

FREQUÊNCIA DE *EHRlichIA CHAFFEENSIS* EM CÃES DA ZONA RURAL DE TERESINA-PIAUI.

Ariane Farias Leal (Bolsista PIBIC/CNPq), Iuliana Marjory Martins Ribeiro (Colaborador, UFPI), Francisco de Assis Leite Souza (Doutorando em Ciência Animal-CCA/UFPI), Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva (Orientador, Departamento Clínica e Cirúrgica Veterinária-CCA/UFPI).

Introdução

A erliquiose é uma importante doença infecciosa cuja prevalência tem aumentado significativamente em várias regiões do Brasil. É uma doença causada por bactérias, gram negativas estritamente intracelulares. Pertencem ao Gênero *Ehrlichia*, família das Rickettsiaceae, e infectam leucócitos (monócitos e polimorfonucleares) ou trombócitos (DAVOUST, 1993, DUMLER et al., 2001). No Piauí a *E. canis* é endêmica em cães (29%), entretanto, outras espécies ainda não foram descritas. Baseado na importância que a infecção por *Ehrlichia sp.*, representa para clínica de pequenos animais e na inexistência de trabalho nesta área, a presente pesquisa tem como objetivo determinar a ocorrência de *E. chaffeensis* em cães do município de Teresina, Piauí.

Metodologia

Devido a impossibilidade na obtenção no controle positivo de DNA de *E. chaffeensis* houve necessidade de alterar a metodologia, que se tornou muito mais extensa, necessitando de um período maior para o seu desenvolvimento.

Foram utilizadas amostras de sangue de 384 cães da zona rural do município de Teresina-PI no período de Agosto de 2011 à Julho de 2012. A colheita foi realizada por punção da veia jugular em tubos tipo *vacutainer* de 4ml, para extração de DNA e reação de PCR e nPCR. Esfregaços de sangue periférico foram realizados e corados com Giemsa para a pesquisa de mórulas de *Ehrlichia sp* em leucócitos. .

a) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR (nPCR) para amplificação de *E. canis* com o gênero 16S rRNA

A reação de “nested” PCR para *E. canis* foi realizada para todas as amostras (n=384) e foram utilizados pares de oligonucleotídeos de acordo com (WEN et al. 1997). O produto final foi de 390pb.

b) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gênero *Ehrlichia* DSB

As amostras negativas para *E. canis* foram processadas por PCR convencional com *primers* dsb-330 (5`GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3`) e dsb-728 (5`CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3`) desenhado a partir do gene da proteína de ligação dissulfido da *Ehrlichia spp.* Que amplificará um fragmento de 409 pb (DOYLE et al. 2005, LABRUNA et al. 2007). (Figura 5).

Resultados e discussão

Foram analisadas um total de 384 amostras de DNA de cão, dessas, 87 amostras amplificaram para *E. canis.*, com um fragmento de amplificação de aproximadamente 390pb (Figura 4) o que demonstra uma prevalência em 22,65% de animais.

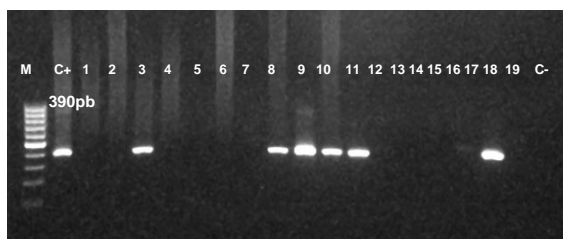


Figura 4: produtos de nPCR utilizando *primers* específicos para a região 16S rRNA de *E. canis*. Coluna 1, marcador de peso molecular (100pb); coluna 2, controle positivo; Tamanho do produto 390 pb. Colunas: 03-08-09-10-11 e 18 animais positivos para *E.canis*. coluna 20 controle negativo.

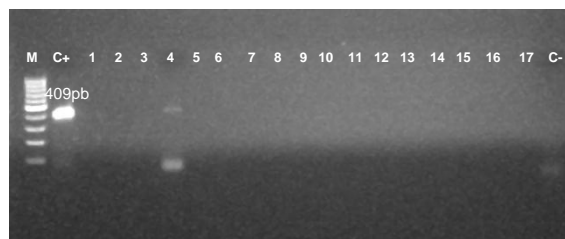


Figura 5: produtos de PCR utilizando *primers* dsb-330 de *Ehrlichia spp.* Coluna 1, marcador de peso molecular (100pb); coluna 2, controle positivo; Produto amplificação 409pb. Colunas 4, animais positivos para o gênero dsb coluna 20 controle negativo.

