

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM CÃES E GATOS – DADOS PRELIMINARES

PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN¹; ALEXSANDER FERRAZ²; DANIEL
FELIPE BUITRAGO LINARES³; LAUREN NETTO PUJOL⁴; KAUE RODRIGUEZ
MARTINS⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – dallmannpaola@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – xanderferraz@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – daniel.buitrago.linares@unillanos.edu.co

⁴Universidade Federal de Pelotas – laurennpujol@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Os animais domésticos, como cães e gatos, são afetados por inúmeras enfermidades e, entre estas, destacam-se as hemoparasitoses, causadas por organismos intracelulares obrigatórios de células sanguíneas. Os agentes podem ser transmitidos por artrópodes hematófagos, como carrapatos e pulgas, bem como, por via iatrogênica. Entre os gêneros frequentemente observados ressaltam-se: *Hepatozoon*, *Babesia*, *Anaplasma* e *Mycoplasma*; sendo responsáveis por provocar sinais clínicos semelhantes e inespecíficos, dificultando o diagnóstico diferencial (BERNARDINO et al., 2016; FERRAZ et al., 2021).

Geralmente, o diagnóstico de hemoparasitos é realizado por meio de exame direto em esfregaço sanguíneo, no entanto, este apresenta baixas sensibilidade e especificidade (LEAL et al., 2015). Diante disto, é importante complementar o diagnóstico com o uso de outras técnicas, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma vez que tem como característica a detecção do agente com alta sensibilidade e especificidade (GOTTLIEB et al., 2016).

Perante o exposto, torna-se imprescindível a realização de diagnóstico molecular de hemoparasitoses, com objetivo de identificar os agentes circulantes e de disponibilizar um diagnóstico mais preciso, orientando o início do tratamento de forma mais rápida. Ademais, é importante a avaliação dos protocolos utilizados na extração do DNA, bem como a padronização das reações da PCR.

2. METODOLOGIA

Amostras e Local de processamento

Foram utilizadas 16 amostras sanguíneas, com EDTA, de cães e gatos com suspeitas de hemoparasitoses, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade Federal de Pelotas. O n amostral foi calculado com base nas prevalências encontradas em estudos. As técnicas foram executadas no Laboratório de Biologia Molecular Veterinária (LaBMol-Vet), da Faculdade de Veterinária da UFPel.

Foram obtidas dez amostras sanguíneas de animais positivos para os gêneros *Hepatozoon*, *Babesia*, *Anaplasma* e *Mycoplasma*, do Laboratório de Diagnóstico Veterinário FoccoVet e do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Faculdade de Veterinária da UFPel.

Extração de DNA

Todas as 16 amostras foram submetidas à extração de DNA genômico (gDNA) total utilizando o método por coluna PetNAD™ Nucleic Acid Co-prep Kit, seguindo as orientações do fabricante. Paralelamente, três destas amostras foram extraídas pelo método químico com o reagente Brazol™. Além disso, as dez amostras positivas foram submetidas também a extração pelo método por coluna PetNAD™ Nucleic Acid Co-prep Kit e/ou pelo método químico com o reagente Brazol™. O gDNA obtido em ambos os métodos de extração foi armazenado à -20 °C para posterior realização da PCR.

Análise da quantidade e qualidade do DNA

Para a análise de pureza e concentração do DNA extraído das amostras foi usado um espectrofotômetro de luz UV (NanoDrop®). A análise da quantidade de DNA é de acordo com a propriedade da molécula de absorver radiação UV no comprimento de onda de 260 nm e, mediante a razão 260 nm/280 nm aferida nas amostras, foi possível determinar a pureza do DNA extraído.

Seleção de *Primers*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos serão utilizados posteriormente na PCR e foram selecionados a partir de estudos previamente publicados, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Sequências correspondentes aos *primers* que serão utilizados nas PCRs em amostras sanguíneas de cães e gatos HCV da UFPEL.

Espécie (gene alvo)	Oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>Hepatozoon Canis</i> (18s RNA)	► 5'-ATACATGAGCAAATCTCAAC-3' ◄ 5'-CTTATTATTCCATGCTGCAG-3'	666	Inokuma et al., 2001
<i>Anaplasma platys</i> (18s RNA)	► 5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC -3' ◄ 5'-GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG-3'	678	Inokuma et al., 2001
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (p44)	► 5'-TGGTGGTGCGGGATATTTCTATGTGCC-3' ◄ 5'-ATTCCGAGGATCAGGTGTG-3'	334	Levin et al., 2002
<i>Babesia vogeli</i> (18s RNA)	► 5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3' ◄ 5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'	930	Jefferies et al., 2007
<i>Babesia gibsoni</i> (18s RNA)	► 5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3' ◄ 5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'	800	
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	► 5'-ACG AAA GTC TGA TGG AGC AAT A-3'	170	
<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> (16sRNA)	◄ 5'-ACGCCCAATAAATCCGRATAA-3'	193	Kamyngkird et al., 2021
<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> (16sRNA)	► 5'-CATCAGACAGAAGGGGGATTAAAGGTG-3' ◄ 5'-ACGCCCAATAAATCCGRATAA-3'	1230	Kamyngkird et al., 2021

► = forward; ◄ = reverse.

Gradiente de temperatura e concentração

Foi realizado um gradiente de temperatura e concentração, com o objetivo de padronizar a técnica de identificação do hemoparasito *Hepatozoon canis*, a fim de se

obter a repetibilidade para a execução do procedimento na rotina laboratorial. Foi testado o cloreto de magnésio ($MgCl_2$) nas concentrações de 1,0 mM e 1,25 mM. Além disso, para determinar a temperatura adequada de anelamento dos primers, uma PCR com gradiente de temperatura foi realizada com referência a temperatura média de dissociação dos primers com variação de $\pm 5^\circ C$ (Inokuma et al., 2001), conforme Tabela 2.

