

AVALIAÇÃO DE INICIADORES E PROTOCOLO PARA O DIAGNÓSTICO DA PANCITOPENIA TROPICAL CANINA POR PCR¹

LUCIANO MARRA ALVES², GUIDO F. C. LINHARES³, NILO SÉRGIO T. CHAVES³, LETÍCIA C. MONTEIRO⁴ E DANIEL C. L. LINHARES⁵

1. Projeto apoiado pelo CNPq.

2. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Sanidade Animal/ EV – UFG, 74001-970. C. P. 131 - Goiânia, GO.

3. Professores do Departamento de Medicina Veterinária / EV - UFG. 74001-970. Cx Postal 131. Goiânia, GO. e-mail: guidofcl@vet.ufg.br

4. Bolsista de Apoio Técnico/CNPq.

5. Bolsista de Iniciação Científica/CNPq.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de padronizar um protocolo para a reação em cadeia da polimerase (PCR) e selecionar oligonucleotídeos iniciadores para a detecção específica de *Ehrlichia canis*, em uma única etapa de reação. Inicialmente foram obtidas seqüências depositadas no Genbank, referentes ao gene que codifica o 16S rRNA das espécies *E. canis* (número de acesso = AF162860), *E. ewingii* (U96436), *E. platys* (AF1567844), *E. chaffeensis*, (U86665), *E. phagocytophila* genogrupo (U02521), *E. bovis* (AF294789) e *E. risticii* (M21290), as quais foram submetidas ao alinhamento genético para a construção dos iniciadores. Do alinhamento foi selecionado, a partir de uma região semiconservada, um iniciador específico para *E. canis*, designado EBR1 (5'-cctctggctataggaattg-3') e, de uma região conservada, um iniciador genérico EBR5 (5'-ggagtgcctaacgcgttag-3'). Pa-

ralelamente foram obtidas amostras de sangue de dez cães que apresentavam infecção aguda por *E. canis*, confirmado pela presença de mórulas intracitoplasmáticas, características da riquetsia, em células mononucleares sangüíneas. O DNA genômico extraído dessas amostras foi utilizado para a avaliação da reação de PCR, empregando-se um protocolo adaptado de outros autores e o par de oligos EBR1/EBR5, selecionado neste trabalho. A reação de PCR apresentou resultados positivos para os 10 isolados de *E. canis*, amplificando o fragmento esperado de 765 pares de bases do gene 16S rRNA. Resultados negativos verificados nas reações de PCR para amostras de DNA genômico de *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Haemobartonella* sp., *Trypanosoma evansi* e do hospedeiro (*Canis familiaris*) livre de infecção indicaram a segurança do método quanto à especificidade para a discriminação de *E. canis*.

PALAVRAS-CHAVE: Cães, *Ehrlichia canis*, erliquiose canina, hemoparasitose, reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF PRIMERS AND PROTOCOL FOR THE DIAGNOSIS OF THE TROPICAL CANINE PANCYTOPENIA BY PCR

The study was conducted in an attempt to evaluate a protocol and to select primers for the specific diagnosis of *Ehrlichia canis* by a single-step PCR assay. Sequences of the 16S rRNA gene of the species *E. canis* (access number = AF162860), *E. ewingii* (U96436), *E. platys* (AF1567844), *E. chaffeensis*, (U86665), *E. phagocytophila* genogroup

(U02521), *E. bovis* (AF294789) and *E. risticii* (M21290) were obtained from the Genbank database and then aligned for primer selection. From a semi-conserved region of the alignment it was selected the *E. canis* specific forward primer which was designated EBR1 (5'-cctctggctataggaattg-3') and, from a conserved region, it was selected a reverse

generic primer named EBR5 (5'-ggagtgcctaacgcgtag-3'). Blood samples were collected from ten dogs that were undergoing acute phase of *E. canis* infection, confirmed by the demonstration of the rickettsia characteristic intracytoplasmic morulae within the agranulocytic blood cells. The genomic DNA was extracted from each of the blood samples in order to be used for the assessment of the PCR assay in order to evaluate the protocol and the primer

pair (EBR1/EBR5) selected in this study. The PCR reaction was positive for all ten isolates of *E. canis*, yielding the expected fragments of 765 bp size of the 16S rRNA gene. The lack of positive results with genomic DNA of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Haemobartonella* sp., *Trypanosoma evansi* and of uninfected host (*Canis familiaris*) assured confidence on the specificity of the method for *E. canis* discrimination.

KEY WORDS: Canine ehrlichiosis, dog, *Ehrlichia canis*, polymerase chain reaction, hemoparasitosis.

INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é uma riquetsia, naturalmente transmitida entre canídeos pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, responsável por uma enfermidade grave em cães, a qual se manifesta, comumente, por anemia, leucopenia, trombocitopenia, febre e emaciação (BICHARD & SHERDING, 1998). Sua ocorrência no Brasil foi registrada pela primeira vez por COSTA et al. (1973) e, atualmente, é observada com frequência no atendimento clínico de cães em todo o país (SEIBERT, 1996; ANDEREG & PASSOS, 1999; O'DWYER et al., 2001).

O método de diagnóstico laboratorial de rotina é feito normalmente pela demonstração microscópica direta de inclusões intracitoplasmáticas, mais conhecidas como mórulas, em células mononucleares sangüíneas, a partir de preparações coradas de esfregaço sangüíneo ou do creme leucocitário (WOODY & HOSKINS, 1991). Apesar da rapidez de execução e baixo custo, trata-se de técnica nem sempre eficaz para a detecção de mórulas, pela constante flutuação da parasitemia durante o curso da enfermidade (ELIAS, 1992).

Técnicas moleculares de diagnóstico, reconhecidamente mais sensíveis, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido recentemente empregadas para o diagnóstico de *E. canis* (McBRIDE et al., 1996; BREITSCHWERDT et al., 1998; GOLDMAN et al., 1998; HARRUS et al., 1998; MURPHY et al., 1998; HUA et al., 1999). Apesar do emprego de oligonucleotídeos iniciadores específicos, esses autores desenvolveram protocolos para realização da técnica de PCR em duas etapas de reação, uma variação da técnica designada *nested-*

PCR, ou ainda, com a aplicação complementar de sondas moleculares ou caracterização de polimorfismo de fragmentos amplificados (RFLP).

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de selecionar iniciadores e validar um protocolo para a reação de PCR, visando ao diagnóstico específico de *E. canis*, em etapa única de reação.

MATERIALE MÉTODOS

A seleção dos oligonucleotídeos iniciadores, para a amplificação espécie-específica de *E. canis*, foi realizada tendo como base os registros sobre seqüências de nucleotídeos do GENBANK (2001). Dessa forma, foram recuperadas informações sobre seqüências do gene 16S rRNA das seguintes espécies, com respectivos números de acesso: *E. canis* (AF162860), *E. ewingii* (U96436), *E. platys* (AF1567844), *E. chaffeensis* (U86665), *E. phagocytophila* (U02521), *E. bovis* (AF294789) e *E. risticii* (M21290).

As seqüências obtidas foram então alinhadas pelo método de Clustal, por meio de *software* (DNASar, Inc.), e os iniciadores selecionados conforme critérios previamente estabelecidos (FLORIDA STATE UNIVERSITY, 2000), visando-se à obtenção de uma combinação de oligonucleotídeos para a amplificação de um fragmento específico do gene 16S rRNA de *E. canis*. Para a confirmação da identidade, as seqüências foram submetidas a avaliações, *on-line*, junto ao banco de dados do GENBANK (2001), através da operação denominada BLAST (*basic local alignment search tool*). Aquelas que geraram resultados satisfatórios foram utilizadas para a síntese dos iniciadores, realizada por empresa especializada (Invitrogen).

Paralelamente, foram obtidas, junto ao serviço de rotina do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFG, amostras de sangue de dez cães com infecção patente por *E. canis*, confirmada pela presença de mórulas intracitoplasmáticas características, em células mononucleares sangüíneas (Figura 1). Essas amostras, consideradas como isolados de *E. canis*, foram submetidas ao processo de extração de DNA genômico, utilizando-se *kit* comercial (GFX[™] Genomic Blood DNA Purification Kit – Pharmacia Biotech). O DNA genômico, extraído dessas amostras, foi utilizado para a avaliação da reação de PCR, empregando-se o protocolo e iniciadores desenvolvidos neste trabalho.

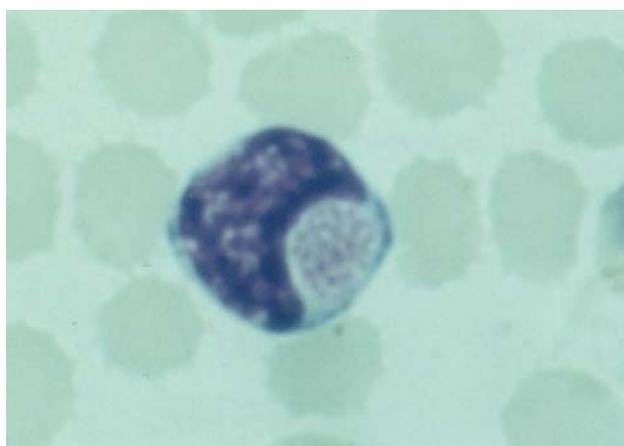


FIGURA 1. Inclusão intracitoplasmática (mórula) de *Ehrlichia canis* em célula mononuclear sangüínea, corada pelo Giemsa. Isolado número 7.

