



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE MICRORGANISMOS DO CERRADO



THIAGO DE MORAIS SOUZA

**Detecção molecular de *Ehrlichia* spp.
utilizando amostras da região de Cumari
e material sanguíneo de cães domésticos.**

UBERLÂNDIA-MG

2022

THIAGO DE MORAIS SOUZA

**Detecção molecular de *Ehrlichia* spp.
utilizando amostras da região de Cumari
e material sanguíneo de cães domésticos.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas (INBIO), da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

UBERLÂNDIA-MG

2022

THIAGO DE MORAIS SOUZA

**Detecção molecular de *Ehrlichia* spp.
utilizando amostras da região de Cumari
e material sanguíneo de cães domésticos.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas (INBIO), da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

RESULTADO: _____ NOTA: _____

Uberlândia, _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jonny Yokosawa (orientador)
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Doutoranda Mayara Garcia Polli (examinador)
Instituição: PPIPA/ICBIM/UFU

Doutorando Vinícius da Silva Rodrigues (examinador)

Instituição: PIPA/ICBIM/UFU

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primordialmente a Deus por ter me permitido trilhar esse caminho, ter predisposto de pessoas tão boas e que contribuíram para minha evolução durante meu caminho. Agradeço também aos meus pais, Ricardo e Rejane por serem meus pilares em todos os momentos da minha vida e nesse não poderia ter sido diferente, mesmo que não tenham interferido na pesquisa em si contribuíram para que isso tudo se tornasse possível. Posteriormente, eu gostaria de citar alguns nomes que contribuíram para minha caminhada dentro do Lamice (Laboratório de Microrganismos do Cerrado) em especial ao professor Dr. Jonny Yokosawa, por ter tido paciência e ter sido extremamente prestativo em todos os momentos comigo, até mesmo em momentos em que fui corrigido ele foi sempre muito preciso e me fez crescer muito como cientista. Ressalto também a presença de sua doutoranda Mayara que contribuiu para me ensinar o passo a passo de um laboratório e que sempre que necessário se mostrou disposta a me ajudar, me instruir sobre qual o melhor caminho a ser seguido. Outros nomes que fizeram a diferença foram a Ana Paula, Vinícius e Laís do LABIX. A todos vocês o meu muito obrigado, pode ter certeza de que sempre me lembrarei com carinho de cada um de vocês!

RESUMO

A *Ehrlichia canis* é uma doença muito importante quando o assunto é saúde veterinária, pois, em hospitais veterinários a recorrência de diagnóstico dessa doença é alta, figurando entre as enfermidades mais graves que acometem os cães. Por esse motivo o presente projeto focou em implementar um método para detecção de DNA de diversas cepas da *Ehrlichia* spp. através da PCR (reação em cadeia da polimerase) em amostras de carrapatos *R. sanguineus* sensu lato. Além disso, foi avaliado a presença de *Ehrlichia* spp. em carrapatos de regiões do Cerrado. Para que isso fosse possível, foram testadas algumas amostras extraídas de carrapatos da região de Cumari, Goiás. Houve também a extração a partir de uma amostra sanguínea disponibilizada pelo Hospital Veterinário (HV). Para a PCR, inicialmente houve o embasamento em artigos científicos para seleção de primers, posteriormente foram feitas algumas modificações em suas sequências para aumentar a gama de detecção das diferentes espécies de *Ehrlichia* spp. Os resultados encontrados foram distintos ao que esperávamos. Apesar deles demonstraram que as amostras utilizadas da região de Cumari não continham o patógeno, pois não houve amplificação, a banda amplificada nas duas últimas PCR foi de amostras distintas. Desse modo, os resultados esperados somente seriam alcançados caso houvesse um maior número de extrações.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, erliquiose, PCR, *R. sanguineus*.

ABSTRACT

Ehrlichia canis is a very important disease when it comes to veterinary health, because in veterinary hospitals the recurrence of diagnosis of this disease is high, being among the most serious diseases that affect dogs. For this reason, the present project focused on implementing a method for DNA detection of several strains of *Ehrlichia* spp. by PCR (polymerase chain reaction) in samples of ticks *R. sanguineus* sensu lato. In addition, the presence of *Ehrlichia* spp. in ticks from Cerrado regions. To make this possible, some samples extracted from ticks in the region of Cumari, Goiás were tested. There was also extraction from a blood sample provided by the Veterinary Hospital (HV). For PCR, initially there was a basis in scientific articles for the selection of primers, later some modifications were made in their sequences to increase the detection range of different species of *Ehrlichia* spp. The results found were different from what we expected. Although they showed that the samples used from the Cumari region did not contain the pathogen, as there was no amplification, the amplified band in the last two PCRs was from different samples. Thus, the expected results would only be achieved if there were a greater number of extractions.

Key words: *Ehrlichia canis*, ehrlichiosis, PCR, *R. sanguineus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Doenças transmitidas por carrapatos	7
1.2 <i>Ehrlichia canis</i>	8
1.3 <i>Rhipicephalus sanguineus sensu lato</i>	9
1.4 Diagnóstico	9
2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Locais de coleta	10
3.2 Método de captura dos canídeos	11
3.3 Identificação de carrapatos	12
3.4 Diagnóstico	12
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5 CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são artrópodes altamente especializados em alimentar-se de sangue de vertebrados e podem atuar como vetores biológicos sendo os mais importantes para animais e o segundo em importância para os seres humanos (BALASHOV 1972). A ocorrência de patógenos pode afetar não só a abundância como também a distribuição de animais e nas últimas décadas o impacto das doenças nas populações de espécies selvagens de vida livre tem chamado a atenção dos profissionais envolvidos na área da conservação (MCCALLUM & DOBSON, 1995; MURRAY et al., 1999; WOODROFFE 1999; CLEVELAND et al. 2007).

