

## **USO DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE NO DIAGNÓSTICO DA HEPATOZOONOSE CANINA NA ZONA RURAL DE TERESINA-PIAUI.**

Aíla Alves Rocha Vieira (*bolsista do PIBIC/UFPI*), Juliana Fortes Vilarinho Braga (*colaboradora, Mestre em Ciência Animal/UFPI*), Alexandre Celso Dias (*colaborador, Graduando em Medicina Veterinária UFPI*), Dayseanny de Oliveira Bezerra (*colaboradora, Graduanda em Medicina Veterinária UFPI*), Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva (*Orientadora, UFPI/CCA/DCCV*)

### **1. INTRODUÇÃO**

A hepatozoonose canina é uma hemoparasitose de ocorrência mundial causada por protozoários do gênero *Hepatozoon* (ALMOSNY et al., 2002; BANETH et al., 2003; LI et al., 2008) que parasitam animais selvagens e mamíferos, principalmente cães (ALENCAR et al., 1997; METZGER et al., 2008; SASAKI et al., 2008; GIMENEZ et al., 2009, SALAKIJ et al., 2010). O cão se infecta ao ingerir o carrapato das espécies *Amblyoma spp.* ou *Rhipicephalus sanguineus* contaminado com o protozoário (ALENCAR et al., 1997; SASAKI et al., 2008).

O cão acometido pode apresentar febre, tosse, secreção óculo-nasal purulenta, linfadenopatia, apatia, prostração, tremores musculares e dificuldade de manter-se em estação (VINCENT-JOHNSON et al., 1997; CRAIG, 1998; MASSARD, 2001, O'DWYER et al. 2001, SAKUMA et al., 2009). Entretanto, esta enfermidade geralmente vem associada a outras doenças, o que dificulta a identificação da mesma devido à similaridade dos sintomas (AGUIAR et al., 2004). É considerada uma doença crônica e permanece despercebida até que o animal apresente imunossupressão (O'DWYER et al., 2001; GÖTSCH, 2009).

O diagnóstico da hepatozoonose canina pode ser realizado com exame direto pela observação do protozoário em células leucocitárias de esfregaços sanguíneos periféricos (O'DWYER et al., MASSARD, 2001; O'DWYER et al., 2004; RUBINI et al., 2005; SASAKI et al., 2008). Estudos recentes preconizam o uso do diagnóstico molecular pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR), como o método mais avançado e de precisão (PALUDO et al., 2005; SASAKI, et al., 2008).

No Brasil, a infecção por *Hepatozoon* tem sido encontrada em estudos epidemiológicos em áreas urbanas e rurais (O'DWYER et al., 2001; PALUDO et al., 2003; O'DWYER et al., 2004). O'Dwyer et al. (2001) observaram uma alta prevalência de hepatozoonose (39,2%) em animais de áreas rurais do estado do Rio de Janeiro e baixa prevalência (5,9%) em cães vadios da zona urbana do estado de São Paulo. Rubini et al. (2005), relatou 67,7% de cães positivos pelo método de PCR para *Hepatozoon sp.* no Brasil.

Considerando os poucos trabalhos realizados, a baixa ocorrência de casos de hepatozoonose canina no Brasil e a falta de estudos sobre hepatozoonose canina em nosso estado nos propomos a estudar a ocorrência de hepatozoonose canina na zona rural do município de Teresina, Piauí.

### **2. METODOLOGIA**

A amostra de cães utilizada para a realização deste projeto foi obtida com base no cálculo segundo o Centro Panamericano de Zoonoses (1973) considerando a prevalência esperada de 50% do total de cães existentes na zona rural do município de Teresina. O

número de amostras a ser coletado para a realização desse projeto é de 384 cães da zona rural (Norte, Sul, Sudeste e Leste).

Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular em tubos de 4ml e retirado sangue da ponta da orelha para esfregaço sanguíneo em lâminas para a procura do parasita. Em cada animal foi realizado exame clínico para se obter dados sobre a saúde do animal e possíveis sinais clínicos característicos da hepatozoonose canina.

A PCR foi realizada para amplificação de um fragmento de DNA da região do gene 18S rRNA, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) Hep F (5'-ATACATGAGCAAATCTCAAC-3') e Hep R (5'-CTTATTATTCCATGCTGCAG-3') (INOKUMA et al., 2002). A reação foi realizada em uma mistura de 25 µl, contendo: água livre de nuclease q.s.p., "master mix" (2X buffer – pH 8,5; 400 µM dATP; 400 µM dGTP; 400 µM dCTP; 400 µM dTTP e 3 mM MgCl<sub>2</sub> - GoTaq® Colorless Master Mix), 0,4 µM de cada *primer* e até 200 ng de amostra de DNA. O controle positivo usado foi um isolado de *Hepatozoon* sp. de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) diagnosticado por Metzger et al. (2008). Foram consideradas positivas as amostras que tinham bandas visíveis de aproximadamente 625pb.