Como controles, foram utilizadas amostras de DNA genômico de outros hemoparasitos que são comumente encontrados em cães da Região Centro-Oeste (*Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Haemobartonella* sp., *Trypanosoma evansi*), obtidas junto ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias da Escola de Veterinária/UFG assim como DNA genômico do hospedeiro (*Canis familiaris*) livre de infecção por *E. canis*. Para controle negativo do *mix*, utilizou-se água Milli-Q. O controle positivo para *E. canis* foi obtido a partir do isolado ECGO1, cuja identidade havia sido previamente confirmada por caracterização molecular, após sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (TORRES, 2001).

O protocolo para o preparo da mistura de reagentes, utilizado para a execução da técnica de PCR, foi estabelecido por meio de adaptações dos procedimentos descritos por outros autores (BREITSCHWERDT et al., 1998; LAUERMAN, 1998), ficando definida a seguinte composição: 38,25ml de água ultrapura esterilizada; 5ml de tampão para PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 15mM MgCl₂ e 500mM KCl – Amersham Pharmacia Biotech); 1ml de dNTP 10mM (Amersham Pharmacia Biotech); 0,5ml (=10 pM) de cada oligo iniciador; 0,25ml (1,25U) de Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech); 5ml (> 0,35mg) da amostra do DNA genômico de *E. canis*.

Para o processo de amplificação por PCR, os ciclos e as temperaturas foram definidos de acordo com adaptações de outras publicações (HAYASHI, 1994; LAUERMAN, 1998), estabelecendo-se as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguido de 40 ciclos repetidos com as temperaturas de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, finalizando-se com um ciclo extra de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os produtos obtidos pela amplificação de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e, em seguida, corados com brometo de etídio (Life Technologies) por imersão em solução a 0,4mg/ml. As leituras foram realizadas por visualização sob luz ultravioleta, em transiluminador, como previamente descrito (SANBROOK et al., 1989). Para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado, para cada corrida de eletroforese, 1mg de marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do alinhamento do gene 16S rRNA das espécies *Ehrlichia ewingii*, *E. platys*, *E. chaffeensis*, *E. phagocytophila*, *E. bovis* e *E. risticii*, foi selecionado um par de iniciadores, designados EBR-1 e EBR-5.

O iniciador EBR-1, com 20 bases, foi selecionado de uma região semiconservada, localizada na posição 62 a 81 da sequência do gene do 16S rRNA de

E. canis. A temperatura de anelamento determinada foi de 53 °C, conforme a metodologia empregada (Tabela 1). Este iniciador foi caracterizado como espé-

cie-específico para o gene 16S rRNA de *E. canis*, através da operação de BLAST do Genbank.

TABELA 1. Sequência de oligonucleotídeos selecionados para a amplificação específica de um fragmento de 756 bp do gene 16S rRNA de *Ehrlichia canis*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Iniciadores	Sequências	Posição	TA
EBR-1	5'-CCTCTGGCTATAGGAAATTG- 3'	62-81*	53°C
EBR-5	5'-GGAGTGCTTAACGCGTTAG-3'	826-808**	53°C

* Posição no gene; ** posição no alinhamento; TA=temperatura de anelamento.

O iniciador EBR-5, com 19 bases, foi selecionado de uma região conservada para o gênero *Ehrlichia*, localizado na posição 826-808 do alinhamento das sequências supracitado (Tabela 1). A verificação de identidade junto ao Genbank (BLAST) permitiu a caracterização do iniciador como genérico (*Ehrlichia* spp.), exceto para a espécie *E. risticii*.

Os oligonucleotídeos EBR1 e EBR5, avaliados através da reação de PCR, demonstraram uma especificidade de 100% na amplificação do fragmento esperado de 765 pares de bases do gene 16S rRNA a partir de amostras de DNA genômico provenientes de dez isolados de *E. canis* (Tabela 1 e Figura 2).



FIGURA 2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) de 10 isolados de *E. canis*. Eletroforese em gel de agarose de 10µl de produto de PCR específico para o gene 16S rRNA de *Ehrlichia canis* (iniciadores = EBR1 e EBR5). 1: marcador de DNA de 100bp; 2 a 11: amplicons de 765bp obtidos a partir do DNA genômico dos isolados de número 1 a 10, respectivamente; 12: DNA genômico de cão – ausência de amplicon; 13: controle positivo para *E. canis*; 14: controle negativo da reação (sem DNA).

