

ESTUDO DA PREVALÊNCIA MOLECULAR DE *EHRlichia CANIS* EM CÃES ASSISTIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS.

Daniel Felipe Buitrago Linares¹; Kauê Rodriguez Martins²; Paolla Renata Dallman²; Éverton Fagonde da Silva²; Marlete Brum Cleff²; Rodrigo Casquero Cunha³

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

Universidade Federal de Pelotas 2 – dallmannpaola@gmail.com 2

Universidade Federal de Pelotas 2 – fagondee@gmail.com 2

Universidade Federal de Pelotas 2 – marletecleff@gmail.com 2

Universidade Federal de Pelotas 2 – kauerodriguez@gmail.com 2

Universidade Federal de Pelotas 3 – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br 3

1. INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é uma espécie de bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias. Esta pode ser encontrada em diversas espécies animais, incluindo humanos, o que a torna um agente zoonótico (BOUZA-MORA et al., 2017). No contexto canino, essa bactéria desempenha um papel significativo, pois é a espécie mais patogênica dentro de seu gênero. Sua presença pode levar ao desenvolvimento de diversos sinais clínicos em cães, como febre, perda de apetite, redução de peso, dor articular, alterações neurológicas e distúrbios hematológicos, incluindo anemia, trombocitopenia e pancitopenia (PATRICIA; DELZY, 2019).

A ehrlichiose canina é desencadeada por várias espécies pertencentes ao gênero *Ehrlichia*, incluindo *E. canis*, *Ehrlichia Ewingii* e *Ehrlichia Chaffeensis*. Além destas, existem também *Ehrlichia muris* e *Ehrlichia Ruminantium*, que afetam outras espécies animais de maneira distinta (SOLER-TOVAR, 2020).

A distribuição global dessa bactéria é ampla, com exceção da Nova Zelândia e Austrália. No Brasil, sua presença foi constatada em todos os estados, apresentando uma maior incidência no nordeste e uma presença mais reduzida no sul (NEVES et al., 2014). Em Pelotas, foram realizados dois estudos significativos sobre a presença de *E. canis*. O primeiro, identificou positividade por PCR em 37,1% das amostras (BARCELLOS KRAUSE et al., 2015). O segundo estudo, realizado por FERRAZ et al. (2021), não identificou a presença de *E. canis* por meio de esfregaço sanguíneo.

Diversas ferramentas estão disponíveis para auxiliar no diagnóstico desta doença, dentre elas, destacam-se o esfregaço sanguíneo, os testes imunodiagnósticos e as técnicas moleculares, sendo a PCR considerada o padrão-ouro para esse diagnóstico. A PCR sobressai-se por sua capacidade de identificar o DNA da bactéria, permitindo, também, a identificação da espécie, o que a diferencia de outras técnicas, como o esfregaço sanguíneo que apresenta efetividade de apenas 4% na observação de mórulas. Além disso, os testes imunodiagnósticos podem resultar em falsos positivos em cães previamente afetados, tornando difícil discernir entre doença prévia e atual, além de apresentar reações cruzadas entre as diferentes espécies de *Ehrlichia* (AZIZ et al., 2023; FRANCO; ADAME; DZUL, 2019).

Pelo anterior, o objetivo deste projeto foi investigar a prevalência molecular de *E. canis* em cães assistidos no Hospital de Clínicas Veterinária (HCV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado entre os meses de maio e dezembro de 2022 no HCV/UFPEL, localizado no Campus Capão do Leão da UFPEL, no estado Rio Grande do Sul, com uma altitude de 21 metros sobre o nível do mar, com temperatura média de 24,9 °C nos meses de novembro, dezembro, janeiro, fevereiro, março e abril, e em meses como maio, junho, julho, agosto, setembro e outubro, temperaturas de 18,4 °C.

Coletou-se um total de 95 amostras de sangue por punção venosa em tubos com EDTA. Imediatamente após a coleta, as amostras foram levadas ao Laboratório de Biologia Molecular Veterinária (LaBMol-Vet) para extração de DNA, utilizando o kit comercial PetNAD™ Nucleic Acid Co-Prep (GeneReach Biotechnology Corporation, Taichung City, Taiwan R.O.C), conforme instruções do fabricante. Após avaliar a pureza e a concentração em espectrofotômetro NanoDrop® (Life Technologies Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brazil), assim como a degradação mediante eletroforese em gel de agarose a 1-5%, o produto foi armazenado a -20 °C.

A PCR foi padronizada segundo estudos de outros autores (ALVES, LUCIANO: GUIDO, 2006; DUARTE; PARENTE; LINHARES, 2013). Dessa maneira, foi utilizado o gene de 16S rRNA, o qual pode ser específico para gênero e espécies, mediante Nested PCR, a depender dos oligos utilizados na reação (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento-alvo 16S rDNA.

	Primer	Sequência	Sentido	Peso molecular
1º reação	EBR6	(5'-CGA ACG CTG GCG GCA AG-3')		840 bp
	EBR5	(5'-GGA GTG CTT AAC GCG TTA G-3')		
2º reação	EBR1	(5'-CCT CTG GCT ATA GGA AAT TG-3')		765 bp
	EBR5	(5'-GGA GTG CTT AAC GCG TTA G-3')		

A Nested PCR foi desenvolvida utilizando o GeneAmp PCR System Thermal Cycler (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA). Sendo a primeira reação gênero-específica, após uma desnaturação de 94 °C por 2 minutos, o programa de amplificação foi de 40 ciclos 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos, e 72 °C durante 1 minuto com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C, assim como a segunda reação espécie-específica que teve as mesmas temperaturas durante as diferentes etapas com a diferença da amplificação que tem uma duração de 35 ciclos.

Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio (10 µg/mL). O peso molecular foi determinado pela comparação com o marcador de peso molecular Marker ladder 100 pb (Ludwig Biotecnologia®).

Alvorada, RS, Brasil). Foi utilizada uma amostra DNA controle positivo e como controle negativo da reação, utilizou-se água ultrapura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de maio a dezembro de 2022, um total de 95 amostras foram analisadas utilizando Nested PCR, resultando em uma prevalência molecular de 16,84% (16/95) de *E. canis*. A amplificação do gene produziu um amplicon de 840 pb para o gênero-específico e 765 pb para a espécie *E. canis*.

Dos caninos coletados, 49 foram fêmeas e 45 foram machos, com idades entre 1,1 e 15,8 anos para fêmeas e 0,8 a 16,6 anos para machos, com idades médias de $8,27 \pm 3,85$ anos e $7,82 \pm 4,34$ anos, respectivamente. A faixa de idade para os animais avaliados foi de 0,8 a 16 anos. Sobre os animais positivos, o padrão de idade foi de $7,86 \pm 4,34$ anos, sendo que os positivos se encontram entre 1 e 15,8 anos.

No Rio Grande do Sul, a prevalência de *E. canis* foi investigada usando imunocromatografia, resultando em uma prevalência de 4,8% (SAITO et al., 2008). Em Pelotas, estudos têm empregado esfregaço sanguíneo, teste de anticorpos fluorescentes indiretos (IFI) e PCR para avaliar a presença de *E. canis* (BARCELLOS KRAUSE et al., 2015; FERRAZ et al., 2021). Este estudo atual representa a primeira tentativa de examinar a prevalência molecular de *E. canis* em Região Sul, RS, contribuindo para nossa compreensão da distribuição da doença.

Apesar da relevância de *E. canis* como patógeno no Rio Grande do Sul, há uma escassez de estudos de prevalência. A importância do patógeno aumentou devido ao seu potencial de infectar seres humanos, conforme documentado na literatura (STIVAL et al., 2021). Notavelmente, foram encontradas cepas de *E. canis* idênticas às que afetam os humanos em cães brasileiros (EDWARD HUERTO-MEDINA, 2015), destacando a necessidade de investigar a presença, a distribuição e a prevalência desse agente.

4. CONCLUSÕES

A prevalência molecular de 16,84% encontrada neste estudo superou os achados anteriores de prevalência sorológica por Saito et al. (2008) no Rio Grande do Sul. Essa variação pode ser atribuída às diferenças entre as técnicas utilizadas, ao ambiente de hospital veterinário do estudo, onde os cães são frequentemente diagnosticados e tratados para várias doenças. Entretanto, destaca-se a importância deste estudo pela utilização da PCR, como sendo um teste direto e, portanto, indicando que estes animais são portadores do agente, atuando como fontes de infecção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, LUCIANO; GUIDO, F. C. ; L. :NILO S. T. C. Avaliação De Iniciadores E Protocolo Para O Diagnóstico Da Pancitopenia Tropical Canina Por Pcr. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 49–54, 2006.

AZIZ, M. U. et al. Ehrlichiosis in Dogs: A Comprehensive Review about the Pathogen and Its Vectors with Emphasis on South and East Asian Countries. **Veterinary sciences**, v. 10, n. 1, p. 21, 2023.

- BARCELLOS KRAUSE, L. E. et al. Parasitologic, Serological and Molecular Diagnostic of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* in a Veterinary Hospital in Southern Brazil. **Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 5, p. 337–341, 2015.
- BOUZA-MORA, L. et al. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36–40, 2017.
- DUARTE, S. C.; PARENTE, J. A.; LINHARES, G. F. C. DIAGNÓSTICO molecular de *Ehrlichia canis* EM CÃES de GOIÂNIA, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, p. 30–41, 2013.
- EDWARD HUERTO-MEDINA, B. D.-M. Original Breve FACTORS ASSOCIATED WITH *Ehrlichia canis* INFECTION IN DOGS INFESTED WITH TICKS FROM HUANUCO , PERU. v. 32, n. 4, p. 756–760, 2015.
- FERRAZ, A. et al. Prevalência de Hemoparasitoses em Cães na Região Sul do Estado do Rio Grande do Sul , Brasil Prevalence of Hemoparasitosis in Dogs in the South Region of the State of Rio Grande do Sul ,. **Ensaios e ciencia**, v. v. 25 n. 5, p. 609–612, 2021.
- FRANCO, M.; ADAME, J.; DZUL, K. Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 5, p. 650–655, 2019.
- NEVES, EDUARDO CAVALCANTE DAS et al. Erliquiose Monocítica Canina : Uma zoonose em ascensão e suas limitações diagnósticas no Brasil. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 12, n. 40, p. 1–7, 2014.
- PATRICIA, S.; DELZY, B. Clinical findings in dogs (*Canis familiaris*) infected with *Ehrlichia canis*. **Ciencia y Desarrollo. Universidad Alas Peruanas**, v. 22, n. 3, p. 23–27, 2019.
- SOLER-TOVAR, D. **Enfermedades Rickettsiales en Latinoamérica**. [s.l: s.n.].
- STIVAL, C. et al. Erliquiose monocitotrópica canina: Revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2021.