utiliza-se sangue total coletado, sem anticoagulante, de preferência na borda da orelha, em seguida deve ser fixado em álcool metílico e depois corado. O achado de mórulas nas células confirma um diagnóstico de infecção por *Ehrlichia*, mas é raro, exceto no caso de infecção com uma cepa granulocítica (ETTINGER e FELDMAN, 1997; ANDEREG e PASSOS, 1999).

A RIFI é usada para detectar anticorpos no soro ou para identificar antígenos nos tecidos ou nas culturas celulares, utilizando um conjugado fluorescente para evidenciação da reação. Os antígenos utilizados geralmente são procedentes do cultivo de células infectadas com *E. canis*, havendo mínima reação cruzada entre as espécies, exceto entre a *Ehrlichia canis* e a *Ehrlichia equi*. Em cães infectados experimentalmente, o período prévio para a detecção de anticorpos se inicia entre oito a 24 dias, embora alguns cães não se apresentem soropositivos até 28 dias pós infecção, devido à variação da resposta individual de cada animal. Os soros que apresentam reação em diluição igual ou maior a 1:10 podem ser considerados positivos, porém títulos de 20 a 80 são considerados relativamente baixos. O título do soro pode variar de acordo com o estágio da infecção, o envolvimento imunológico com o agente patogênico e a raça. Assim, títulos de anticorpos de alta magnitude geralmente refletem uma infecção crônica. A persistência do título de anticorpos na RIFI por períodos maiores que seis meses após tratamento, pode indicar que o agente não foi totalmente eliminado, havendo também a possibilidade do cão se reinfectar. Tem-se observado um rápido decréscimo nos títulos da RIFI, um pouco antes do óbito, estes cães freqüentemente têm uma severa depressão medular e são hipogamaglobulinêmicos (ANDEREG e PASSOS, 1999).

WESTERN IMMUNOBLOTTING apresenta sensibilidade comparável à RIFI, e tem vantagem na objetividade da leitura, não sofre interferência da subjetividade do operador, como ocorre na RIFI (CHAICHANASIRIWITHAYA *et al*, 1994). Porém apresenta desvantagens, como elevado custo, maior tempo na realização e requer alta técnica (ANDEREG e PASSOS, 1999).

PCR é altamente sensível e específico. Útil para avaliar a eliminação dos organismos após a terapia antibiótica, a principal vantagem da PCR é identificar a espécie de *Ehrlichia* causadora da infecção, o que nem sempre é possível com outras técnicas. Muitos autores afirmam que o ideal é a associação de RIFI e PCR, como WEN *et al*, (1997), e CHAICHANASIRIWITHAYA *et al*, (1994).

Em relação à técnica de ELISA, utiliza antígenos purificados de cultura de células DH 82 infectadas com *E. canis* aderidos a tiras de papel de nitrocelulose. Apresenta sensibilidade e especificidade comparável a RIFI. A detecção da exposição recente e da infecção ativa pode ser realizada comparando títulos pareados (ANDEREG e PASSOS, 1999).

Um estudo que mostrou a aplicabilidade de proteínas recombinantes foi conduzido por BÉLANGER *et al*, (2002), comparando as técnicas de RIFI,

ELISA, com utilização de proteína recombinante rMAP2, e três testes comerciais utilizando Dot-ELISA, para a detecção de anticorpos em 35 amostras de soro de cães naturalmente infectados e que apresentavam sinais consistentes de erliquiose e título de RIFI positivo (=1:40). Os autores verificaram que o ELISA rMAP-2 foi o teste de maior acurácia, com maior chance de identificação do estado de infecção de um animal. Contudo, KNOWLES *et al*, (2003), constataram que não foi possível diferenciar sorologicamente a infecção por *E. canis* e *E. chaffeensis* ao utilizar a rMAP2 nas técnicas de ELISA e WI.

## **2.0 OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo comparar os métodos sorológicos de RIFI e ELISA no diagnóstico de erliquiose canina em cães atendidos no Hospital Veterinário Anhembi Morumbi (HOVET-AM) no período de setembro de 2002 a maio de 2008.