A zona, sul apresentou 6,51 % (25/72) de positivos, a zona sudeste apresentou 2,60% (10/99) animais positivos, a zona leste apresentou 8,33% (32/144) positivos e a zona norte apresentou 5,20% (20/69) de animais positivos. Vale ressaltar que a zona sudeste merece estudos mais detalhados para se conhecer melhor a incidência da *E. canis* nessa região. A erliquiose é uma enfermidade que vêm sendo alvo de diversos estudos em regiões de clima favorável ao desenvolvimento de carrapatos, onde é comum a ocorrência de cães infestados por esses artrópodes e com sintomatologia sugestiva de infecção por esses microrganismos. Entretanto, em muitos locais a escassez de diagnóstico ainda se torna um problema para confirmação dessas infecções, este é o caso de Teresina, localizada no norte do Piauí, nordeste do Brasil. Uma cidade com clima tropical, com temperaturas variando de 19-36°C e a umidade relativa do ar de 40-80% (MEDEIROS, 2004), sendo, portanto, uma região propícia à reprodução de carrapatos.

Dos 87 animais positivos para *E.canis* na nPCR, em nenhum animal observou-se a presença do parasita em esfregaço sanguíneo de ponta de orelha. Este resultado condiz com os resultados observados por Otranto et. al. (2011) que avaliando testes citológicos e PCR. Associaram que o baixo número de animais positivos ao esfregaço podem estar relacionado à distancia entre o período de início da infecção com o período de coleta do material para teste, pois nesse caso é menor a parasitemia e com isso maior as chances de se ter falsos negativos.

No Brasil são poucos os estudos realizados com pesquisa de *E. chaffeensis*, destacando-se o trabalho realizado em veado campestre (*Blastocerus dichotomus*) no Estado de São Paulo (MACHADO et al.,2006). O presente estudo foi realizado na tentativa de descrever pela primeira vez no nordeste a *E. chaffeensis* em cães da zona rural de Teresina, visto de acordo com Silva (2010), no Piauí a presença de *E. canis* é endêmica. Entretanto, o autor acrescenta que foi observado em 5 cães a presença de mórula em monócito no esfregaço sanguíneo, os quais foram negativos para PCR de *E. canis*, sugerindo a existência de outra ou outras espécies de *Ehrlichia* no nosso estado. Na pesquisa aqui realizada 18 cães da zona rural foram positivos para o gênero DSB e negativos para *E. canis*, isto indica mais uma vez a possível ocorrência de uma outra espécie de *Ehrlichia* no Estado do Piauí, entretanto, a complementação do estudo com clonagem, sequenciamento e análise com enzimas de restrição nos ajudará a identificar a espécie.

Conclusão

Até o presente momento detectamos outra espécie de *Ehrlichia* diferente da *E. canis*, mas há necessidade que a pesquisa continue e etapas como clonagem, sequenciamento e análises com enzimas de restrição possivelmente nos darão resultados quanto à ocorrência ou não de *E. chaffeensis* em cães no Estado do Piauí..

Apoio: PIBIC/CNPq.

Referências

- DAVOUST, B. Canine Ehrlichiosis. **Point Vét.**, v.151, p.43-51, 1993
- DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.
- WEN, B. et al. 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, 1997.
- DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.; CORSTVET, R.E.; HEGAR M Chain Reaction of the dsb gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005
- LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 189-195, 2007.
- MEDEIROS, R.M. Estudo Agrometeorológico para o Estado do Piauí. **Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado do Piauí**, Teresina. p.113. 2004.
- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; WEIGL, S.; LATROFA, M.S.; STANNECK, D.; DECAPRARIIS, D.; CAPELLIA, G.; BENETH, G. Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR. **Parasites & Vectors**, 4:55. 2011.
- MACHADO, R. Z. et al. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) **Veterinary Parasitology**, v.139, n. 1-3, p. 262-266, 2006.
- SILVA, L.S. **Erliquiose e anaplasmose canina em Teresina, Piauí, Brasil**. 2010.92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010

"Palavras-chaves": *Ehrlichia chaffeensis*. nPCR. Erliquiose.