

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* EM HCV-UFPEL

DANIEL FELIPE BUITRAGO LINARES¹; PAOLA RENATA JOANOL
DALLMANN²; KAUE RODRIGUEZ MARTINS³; ÉVERTOM FAGONDE DA
SILVA⁴; MARLETE BRUM CLEFF⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – daniel.buitrago.linares@unillanos.edu.co 1

² Universidade Federal de Pelotas – dallmannpaola@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – fagondee@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – marletecleff@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A ehrliquiose canina também é conhecida como enfermidade monocítica canina, pancitopenia tropical canina, entre outros nomes. É a enfermidade responsável por apresentar uma alta mortalidade em cachorros militares britânicos entre 1963 e 1968. Foi responsável pela morte de numerosos cachorros militares e particulares em Singapura e Malásia, sendo detectada em um labrador retriever em 1967 (HUXSOLL et al., 1970). Na atualidade, é uma doença de importância na clínica de pequenos animais e tem sido diagnosticada no Brasil em todos os estados, tendo uma maior prevalência nas regiões de clima quente ou temperado, sendo de menor prevalência na região sul (DUARTE, 2010).

Para diagnosticar a doença, é preciso fazer um exame clínico completo e determinar os sinais clínicos e alterações hematológicas e bioquímicas que podem estar presentes no curso da doença (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2004). Após a inoculação do patógeno pelo vetor, a incubação da infecção por *E. canis* é de 8 a 20 dias, tendo diferentes fases de apresentação, sendo estas: aguda, subclínica e crônica. Cada uma diferenciada e caracterizada por anormalidades clínicas e hematológicas (GREENE, 2015; HARRUS et al., 1998). Os sinais clínicos apresentados geralmente são febres, anorexia, depressão, perda de peso, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, distúrbios cardíacos e respiratórios e de caráter neurológico e oftalmológico. (CESAR, 2008; GREENE, 2015; DE CASTRO et al., 2004). As alterações hematológicas apresentadas em exames laboratoriais podem ser trombocitopenia, leucopenia e anemia normocítica normocrômica (CESAR, 2008; DE CASTRO et al., 2004; GREENE, 2015).

Existe uma variedade de provas que podem ajudar a confirmar o diagnóstico, as quais apresentam variações na sensibilidade e especificidade, como esfregaço sanguíneo, cultivos celulares, técnicas de detecção de anticorpos contra a doença e técnicas moleculares que podem identificar o DNA do patógeno a partir de amostras de sangue circulante ou do baço, tendo, a PCR, maior sensibilidade para o diagnóstico por permitir detectar o DNA do agente presente nas células sanguíneas. Técnicas sorológicas, como o ELISA, não permitem saber se a infecção é previa ou atual e o esfregaço sanguíneo tem 4% de êxito para a detecção da doença. Dessa maneira, a PCR apresenta-se como uma ferramenta útil para diminuir a apresentação de falsos positivos (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2004; HARRUS; WANER, 2011; SÁ et al., 2018; UENO et al., 2009).

2. METODOLOGIA

Amostras e local de processamento.

A amostragem foi calculada segundo as prevalências de 4.8% encontradas no Rio Grande do Sul (VIEIRA et al., 2011) sendo selecionado um N amostral de 69 amostras. Foram coletadas 69 amostras de sangue de cão em tubos com EDTA de pacientes sintomáticos e assintomáticos que chegaram para atendimento no Hospital de Clínicas veterinárias (HCV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), no estado Rio Grande do Sul, (Latitude-31.80529141694619, Longitude -52.415228960421224). Amostras controles positivas foram trazidas do Laboratório de Diagnóstico Veterinário FoccoVet, coletadas de animais positivos para o gênero de *Ehrlichia*.

Extração de DNA

As amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA no Laboratório de Biológica Molecular Veterinária (LaBMol-Vet). O DNA total foi extraído com kit comercial PetNAD™ Nucleic Acid Co- Prep Kit, seguindo as instruções do manual, sendo eluídos em 50 µL, quantificados por meio de espectrofotômetro de luz UV (NanoDrop®), para avaliar a sua qualidade mediante mensuração de sua pureza e concentração, submetido à eletroforese em gel de agarose para avaliação de sua integridade (degradação) e armazenados a -80 °C até a realização da PCR.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR a ser utilizada foi definida mediante estudos previamente estabelecidos por outros autores, utilizando os primers EHRI6SD (GGTACCYACAGAAGAAG-TCC) e EHRI6SR (TAGCACTCATCGTITACAGC), os quais têm como gene alvo o 16SrRNA, e um amplicon de 345 pb (PAROLA et al., 2000). O processo de amplificação por PCR é feito da seguinte forma: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos repetidos com as temperaturas de 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto, finalizando-se com um ciclo extra de extensão a 72 °C por 7 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram extraídas 69 amostras de sangue para a realização de PCR convencional, mas 9 controles, apresentando uma concentração média de 21,22 ng/ul. Todas as amostras foram extraídas mediante o método de coluna kit comercial PetNAD™ Nucleic Acid Co- Prep Kit. A relação 260 nm/280 nm ótima de pureza do DNA é de 1,80-2,0 e mostras com valor <1,6 são relacionadas com contaminação por compostos aromáticos como fenóis e proteínas. Já, aquelas amostras com valor <2,0 consideram-se presença de RNA na amostra. Desta maneira, neste estudo foram consideradas para realização da PCR convencional todas aquelas amostras que tenham uma relação 260/280 de 1,6-2,0 (BANCOADN, 2020). As demais foram ressubmetidas à extração.