## **3.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAIS**

#### **3.1.1 ANIMAIS**

Após análise de dados obtidos por meio de levantamento em arquivos do HOVET – AM, foram selecionados cães soronegativos testados pelo método de ELISA-IDEXX® no período de setembro de 2002 a maio de 2008.

Consideraram-se como suspeitos, os cães nos quais foram constatados três sinais clínicos sugestivos de erliquiose relacionados por KAKOMA *et al*, (2000): apatia, anorexia, emaciação, letargia, sinais de depressão, febre, palidez de mucosas, ixodidiose recorrente ou sinais de distúrbio de coagulação como epistaxe, petéquias, sufusões, melena, hematúria ou hifema; e achados laboratoriais sugestivos, como trombocitopenia, leucopenia (neutropenia, linfocitose, monocitose), hiperglobulinemia ou anemia (com hematócrito inferior a 35).

Posteriormente os animais suspeitos foram submetidos à RIFI para a pesquisa de anticorpos.

#### **3.1.2 AMOSTRAS**

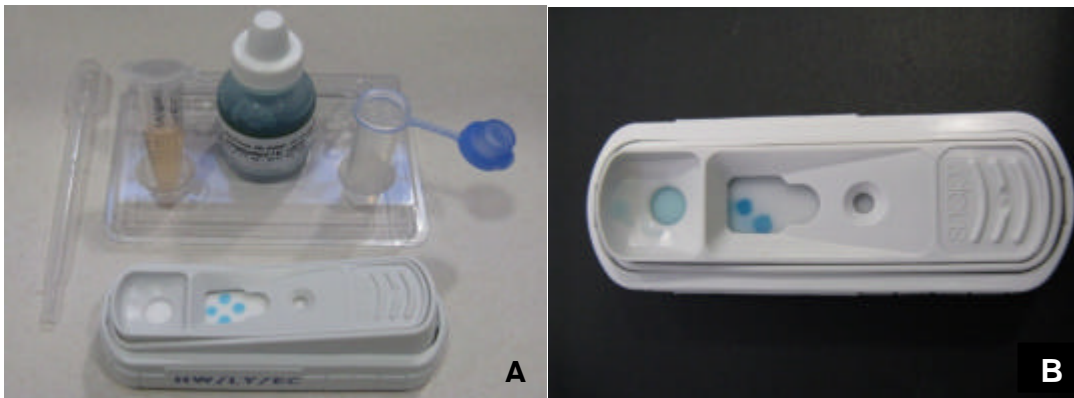
Foram coletados 10ml de sangue total e separados em 5ml no tubo com EDTA, para realização de exame hematológico e esfregaço sangüíneo para pesquisa direta do agente, e 5ml no tubo seco, para a obtenção do soro para realização de exame bioquímico e sorológico.

### **3.2 MÉTODOS**

#### **3.2.1 UTILIZAÇÃO DO KIT PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Ehrlichia* sp PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) – MÉTODO DO SNAP**

As amostras devem estar à temperatura ambiente antes do início do teste. Posteriormente, com a utilização da pipeta inclusa no Kit (Figura 1 – A), são transferidas três gotas de amostra para um tubo polipropileno de 1,5 mL. Em seguida são colocadas quatro gotas do conjugado e mistura-se por inversão de três a cinco vezes. O dispositivo é colocado sobre uma superfície

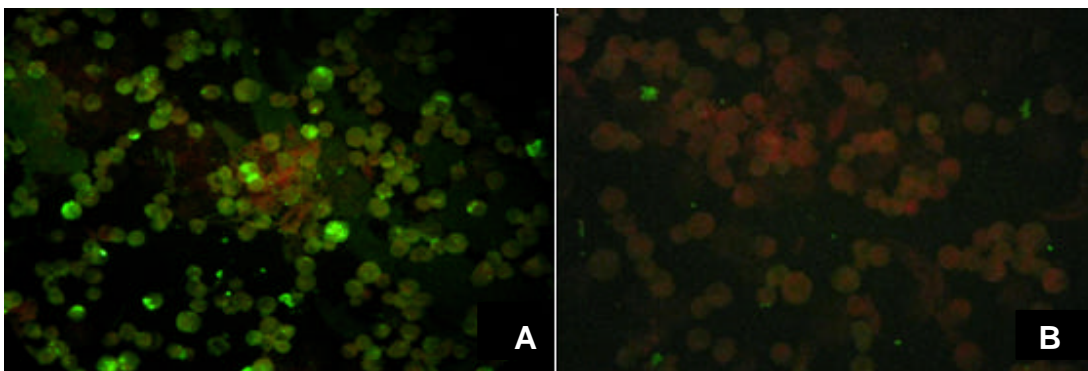
horizontal e acrescentado todo o conteúdo do tubo de amostra ao orifício indicado. A amostra fluirá pela janela de resultados, alcançará o círculo de ativação em aproximadamente trinta a sessenta segundos. Ao aparecer cor no círculo de ativação, o ativador é empurrado firmemente até que esteja nivelado com o corpo do dispositivo. Após oito minutos o resultado é avaliado: caso observe coloração nítida à esquerda do controle positivo (Figura 1 – B), indica presença de anticorpos anti *E. canis* no soro testado.



