10º FEPEG FÓRUM ENSINO · PESQUISA EXTENSÃO · GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA
Realização: Unimontes, Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Minas Gerais
Apoio: FAPEMIG, FADENOR
ISSN 1806-549 X

Autor(es): VANESSA DE ANDRADE ROYO, ELYTANIA VEIGAMENEZES, JULIA RODRIGUES ORTEGA, AFRÂNIO FARIAS DE MELO JUNIOR, DARIO ALVES DE OLIVEIRA

Padronização da técnica de PCR para diagnóstico de Erliquiose canina

Resumo

A Erliquiose canina é uma doença que acomete tanto cães quanto em seres humanos. É considerada uma zoonose e possui grande amplitude no Brasil. O ciclo da doença começa com a bactéria *Ehrlichia canis* presente em cães infectados, passa para os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* que hospedam o cão e quando esses são transferidos para outros cães pelo contato, o contágio acontece.

Os sinais clínicos da doença são vários, ou seja, não existe um padrão e por isso o diagnóstico e tratamento ficam prejudicados.

Existe uma preocupação em torno da melhor metodologia para um diagnóstico rápido e eficiente visando a recuperação parcial ou total do paciente. E esse trabalho propõe como forma de diagnóstico a técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR), cuja eficiência é evidenciada através dos resultados positivos do sequenciamento do material genético da *Ehrlichia* comprovados pela amplificação de três amostras analisadas. Podendo ser uma metodologia aplicada no diagnóstico mais conciso da doença e capaz de auxiliar os profissionais da saúde a obter o melhor tratamento possível para os pacientes.

PALAVRAS-CHAVE : *Ehrlichia canis*, Diagnóstico de Erliquiose pelo método da PCR.

Introdução

A Erliquiose é uma doença comum nos centros urbanos, é causada por uma bactéria do gênero *Rickettsia* sendo no Brasil a *Ehrlichia canis* a responsável pela zoonose. São parasitas intracelulares obrigatórios principalmente das células do sistema fagocitário mononuclear (macrófagos e monócitos).

Ao final do processo de multiplicação rompem a membrana para infectar novas células. (ANDEREG; PASSOS, 1999; ALMOSNY, 2002) (MORAES et al., 2004; SAITO, 2009).

No carrapato a *Ehrlichia canis* multiplica-se nas glândulas salivares, nas células do intestino e nos hematócitos, e por meio da saliva infectam os cães. Portanto, o cachorro é o principal reservatório da bactéria e a forma como a doença se apresentará neste depende principalmente da raça, idade do animal, alimentação e da virulência da bactéria.

As manifestações clínicas mais comuns no animal são a apatia, hipertermia, linfoadenopatia, inapetência, mucosas pálidas e hemorragia, esplenomegalia e uveítes. (NAKAGH, et al., 2008) (AGUIAR, 2006).

A *Ehrlichia canis* quando parasita as células cria uma estrutura denominada mórula nos leucócitos durante a fase aguda da infecção. (ANDEREG; PASSOS, 1999) (SILVA, 2001) (ALMOSNY, 2002). A visualização dessa estrutura é a forma utilizada para diagnóstico da doença, através do esfregaço sanguíneo oriundo da orelha do cão. Contudo, como as células se rompem em um curto período de tempo, o diagnóstico fica difícil de ser concluído.

A Reação em cadeia da polimerase tem objetivo de amplificar uma sequência específica de DNA de qualquer material biológico várias vezes por realizar a replicação exponencialmente. Os pares de base utilizados foram capazes de replicar o material genético de *Ehrlichia* para obter o diagnóstico clínico do sangue dos cachorros analisados.

Material e métodos

Toda realização do trabalho foi feita no laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos da Universidade Estadual de Montes Claros.

Extração do DNA.

O DNA foi extraído de sete amostras clinicamente suspeitas de Erliquiose e coletadas por uma clínica veterinária particular e conservadas em EDTA.

A extração foi feita com base no método Fenol-Clorofórmio seguida de precipitação em isopropanol. Reservadas em tubos do tipo *Eppendorf* de 2,0ml (OLIVEIRA et al., 2007).

A Reação em cadeia da polimerase.