O produto de seis amostras previamente amplificadas pelo PCR foi purificado utilizando-se ExoSAP® IT (GE Healthcare) com as recomendações do fabricante. Em seguida, esses produtos foram seqüenciados com BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e um seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram avaliadas com o software Pregap4® versão 1.6 (Staden Package) e comparadas com as sequencias de dados disponíveis no GenBank usando o algoritmo BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas um total de 384 amostras de DNA de cão, dessas, 51 amostras amplificaram para *Hepatozoon* sp, com o fragmento de amplificação de aproximadamente 625pb (Figura 3) o que demonstra uma prevalência em 14,4% de animais. Estudo realizados em Brasília e Espírito Santo, utilizando esta mesma técnica observaram percentuais superiores de 67% e 60% respectivamente (CHIARELI 2009; SPOLIDORIO et. al. 2009), Na presente pesquisa, zona sul de Teresina apresentou 16,66 % (12/72) de positivos, a zona sudeste apresentou 16,16% (16/99) animais positivos, a zona leste apresentou 11,11% (16/144) positivos e a zona norte apresentou 10,14% (7/69) de animais positivos. Vale ressaltar que as zonas sul e sudeste merecem estudos mais detalhados para se conhecer melhor a incidência da hepatozoonose nessas regiões.

Dos 51 animais positivos para *Hepatozoon* na PCR, em um animal foi possível a visualização do parasita em microscopia de luz em esfregaço sanguíneo de ponta de orelha (Figura 1,B). Este resultado condiz com os observados por Otranto et. al. (2011) onde se sugerindo que o baixo número de animais positivos pelo esfregaço de sangue periférico é devido a fase inicial de infecção ou baixa parasitemia com maiores chances falsos negativos.

Por outro lado o grande número de positivos á PCR se deve a maior sensibilidade desse método de diagnóstico (SASAKI et.al., 2008).

Co-infecção de *Hepatozoon sp.* com *Babesia canis* foi observada em 12 animais, com *Leishmania sp.* em dois animais, com *Anaplasma platys* em um animal e com *Ehrlichia canis* em um animal. Ressalta-se a associação de *Hepatozoon sp.* com *Babesia sp.* no presente trabalho, fato pouco descrito na literatura. O sequenciamento resultou em um fragmento de 668 pb com 99% de similaridade com a sequência do gene ribossomal 18S rRNA de *Hepatozoon canis* isolados na Espanha (número de acesso no GenBank AY150067), em Botucatu-SP, Brasil (número de acesso no GenBank FJ743476) e em Uberlândia-MG, Brasil (número de acesso no GenBank HQ605710).

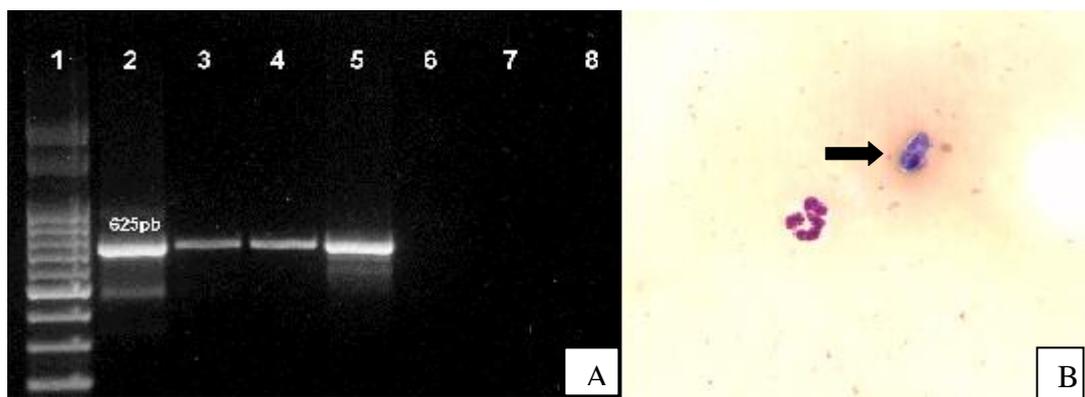


Figura 1. A; Visualização dos produtos de PCR do fragmento do gene 18S rRNA de *Hepatozoon sp.*, após eletroforese em gel de agarose. Coluna 1, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder); coluna 2, controle positivo; colunas 3, 4 e 5 amostras positivas para *Hepatozoon sp.*; coluna 8, controle negativo. B: *Hepatozoon canis* (seta) em esfregaço sanguíneo de ponta de orelha.

Dos 51 animais positivos para *Hepatozoon sp.* pela técnica de PCR foram 33,3% (17/51) dos animais com anemia, 31,3% (16/51) com eosinofilia, e 27,4% (14/51) com trombocitopenia. A incidência significativa de animais com anemia e trombocitopenia está de acordo com relato de Baneth et. al. (1997) e Sakuma et. al. (2009).

No nordeste, são poucos os estudos realizados com pesquisa de *Hepatozoon sp.*, destacando-se o trabalho realizado em cães em Pernambuco (RAMOS et al 2010) e em gatos selvagens do Maranhão e do Ceará (METZGER et. al. 2008). O presente estudo é o primeiro relato de *Hepatozoon sp.* em cães da zona rural de Teresina, município do Piauí sendo também o primeiro diagnóstico de *Hepatozoon* no Piauí.

#### 4. CONCLUSÃO

Estes trabalho relata pela primeira vez a ocorrência de *Hepatozoon sp.* em cães da zona rural de Teresina, Piauí.

#### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANETH, G. J. S.; MATTHEW, V.; SHKAP, D. K. et al. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon spp.* **Trends. Parasitol**, v.19, p.27-31. 2003.
- INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.** v.106, p. 265–271. 2002.

Área:

CV (X)

CHSA ( )

ECET ( )