**Figura 1** — A: Kit para detecção de anticorpos contra *Ehrlichia sp* pelo método de ELISA; B: Snap+ *E. canis*. Fonte: Laboratório de Patologia Clínica HOVET-AM, 2008.

### 3.2.2 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA ERLIQUIOSE

Serão utilizadas lâminas de vidro contendo 12 poços previamente marcados. As bactérias serão decalcadas e secas ao ar. Em seguida estas lâminas serão fixadas em álcool/acetona e armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização. Para a realização da reação os soros serão descongelados diluídos 1:50 em PBS e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após a incubação as lâminas serão lavadas em PBS e incubadas com a solução de anticorpos anti-IgG de cão fluoresceinado por mais 30 minutos. Ao serem novamente lavadas estas serão secas, montadas em glicerina e observadas em microscópio de imunofluorescência (objetiva de 40x), no qual observará se ocorreu fluorescência (Figura 2). Utiliza-se também anti IgG de cão fluoresceinado diluído e azul de Evans na diluição de 1:200.

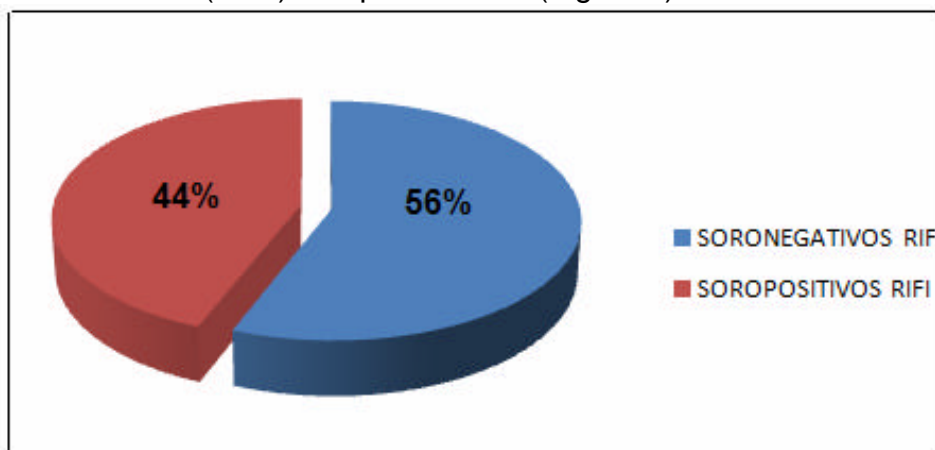


**Figura 2** — A: Soropositivo RIFI; B: Soronegativo RIFI. Fonte: Laboratório de Patologia Clínica HOVET – AM, 2008.

#### **4.0 RESULTADOS**

No período de setembro de 2002 a maio de 2008 foram selecionados 55 cães atendidos no HOVET-AM com manifestações clínicas, achados clinicopatológicos e soronegativos pela técnica de ELISA.

Dentre esses animais, 31 (56%) apresentaram soronegatividade pelo método de RIFI e 24 (44%) soropositividade (Figura 3).



*Figura 3* — Soropositivos e Soronegativos RIFI HOVET – AM.

