

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS E PCR NO DIAGNÓSTICO DE *EHRlichia CANIS* EM CÃES, VILLAVICENCIO, META-COLOMBIA.

Daniel Felipe Buitrago Linares¹; Kauê Rodriguez Martins²; Tatiélen Hernandez Severo² Pedro Gabriel de Oliveira²; Larissa Beatriz Silva das Neves² Rodrigo Casquero Cunha³.

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

² Universidade Federal de Pelotas – Kauerodriguez@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – tatielensevero@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – pedrogaoliveira@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – larissabeatriz308@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é uma bactéria intracelular obrigada sendo seu vetor o carrapato marrom *Rhipicephalus sanguineus*, o qual está distribuído mundialmente, A doença causada por essa bactéria é conhecida como Ehrlichiose monocítica canina, afetando principalmente os monócitos, alvo de preferência da infecção, causando sintomas variados em cães, (BONILLA-ALDANA et al., 2022) como alterações multissistêmicas, podendo apresentar hemorragia, pancitopenia e linfadenopatia.

A crescente proximidade entre animais domésticos, silvestres e seres humanos tem facilitado o intercâmbio de vetores e patógenos, tornando agentes como *Ehrlichia* spp., entre outros, de grande relevância tanto para a medicina veterinária quanto para a medicina humana (CORNEJO et al., 2024). DNA dessa bactéria foi detectado em pacientes humanos em Venezuela, Mexico e Costa Rica (PESAPANE et al., 2019). Dessa forma, a testagem de cães domésticos se torna uma medida crucial, não apenas para o diagnóstico e controle de *Ehrlichia* spp. na saúde canina, mas também como uma estratégia eficaz de vigilância e prevenção de riscos à saúde humana.

Para a detecção de *E. canis*. Além da importância do exame clínico prévio, existem diferentes técnicas descritas, como hematológicas, de isolamento, serológicas e moleculares, a Reação em cadeia de polimerase (PCR) é considerada uma das principais ferramentas para o diagnóstico de *E. canis*, isto devido a detecção de DNA do patógeno (FRANCO et al., 2019), embora não seja a mais utilizada para a detecção do patógeno na rotina veterinária quando comparada a outras provas baseadas em sorologia que precisam de menor treinamento para sua execução e tem maior distribuição no mercado, as quais tem a capacidade de detectar anticorpos gerados no processo infeccioso. Os testes hematológicos como o esfregaço sanguíneo são bastante utilizadas, pois são rápidas e de baixo custo, com uma alta especificidade, porém com baixa sensibilidade. (Ferraz et al., 2021; Lara et al., 2020)

O objetivo deste estudo foi avaliar cães diagnosticados como positivos para *Ehrlichia canis* utilizando técnicas imunocromatográficas em comparação com métodos moleculares, como a PCR.

2. METODOLOGIA

Amostras, local e processamento

Foram coletadas 37 amostras de sangue em tubo de EDTA de cães que foram diagnosticados como positivos para *Ehrlichia canis* usando teste de imunocromatografia no atendimento clínico, numa clínica veterinária de Villavicencio, Meta- Colômbia (4.148139285956131, -73.62275404052943) as amostras foram armazenadas a -20 °C e transportadas em caixa de isopor refrigerada.

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 co-mercial PetNADTM Nucleic Acid Co- Prep Kit, seguindo as instruções do fabricante, em seguida, foram 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 foi realizada segundo (Duarte, 2013) utilizando os primers EHRI6SD (GGTACCYACAGAAGAAGTCC) e EHRI6SR (TAGCACTCATCGTITACAGC), os quais têm como gene alvo o rRNA, gerando amplicon de 345 pb. A PCR foi composta de 10x tampão de amostra (2,5µl), 2,5 mM de dNTP mix (2 µl), 50 MgCl₂ (0,75-1,5 µl), Primer 1 (25pmol) (0,25 µl), Primer 2(25pmol) (0,25 µl), DNA molde (2 µl), Taq polimerase (50U/µl) (2 µl), Água livre de DNase e RNase..A PCR foi otimizada em relação a concentração de MgCl₂ (Tabela 1) e temperatura de anelamento e número de ciclos (Tabela 2).

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, 50-59 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto, finalizando se com um ciclo final de extensão a 72 °C por 7 minutos.

Ensaio de Gradiente de temperatura

Tabela 1. Aprimoramento de temperatura de anelamento para realização de PCR de *Ehrlichia canis*

Ensaio	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1	94 °C por 2 minutos	50 °C	72 °C por 7 minutos
2	94 °C por 2 minutos	53 °C	72 °C por 7 minutos
3	94 °C por 2 minutos	55 °C	72 °C por 7 minutos
4	94 °C por 2 minutos	59 °C	72 °C por 7 minutos
N. de ciclos		40x-35x	

As temperaturas foram avaliadas tanto para a primeira quanto para a segunda reação, sendo definida a temperatura de anelamento em 53 °C. A primeira reação consistiu de 35 ciclos, enquanto a segunda incluiu 40 ciclos.