A PCR foi realizada no Termociclador Veriti 96 Dell Thermal Cycler Applied Biosystems e a padronização da PCR foi estabelecida no volume total de 25µl em tubos *Eppendorf* de 0,2ml com medidas: 1x da solução tampão, 2mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), 2,5 mM de dNTP, 1mM de cada um dos primers, 1U de Taq-DNA polimerase, 2µL de DNA.

Apoio financeiro: FAPEMIG.
Aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes – CEEBEA: nº 116/2016

ISSN 1806-549 X

A amplificação foi realizada em 35 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação, 50°C para anelamento dos primers e 72°C para extensão final.

Eletroforese.

A eletroforese foi realizada em gel de Agarose a 1% corado com Brometo de Etídio. A captura das imagens foi realizada com o fotodocumentador da marca GelLogic.

Resultados e discussão

As amostras de DNA suspeitas de Erlichiose foram analisadas em gel de Agarose e a partir do resultado da quantificação foram selecionadas as mais promissoras, nesse caso, foram as amostras 01 e 02 que formaram pellet visível após a aplicação do álcool 100% e a 03 com melhor resultado no fotodocumentador (Fig. 2).
As principais alterações para padronização foram nas concentrações de DNA utilizadas na PCR. Os melhores resultados foram as diluições de 1:5 e 1:8. Ao todo foram feitas 7 reações em cadeia da polimerase e a padronização foi realizada com sucesso. A melhor amplificação foi (Fig.1) visualizada no fotodocumentador GelLogic com fragmento de 830 pares de base, caracterizando a positividade para *Ehrlichia canis.*

Conclusão

A PCR foi um método eficaz para o diagnóstico da Erliquiose e a reação foi padronizada de forma eficiente. A perspectiva futura do presente trabalho é a coleta de um maior número de amostras, a realização do diagnóstico molecular destas e a construção do perfil epidemiológico da Erliquiose Canina em Montes Claros.

Agradecimentos

Agradeço FAPEMIG pela bolsa de Iniciação Científica, cujo auxílio permitiu a realização desse trabalho.

Referências bibliográficas

GARCIA FILHO, S. P.; DIAS, M. A.; ISOLA, J. G. M. P.; MARTINS, L. L. **Erliquiose Canina: relato de caso revista científica eletrônica de medicina veterinária** - ISSN: 1679-7353. Ano VIII – Número 14 – Janeiro de 2010.

OLIVEIRA, M. C. S; [et al.] . **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificaçãode DNA por meio da técnica de Reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

SILVA, M. V. M.; FERNANDES, R. A.; NOGUEIRA, J. L.; AMBRÓSIO, C. E**. Erliquiose canina: revisão de literatura**. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 139-143, jul./dez. 2011.