Os produtos obtidos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%. O gel foi corado em brometo de etídio e a visualização dos produtos amplificados sob luz UV, por meio de transiluminador.

Tabela 2: Comparativo dos ajustes realizados na padronização da técnica de PCR para detecção de *Hepatozoon canis*.

Experimentos	Fase de Desnaturação	Fase de anelamento	Fase de Extensão
1ª Experimentação	94°C por 2 minutos	95°C por 30 segundos 55,8°C por 30 segundos 72°C por 90 segundos	72°C por 5 minutos
2ª Experimentação	94°C por 2 minutos	95°C por 30 segundos 58°C por 30 segundos 72°C por 90 segundos	72°C por 5 minutos
3ª Experimentação	94°C por 2 minutos	95°C por 30 segundos 60,6°C por 30 segundos 72°C por 90 segundos	72°C por 5 minutos
4ª Experimentação	94°C por 2 minutos	95°C por 30 segundos 62,8°C por 30 segundos 72°C por 90 segundos	72°C por 5 minutos
5ª Experimentação	94°C por 2 minutos	95°C por 30 segundos 64°C por 30 segundos 72°C por 90 segundos	72°C por 5 minutos

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA foi extraído de 16 amostras por meio do PetNAD™ Nucleic Acid Co-prep Kit, onde se verificou que a média da razão 260/280 foi de 1,82, com a quantidade média de DNA de 18,13 ng/ μL . Em três amostras foi repetido a extração do DNA com Brazol™, em decorrência da reduzida concentração obtida, conforme Tabela 3.

Tabela 3: Resultados obtidos da extração de DNA das três amostras pelo reagente Brazol™ em comparação com o PetNAD™ Nucleic Acid Co-prep Kit.

Amostras	PetNAD™		Brazol™	
	260/280	[] ng/ μl	260/280	[] ng/ μl
1	1,84	8,5	1,78	1.419
2	2,07	3,5	1,8	157,9
3	1,82	9,4	1,71	82,2

A obtenção de DNA para a utilização na PCR para fins de diagnóstico deve seguir um protocolo em que se obtém amostras de alta pureza e em elevada concentração (KALIA et al., 1999). Assim, amostras puras de DNA apresentam a razão da absorvância 260/280 entre 1,8 e 2,0, enquanto razões menores indicam contaminação por proteínas, já, valores acima desta razão, sugerem contaminação por fenóis. É importante ressaltar que a absorção de ácidos nucleicos ocorre em 260 nm, já as de

proteínas em 280 nm (NICKLAS, 2003). No presente estudo, o valor mínimo da razão 260/280 aceito foi de 1,6.

Com relação ao gradiente de temperatura e concentração, foi obtido uma banda tênue, em 666 pb, na temperatura de 58 °C e na concentração de MgCl₂ de 1,25 mM. No entanto, é necessária a realização de mais experimentos para se obter um resultado satisfatório. O n amostral selecionado foi de 69 amostras, no qual 16 já foram processadas. Além disso, os demais *primers* estão em processo de padronização da técnica e, em um momento posterior, as amostras serão submetidas à PCR para todos os gêneros citados ao longo do presente estudo.

4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, fica em evidência a importância da pesquisa, uma vez que é imprescindível a determinação das hemoparasitoses de cães e gatos presente na região. Além disso, a extração é uma etapa fundamental na obtenção de DNA puro e em elevada quantidade, sendo necessária a avaliação dos protocolos utilizados, bem como a padronização das reações de PCR.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDINO, M.G.S.; MEIRELES, M.V.N.; SILVA, E.G.; XAVIER, F.J.R., et al. Prevalência de hepatozoonose canina no município de Areia, Paraíba, Brasil. **Biotemas**, v.29, n.1, p.175-179, 2016.
- FERRAZ, A.; BARWALDT, E.T.; LIMA, C.M.; CASTRO, T.A., et al. Coinfecção por *Babesia* spp. e *Anaplasma platys* em canino doméstico, relato de caso. **Scire Salutis**, v.11 - n.1, p.1-6, 2021.
- GOTTLIEB, J.; ANDRÉ, M.R.; SOARES, J.F.; GONÇALVES, L.R., et al. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.25, n.2, p.172-178, 2016.
- INOKUMA, H.; OHNO, K.; ONISHI, T.; RAOULT, D., et al. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, n.7, p.815-7, 2001.
- JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, v.144, n.1-2, p.20-7, 2007.
- KALIA, A.; RATTAN, A.; CHOPRA, P. A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. **Analytical Biochemistry**, v.275, n.1, p.1-5, 1999.
- KAMYINGKIRD, K.; JIYIPONG, T.; AMAVISIT, P.; STICH, R.W., et al. Molecular detection of *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ of stray cats residing in Bangkok monasteries, Thailand. **Agriculture and Natural Resources**, v.55, n.3, p.1-6, 2021.
- LEAL, P.D.S.; MORAES, M.I.M.R.; BARBOSA, L.L.O.; LOPES, C.W.G. Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.37, n.1, p.55-62, 2015.
- LEVIN, M.L.; NICHOLSON, W.L.; MASSUNG, R.F.; SUMNER, J.W., et al. Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.2, n.3, p.125-36, 2002.
- NICKLAS, J.A.; BUEL, E. Quantification of DNA in forensic samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.376, n.8, p.1160-7, 2003.