Tabela 1. Resultados da extração de DNA total.

PetNAD™ Nucleic Acid Co-
prep Kit

Amostra	260/280	[] ng/ul									
s			s			s			s		
38	1,9	21,7	56	1,77	17,5	76	1,88	8,5	95	1,76	15,6
39	1,89	16,2	57	1,94	26,2	77	1,94	8,9	96	1,86	25,2
40	1,98	65,4	58	1,88	31,7	78	1,78	34,3	97	1,8	8,9
41	1,95	15,8	59	1,76	32,5	79	1,67	8,2	98	1,73	10,1
42	1,91	22,7	60	1,78	43,6	80	1,46	3,7	99	1,95	19,1
43	1,91	12,6	61	1,43	52,8	81	1,86	17,7	101	1,99	5,7
44	2,05	24	63	1,83	36,5	82	1,74	24,6	102	1,87	8,7
45	1,49	13,9	64	2,07	15,2	83	1,6	6,5	103	1,85	19,2
46	1,63	0,4	65	1,94	6,7	84	1,58	95	104	1,87	27,5
47	1,78	22,8	66	1,78	58,4	85	1,94	20,6	105	1,97	36,9
48	1,92	25,3	67	1,88	13,2	86	1,89	19,2	106	1,86	15,6
49	1,32	31	68	1,89	44,3	87	1,8	5,4	75	1,24	5,9
50	1,91	23,3	69	1,63	7,4	88	1,5	11	94	1,89	24,1
51	1,91	12,3	70	1,89	6,4	89	1,81	81			
52	1,23	11,4	71	2,04	2,5	90	1,79	7,7			
53	1,88	8,3	72	1,76	5,5	91	2,03	7,2			
54	1,87	13	73	1,76	14,8	92	1,9	28,4			
55	1,69	11,1	74	1,82	15,4	93	1,85	29,7			

O protocolo de PCR está em processo de padronização. A amostra até agora avaliada deu como resultado uma banda tênue de uma amostra positiva mediante eletroforese, sendo preciso continuar com o processo de padronização. Após, então, dar-se-á início às análises das amostras extraídas para obter os resultados para o presente estudo.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo encontra-se em desenvolvimento. Entretanto, espera-se contribuir com dados de importância epidemiológica sobre a prevalência de *Ehrlichia canis* na região. As amostras até agora processadas cumprem com um padrão acertado segundo os estudos encontrados sobre qualidade da amostra de DNA. Desta maneira, espera-se que o desenvolvimento deste projeto continue com normalidade. Para isso, é preciso finalizar a etapa de padronização do protocolo de PCR, para se obter os resultados desta pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANCOADN. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. **Banco ADN**, p. 1–10, 2020.
- CESAR, M. D. F. G. OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia canis* EM CÃES SINTOMÁTICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA E ANÁLISE DE VARIABILIDADE EM REGIÕES GENÔMICAS DE REPETIÇÃO. **Dissertação**, p. 57, 2008.
- DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A. DE; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e

- no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 191, 28 fev. 2004.
- DE CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73–86, 2004.
- DUARTE, S. C. PERFIL DO PARASITISMO SANGUÍNEO POR ANÁLISES MOLECULARES ENVOLVENDO Babesia, Ehrlichia e Hepatozoon EM CÃES SINTOMÁTICOS NA ÁREA METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS. **Tese**, 2010.
- GREENE. Doenças infecciosas em caes e gatos. v. 148, p. 148–162, 2015.
- HARRUS, S. et al. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 15–27, 1998.
- HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292–296, 2011.
- HUXSOLL, D. L. et al. Epizootiology of tropical canine pancytopenia. **Journal of wildlife diseases**, v. 6, n. 4, p. 220–225, 1970.
- PAROLA, P. et al. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 707–708, 2000.
- SÁ, R. DE et al. Erliquiose canina: Relato de caso. **Pubvet**, v. 12, n. 6, p. 1–6, 2018.
- UENO, T. E. H. et al. Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 03, p. 57–61, 2009.
- VIEIRA, R. F. DA C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01–12, 2011.