As reações de PCR, empregando-se o par de iniciadores EBR1/EBR5, não apresentaram nenhum resultado positivo para amostras de DNA genômico de *B. canis*, *H. canis*, *Haemobartonella* sp., *T. evansi* ou de *C. familiaris*, demonstrando portanto a especificidade do método para o diagnóstico de *E. canis*.

Os resultados alcançados neste estudo permitiram o estabelecimento e a padronização de um protocolo para a reação de PCR, específico para o diagnóstico de *E. canis*, empregando-se dois novos iniciadores, sendo um genérico e outro específico, selecionados a partir da sequência do gene que codifica o 16S rRNA.

Trabalhos anteriores desenvolvidos por outros autores (McBRIDE et al., 1996; BREITSCHWERDT et al., 1998; GOLDMAN et al., 1998; HARRUS et al., 1998; MURPHY et al., 1998; HUA et al., 1999) já haviam demonstrado a eficácia das técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico específico de *E. canis*, a partir de amostras de sangue infectado ou de cultivos celulares. Os resultados verificados no presente trabalho confirmam a eficácia da técnica quanto à sua especificidade de detecção de *E. canis*, como apontado por aqueles pesquisadores, no entanto não houve possibilidade de comparações quanto à sensibilidade, uma vez que naqueles estudos foram empregadas variações do método primário de PCR, como o *nested*-PCR ou PCR em combinação com sondas moleculares ou RFLP (caracterização de polimorfismo de fragmentos amplificados).

O protocolo para ensaio de PCR proposto neste estudo apresenta como maior vantagem a sim-

plicidade operacional, por meio do qual a técnica pode ser executada de forma mais rápida e econômica, quando comparada aos métodos descritos anteriormente, possibilitando a diminuição do número de manipulações e reduzindo-se assim a margem de erro. Entretanto, os autores sugerem que experimentos complementares devam ser realizados, aplicando-se o *nested-PCR* e/ou sondas moleculares, sob as mesmas condições de laboratório (equipamentos e reagentes), com o objetivo de avaliar os níveis de sensibilidade que possam ser obtidos com a aplicação das variações do método primário de PCR.

CONCLUSÕES

Os oligos EBR1 e EBR5, selecionados neste estudo, mostraram-se eficazes como iniciadores para a amplificação específica de um fragmento de 765 pares de bases do gene 16S rRNA de *E. canis*, pela reação de PCR.

O protocolo para reação de PCR, em uma única etapa de reação, avaliado neste trabalho, mostrou-se eficaz e específico para o diagnóstico de *E. canis*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Funape, UFG.

REFERÊNCIAS

ANDEREG, I. P.; PASSOS, F. M. L. Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v. 4, n. 18, p. 31-38, 1999.

BICHARD, J. S.; SHERDING, G. R. **Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. p. 139-143.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology** v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998.

COSTA, J.O.; BATISTA JUNIOR, J.A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia da UFMG**, n. 25, p. 199-200, 1973.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **Journal of Small Animal Practice**, n. 11, v. 33, p. 540-543, 1992.

FLORIDA STATE UNIVERSITY. **Primer design**. [on-line]. 2000. Disponível em: <<http://www.bio.fsu.edu/seq-fac/PrimerDesign.html>> Acesso em: 11 jul. 2000.

GENBANK [on-line]. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 22 jan. 2001.

GOLDMAN, E. E.; BREITSCHWERDT, E. B.; GRINDEM, C. B.; HEGARTY, B. C.; WALLS, J. J.; DUMLER, J. S. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 2, p. 61-70, 1998.

HARRUS, S.; WARNER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998.

HAYASHI, K. Manipulation of DNA by PCR. In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A. **The polymerase chain reaction**. Boston: Birkhäuser, 1994. p. 3-13.

HUA, P.; YANG, S.; SHIDE, T.; YUHAI, M.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Isolation and identification of the causative agent of canine ehrlichiosis found in China. **Chinese Journal of Veterinary Science**, v. 19, n. 5, p. 467-470, 1999.

LAUERMAN, L.H. (Ed). **Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Library of Congress Cataloging- in-Publication Data. 1998. 152 p.

McBRIDE, J. W.; CORSTEVET, R. E.; GAUNT, S. D.; JRASVEC, C.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection

in dogs. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, n. 8, v. 4, p. 441-447, 1996.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. 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, 1998.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; SOUZA, J.C.P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

SANBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SEIBERT, M. Review of canine ehrlichiosis and occurrence of *Ehrlichia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in dogs at the Veterinary Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 24, p. 113-114, 1996.

TORRES, F.A. Comunicação pessoal. Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, ago. 2001.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial disease of dogs. In: HOSKINS, J.D. **Veterinary clinics of North America**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991. p. 75-98.