#### **5.0 DISCUSSÃO**

Em relação à técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA), ANDEREG e PASSOS, (1999), analisaram ser uma técnica sensível, apresenta resultados rápidos, pode ser utilizada a campo e de fácil interpretação para a detecção de anticorpos no soro. Apesar de MORAIS *et al*, (2004), considerar ELISA como o melhor teste para detectar o “status” da infecção, fornecendo elevada sensibilidade e especificidade, constatou-se no presente trabalho tratar-se de uma técnica com índice de positividade menor quando comparado a RIFI. Porém, segundo BÉLANGER *et al*, (2002), comparando as técnicas de RIFI, ELISA, com utilização de proteína recombinante rMAP2 e dot-ELISA verificaram que o ELISA rMAP-2 foi o teste de maior acurácia, com maior chance de identificação do estado de infecção de um animal.

A pesquisa de anticorpos anti-*E.canis* pela técnica de imunofluorescência indireta é altamente sensível e específica, sendo considerada “Padrão Ouro” (BIRCHARD e SHERDING, 1998), porém está sujeita a limitações como a subjetividade do observador, laboratório equipado e mão de obra especializada (BÉLANGER *et al*, 2002).

#### **6.0 CONCLUSÃO**

A RIFI demonstrou ser mais eficiente que ELISA pelo método do SNAP no diagnóstico de erliquiose canina, porém para sua realização devem-se ter equipamentos adequados e mão de obra especializada.

A técnica de ELISA pelo SNAP apresentou menor eficácia na detecção de anticorpos anti-*E.canis*, entretanto maior facilidade de realização a campo e menor tempo para obtenção do resultado.

Vale ressaltar a importância em associar mais de um método laboratorial para o diagnóstico precoce da enfermidade.

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDEREG, P. I. ; PASSOS, L. M. F.** Erliquiose Canina. *Clínica Veterinária*, São Paulo, n. 18, 1999, 31-38p.
- BÉLANGER, M. et al.** Comparasion of Serological Detection Methods for Diagnosis of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 9, v.40, Set 2002, 3506-3508p.
- BIRCHARD, S. J. ; SHERDING, R. G.** Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais. 1. ed. São Paulo, Roca 1998. 139-142p.
- CHAICHANASIRIWITHAYA, W. et al.** Comparasion of PCR with other tests for early diagnosis of Canine Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 7, vol. 32, Julho 1994, 1658-1662p.
- COSTA, J.O.; SILVA, M.; BATISTA Jr., J.A.; GUIMARÃES MP.** *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Minas Gerais*, Belo Horizonte, v. 25, p. 199-200, 1973.
- ETTINGER, S. J. ; FELDMAN, E. C.** Tratado de Medicina Interna Veterinária (Moléstias do Cão e do Gato). 4. ed. São Paulo, Manole 1997. 543-552p.
- KAKOMA, I.; SAINZ, A.; TESOURO, M.; AMUSATEGUI, I.; KIM, C.; BIGGERSTAFF, J.; McPEAK, J.; LEVY, M.G.** Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis: towards a universal case definition. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, New York, v. 916, p. 396-403, 2000.
- KNOWLES, T.T.; ALLEMAN, A.R.; SORENSON, H.L.; MARCIANO, D.C.; BREITSCHWERDT, E.B.; HARRUS, S.; BARBET, A.F.; BÉLANGER, M.** Characterization of the major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and its application for serodiagnosis of ehrlichiosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, Washington, v. 10, p. 520-524, 2003.
- MORAIS, H. A. et al.** Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia spp.* *Clínica Veterinária*, São Paulo, n. 48, 2004, 28-30p.
- WEN, B. et al.** Comparasion of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs Treated with Doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 7, vol. 35, Julho 1997, 1852-1855p.

---

1: Graduando (a) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Anhembi Morumbi.

2: Professora Doutora de Clínica Médica de Pequenos Animais e Coordenadora do Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi.

3: Médico (a) Veterinário (a) Residente do Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi.

4: Médico Veterinário do Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi.

5: Biomédico do Setor de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi.

*Hospital Veterinário Universidade Anhembi Morumbi – Rua Conselheiro Lafaiette, 64 – São Paulo – SP – Telefone: 11 27904642 – CEP: 03164110 – Brasil – E-mail: vbfpaulo@gmail.com*