

DETECÇÃO DE *Rickettsia rickettsii* EM CARRAPATOS DE CÃES DA ZONA RURAL DE TERESINA/PI.

Alexandra de Siqueira Cajado Liarte (Orientada, ICV), Francisco de Assis L. Souza (Colaborador, Patologia animal/CCA/UFPI), Daniel Barbosa Liarte (Colaborador, Biologia/CSHNB/UFPI), Silvana M. M. de Sousa Silva (Orientador, Patologia animal/CCA/UFPI)

Introdução

As zoonoses transmitidas por carrapatos representam uma séria ameaça para a saúde e o bem-estar da população humana. Dentre elas destaca-se o gênero *Rickettsia*, por possuir a espécie *Rickettsia rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa Brasileira (FMB). Onde o cão é um reservatório doméstico potencial e pode atuar como sentinela.

A FMB é de difícil diagnóstico clínico e laboratorial e que pode ser fatal se não for tratada a tempo. Infelizmente no Estado do Piauí os dados acerca do agente dessa enfermidade e seus diferentes hospedeiros são totalmente desconhecidos. Assim, neste projeto, nos propomos a estudar a presença de *R. rickettsii* em carrapatos de cães coletados em áreas da zona rural de Teresina/PI.

Metodologia

Segundo dados do IBGE/Censo 2010, a partir do total da população humana rural foi estimado o tamanho da população canina, sendo inviável a coleta de todos os setores da Zona Rural, foram então selecionados os 3 setores mais populosos (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos três setores mais populosos da Zona Rural do município de Teresina, segundo dados do IBGE/Censo 2010. A Tabela inclui a população canina (estimada) e o número de cães com amostras de carrapatos colhidos segundo o setor.

Código do setor	População canina (estimada)	Nº de cães com amostras colhidas	Localidade
221100105000037	261	56	Santa Teresa; Caminho Novo; Cancela; Mata Velha; Papagaio; São João e Ladeira da Terra
221100105000015	239	57	Santa Luz (De baixo, De cima e Centro); Boqueirão; Palmeira e Nova Laguna
221100105000057	209	44	Cerâmica Cil
TOTAL	3.553	157	

Realizou-se coletas de carrapatos em até 3 cães de cada residência, os quais foram acondicionados em álcool absoluto e realizado a identificação e classificação taxonômica. Para a extração de DNA utilizou-se carrapatos individuais ou “pool” de uma mesma espécie, coletados em um mesmo cão, os quais foram submetidos à técnica de guanidina-isotiocianato, conforme descrito na literatura. As amostras de DNA submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando pares de iniciadores que amplificam fragmentos dos genes: *gltA* (CS-78; CS-323); *ompB* (120-M59; 120-807), e *ompA* (Rr190.70p; Rr190.602n).

Para a escolha do melhor gene a ser clonado foi realizada uma análise *in silico* dos polimorfismos presentes na região do genoma amplificado dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* de *Rickettsia*, utilizados diferentes ferramentas de bioinformática. O fragmento amplificado do gene *ompA* foi inserido no VETOR pGEM®-T (Promega) e transformado por choque térmico em *Escherichia coli* quimiocompetentes da linhagem TOP 10F'.

As colônias positivas foram expandidas em meio LB líquido e os plasmídeos recombinantes foram extraídos utilizando o QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen®), de acordo com o protocolo do fabricante. Os clones do gene *ompA* obtidos a partir da clonagem das amostras serão enviados ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ-MG para sequenciamento.

Resultados e Discussão

Foram coletados carrapatos de 157 cães nos três setores mais populosos. As amostras de DNA foram analisadas por meio da PCR, utilizando os três diferentes pares de iniciadores, foram encontradas 31 amostras positivas nas três regiões estudadas, sendo 09 no setor 221100105000037, 09 no setor 221100105000015 e 13 no setor 221100105000057.

Das 157 amostras de DNA analisadas, 31 foram positivas para DNA de *Rickettsia* utilizando o par de iniciadores que amplificam um fragmento do gene *gltA* (401 pb), presente possivelmente em todas as espécies do gênero *Rickettsia* (LABRUNA et al. 2004), dez amplificaram o fragmento esperado do gene *ompA* (532 pb), que está presente em rickettsias do grupo da febre maculosa (LABRUNA et al., 2007) e seis amostras amplificaram um fragmento esperado do gene *ompB* (862 pb) (Figura 1). Os três genes em estudo são amplamente utilizados para identificação e sequenciamento de *Rickettsia* sp. (PACHECO et al., 2011; GUEDES, 2009; GUEDES et al., 2005).