ISSN 1806-549 X

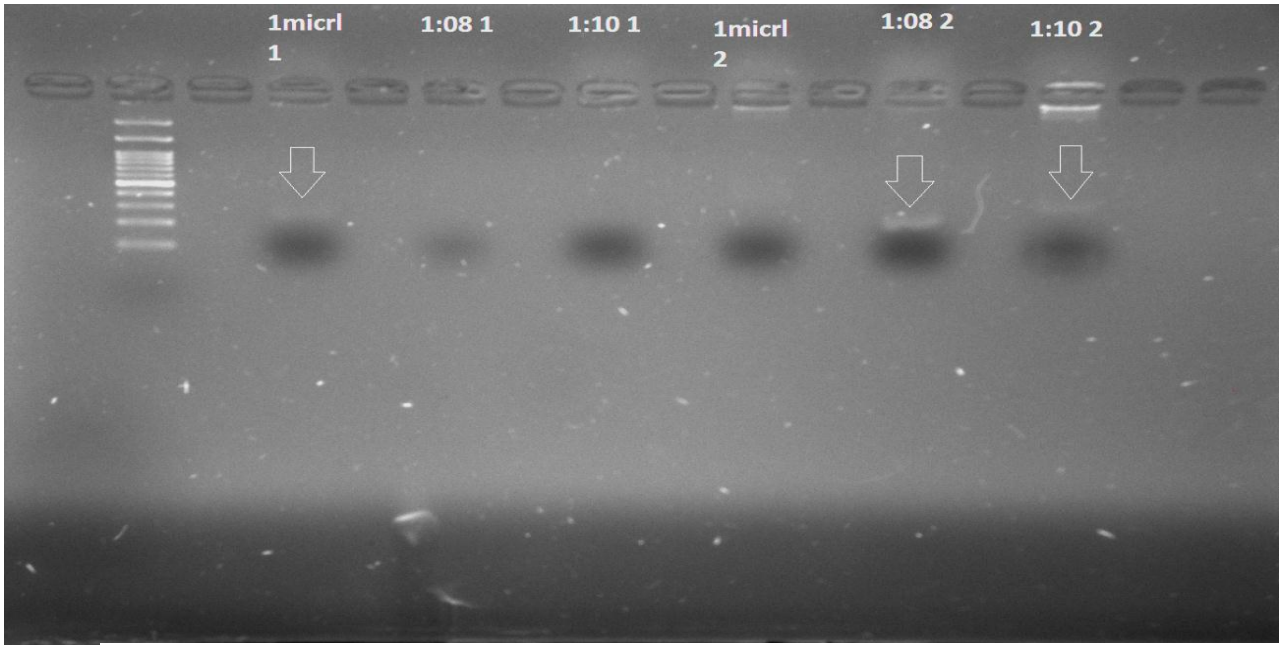

Figura 1: Com base na imagem o melhor resultado de visualização dos pares de base foi na concentração de 1:8 da amostra 02. A amostra 01 pouco amplificou nessa concentração por provavelmente ter menos concentração de DNA de *Ehrlichia canis*. Fig. 7,94cm de altura e 15,8cm de largura.

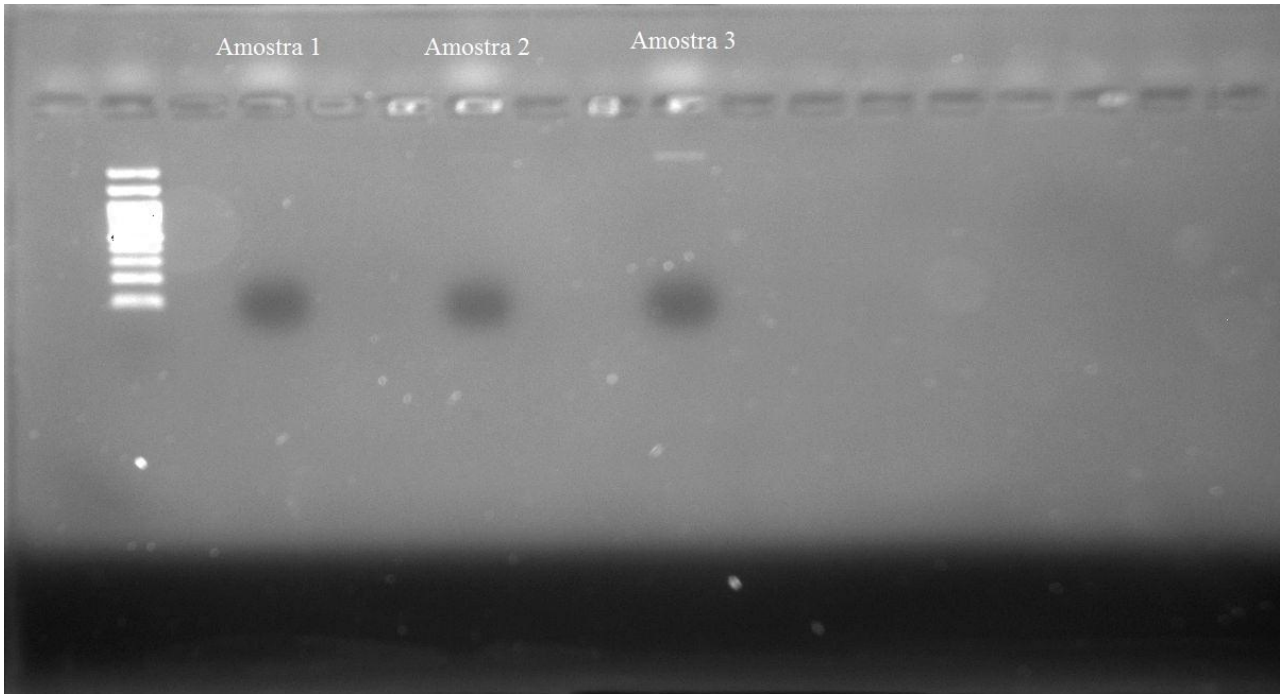

Figura 2: A melhor visualização do DNA total das amostras foi o da amostra 03.