Aprimoramento de componentes para PCR.

Tabela 2. Ensaio de diferentes volumes para realização de PCR.

Componentes	Volume final (µl)	Concentração padrão	Ensaio 1(µl)	Ensaio 2(µl)	Ensaio 3(µl)
10x tampão de amostra	5	1x	2,5	2,5	2,5
2,5 mM de dNTP mix	4	0,2mM cada	2	2	2
50mM MgCl ₂	1,5	1,5 mM	1,25	1	0,75
Primer 1 (25pmol)	0,5	0,5 µM	0,25	0,25	0,25
Primer 2(25pmol)	0,5	0,5 µM	0,25	0,25	0,25
DNA molde	0,5-10		2	2	2
Taq polimerase (50U/µl)	0,5	2,5 U/dl	0,25	0,25	0,25
Água destilada autoclavada	50		16,5	16,75	17

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de PCR foi otimizada com base em um gradiente de temperatura e diferentes volumes de reagentes, conforme descrito na metodologia. O volume final estabelecido foi de 25 µl por amostra. Das 37 amostras previamente identificadas como positivas por imunocromatografia, 17 amostras apresentaram DNA detectável utilizando a técnica de PCR padronizada.

A diferença diagnóstica pode ser atribuída às variações entre as técnicas utilizadas. As técnicas imunocromatográficas, por exemplo, podem não detectar anticorpos no início da fase aguda, quando ainda não foram gerados em quantidades suficientes, resultando em falsos negativos. Essas técnicas apresentam alta sensibilidade, porém a especificidade pode variar, uma vez que os anticorpos podem permanecer detectáveis mesmo na ausência do patógeno, levando a falsos positivos. Por outro lado, a PCR detecta o DNA bacteriano diretamente, mas sua sensibilidade pode ser influenciada pelo nível de bacteremia; em casos de baixa bacteremia, a PCR pode gerar resultados falso-negativos pelo que é preciso um uso adequado das técnicas para um diagnóstico apropriado(LARA et al., 2020).

Na Colômbia, já existem evidências da presença tanto do vetor quanto do patógeno, sendo a ehrlichiose canina uma das doenças transmitidas por carrapatos mais prevalentes em áreas urbanas e suburbanas(ARROYAVE et al., 2020). Dada a relevância epidemiológica, torna-se fundamental obter dados sobre a presença do patógeno em diferentes regiões para identificar as cepas circulantes. Este estudo busca contribuir para esse objetivo, dando continuidade à identificação das cepas por meio de técnicas de sequenciamento.

4. CONCLUSÕES

46% das amostras avaliadas como positivas pelo teste imunocromatográfico não apresentaram detecção de DNA, corroborando outros estudos que identificaram essas discrepâncias diagnósticas. Isso reforça a importância da complementação entre diferentes técnicas diagnósticas, juntamente com o acompanhamento clínico. É essencial ampliar as pesquisas com sequenciamento de DNA para identificar as cepas circulantes, melhorando assim os planos de prevenção e diagnóstico em prol da saúde única.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arroyave, E.; Rodas-González, J. D.; Zhang, X., Labruna, M. B.; González, M. S.; Fernández-Silva, J. A.; & McBride, J. W. Ehrlichia canis TRP36 diversity in naturally infected-dogs from an urban area of Colombia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, V. 11, N. 3, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101367>

Cornejo, A.; Davila, R.; & Gomez-Puerta, L. A. Molecular detection of Ehrlichia spp., Anaplasma spp., and Bartonella spp. in dogs treated at a veterinary teaching clinic in Peru. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, V. 113, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2024.102245>

Duarte. S. C.; Alves. J.; Linhares, G. DIAGNÓSTICO molecular de Ehrlichia canis EM CÃES de GOIÂNIA, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, V. 42 N. 1, 2013 30–41. <https://doi.org/10.5216/rpt.v42i1.23591>

Ferraz, A.; Lima, C. M. Castro, T. A. Nobre, O., & Nizol, L. Q. 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, . *Ensaio e Ciencia*, v. 25 n. 5, 609–612, 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.17921https://doi.org/10.17921/1415-6938.2021v25n5-espp609-612>

Franco, M.; Adame, J.; & Dzul, K. Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Revista Chilena de Infectología*, 36(5), 650–655, 2019.

Lara, B.; Conan, A.; Thrall, M. A.; Ketzis, J. K.; Branford, G. C.; & Rajeev, S. (Serologic and molecular diagnosis of Anaplasma platys and Ehrlichia canis infection in dogs in an endemic region. *Pathogens*, 9(6), 1–9, 20220 <https://doi.org/10.3390/pathogens9060488>

Pesapane, R.; Foley, J.; Thomas, R.; & Castro, L. R. Molecular detection and characterization of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from northern Colombia. *Veterinary Microbiology*, 233, 184–189, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.05.002>