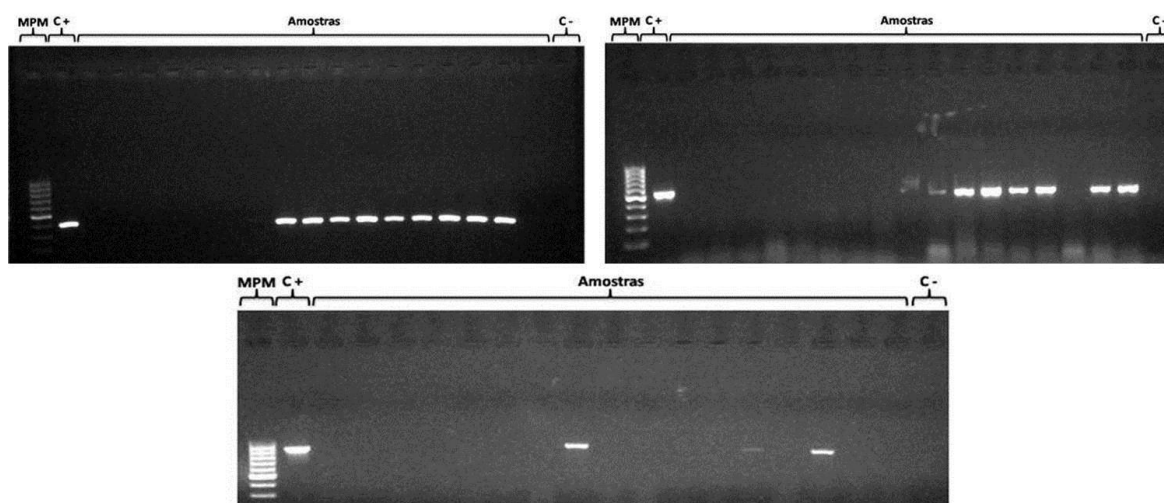


Figura. 1- Géis representativos dos produtos de PCR de diferentes genes de *Rickettsia*. Na figura são apresentados os géis contendo os produtos amplificados dos genes *gltA* (acima a esquerda), *ompA* (acima a direita) e *ompB* (abaixo). MPM → marcador de peso molecular; C+ → controle positivo (DNA purificado de *Rickettsia*); C- → Controle negativo (sem DNA).

Comparando-se os resultados dos diferentes iniciadores, observou-se que quatro amostras de DNA foram positivas para *Rickettsia* utilizando os três conjuntos de iniciadores, 19 foram positivas utilizando apenas o fragmento de gene *gltA*, seis amostras foram positivos apenas para os fragmentos dos genes *gltA* e *ompA* e duas amostras foram positivas apenas para os fragmentos *gltA* e *ompB* (Figura 2).

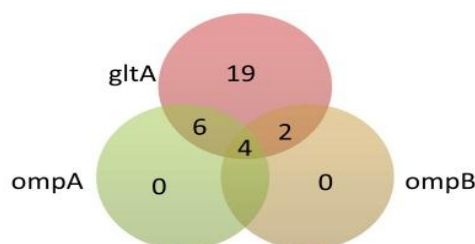


Figura 2. Diagrama de Venn apresentando as amostras positivas identificadas por PCR utilizando diferentes genes alvo.

Dos três genes, o *ompA* foi o que apresentou o menor número de espécies com fragmentos preditos, menor percentual de identidade média entre os genomas com fragmentos preditos dos três genes e maior número de polimorfismos específicos para *R. rickettsii*. Por isso, foi selecionado como para experimentos de clonagem e posterior sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas. Duas amostras positivas para os três genes foram selecionadas para a clonagem.

Quatro colônias brancas foram submetidas a PCR para confirmação da presença do inserto no plasmídeo. Todas as quatro colônias selecionadas foram positivas e três delas foram expandidas em meio LB líquido para a extração de plasmídeos. A presença dos plasmídeos recombinantes foi confirmada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, conforme pode ser visto na figura 3.

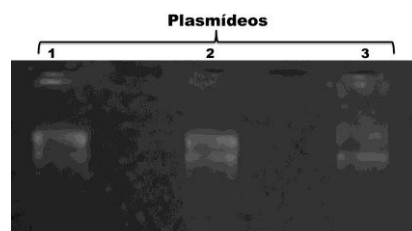


Figura 3. Plasmídeo recombinante pGEM-T com gene *ompA* de *Rickettsia*, visualizado em gel de agarose 1%.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, foi confirmada a presença de DNA de *Rickettsia* em carrapatos coletados de cães da Zona Rural do município de Teresina, entretanto as amostras positivas serão submetidas ao sequenciamento para análise.

Referências

- LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **J Med Entomol.** v. 41, p.1073-1081, 2004.
- LABRUNA, M. B.; PACHECO, R.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology.** n.3, v.73, p.869-873, 2007.
- PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L.J.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B. *Rickettsial* infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Med. Vet. Entomol.** v. 25, p.148–155, 2011.
- GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C. A.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, p.841-845, 2005.
- GUEDES, E. **Estudo de populações de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) e pesquisa de *Rickettsia* spp. nestas espécies em Coronel Pacheco, Minas Gerais.** 2009. 69f. Tese (Doutorado) – Escola de veterinária/UFMG, Minas Gerais, 2009.

Palavras-chave: Febre Maculosa, vetores, biologia molecular.