1.1 Doenças transmitidas por carrapatos

Dentre as patologias mais comuns transmitidas por carrapatos, podemos citar a riquetsiose causada por *Rickettsia rickettsii*, sendo a enfermidade mais prevalente no Brasil, onde seus primeiros relatos datam da década de 30. (DIAS 1939; PIZA 1993). As espécies de maior importância na transmissão da doença no Brasil são os carrapatos *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma aureolatum* (FILHO, 2017).

A *Ehrlichia* spp. também possui um enorme destaque em diagnóstico de doenças transmitidas por carrapatos. Ela é uma bactéria intracelular obrigatória de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, em especial do sistema fagocitário mononuclear (DUMLER et al., 2001) e que pertencem a família Anaplasmataceae (ANDEREG; PASSOS, 1999). O gênero *Ehrlichia* compreende atualmente cinco espécies descritas na literatura de bactérias gram negativas, pertencentes à família Ehrlichiae: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewigii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001; MENDONÇA et al., 2005; NAKAGHI et al., 2008).

A *Ehrlichia chaffeensis*, constitui-se como uma bactéria zoonótica gram-negativa intracelular muito encontrada na região da América do Norte e que é mantida em um ciclo complexo envolvendo cervos de cauda branca da espécie *Odocoileus virginianus* como reservatório primário e o carrapato *Amblyomma americanum* atuando como

vetor primário (YABSLEY, 2010). Inicialmente, foi descrita em abril de 1986, quando um médico residente observou no material sanguíneo periférico de um homem gravemente doente algumas inclusões intracitoplasmáticas peculiares em vários monócitos. O paciente descreveu múltiplas picadas de carrapato ocorridas aproximadamente 2 semanas antes, durante uma visita a uma área rural no norte do Arkansas (MAEDA, 1987; FISHBEIN, 1990). Após o isolamento do microrganismo presente nos monócitos, foram desenvolvidos ensaios moleculares para diagnóstico (ANDERSON et al., 1992) e novos casos puderam ser descritos (ANDERSON et al., 1991; FISHBEIN et al., 1994). Isso contribuiu para descrição da *E. chaffeensis*, uma nova espécie causadora dessa zoonose com teor de moderado a grave (PADDOCK AND CHILDS, 2003).

A *Ehrlichia ruminantium* é uma espécie bastante estudada também nas regiões africanas. Causadora da doença conhecida como dríose bovina em bovinos, ovinos, caprinos e algumas espécies de ruminantes silvestres (ALLSOPP, 2010). O período médio de incubação descrito em animais suscetíveis é de menos de 2 semanas (VANDE PYPEKAMP & PROZESKY, 1987). O gado adulto tem uma taxa de mortalidade de até 82% (DU PLESSIS E MALAN, 1987b).

Outra espécie recém-descoberta é a *Ehrlichia minasensis* (ZWEYGARTH et al., 2013; CABEZAS-CRUZ et al., 2016). Há uma semelhança morfológica com a *E. canis* entretanto após a coleta em carrapatos fêmeas no Brasil de *Rhipicephalus microplus* (CABEZAS-CRUZ et al., 2012; ZWEYGARTH et al., 2013) observou-se que era uma nova espécie e por isso, sua descrição foi realizada a pouco tempo.

1.2 Ehrlichia canis

No Brasil, a espécie mais estudada é a *Ehrlichia canis*, responsável pela erliquiose monocítica canina (EMC), doença considerada endêmica em regiões urbanas e também em zonas rurais, por caracterizarem-se como regiões que abrigam grandes populações do carrapato vetor, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (LABRUNA & PEREIRA, 2001). O primeiro relato da presença de *E. canis*, no Brasil, ocorreu em Belo Horizonte, Minas Gerais, por Costa et al. (1973).

A patogênese envolve três fases consecutivas: a) aguda, b) subclínica e c) crônica. A apresentação da sintomatologia clínica pode variar, de acordo com as fases, sendo com frequência observada letargia, anorexia, febre, linfadenomegalia, esplenomegalia, trombocitopenia, distúrbios hemorrágicos e o aumento exarcebado de imunoglobulinas no sangue (HARRUS et al., 2002). A fase aguda tem duração de duas a quatro semanas, sendo durante esse período a multiplicação do microrganismo. Após esse processo, as células infectadas são levadas pela circulação sanguínea para outros órgãos, promovendo vasculite que posteriormente ocasionará a destruição periférica das células-alvo, ou o sequestro das mesmas, levando a uma trombocitopenia e leucopenia (BUHLES et al., 1975). A fase subclínica apresenta sintomas brandos, podendo ocorrer leve perda de peso. É nesta fase que se observa alta concentração de anticorpos para *E. canis* no sangue dos cães infectados (JAIN, 1993). Ao final da fase subclínica, inicia-se a fase crônica devido à ineficácia do sistema imune do animal. Os sintomas são graves, apresentando pancitopenia, glomerulonefrite, hemorragias e aumento da suscetibilidade às infecções secundárias (ANDEREG; PASSOS, 1999). Essa fase assume as características de uma doença autoimune (MENDONÇA et al., 2005).

1.3 *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*

A transmissão de *E. canis* ocorre através do repasto sanguíneo do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l. infectado, o qual se infecta através da picada de um animal atuando como hospedeiro e transmite a bactéria por via transtadiária (ANDEREG; PASSOS, 1999; BREMER et al., 2005). O vetor adulto pode transmitir a doença por mais de 155 dias após desprendimento do hospedeiro (ISOLA et al. 2012).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose canina pode ser realizado através da presença de mórulas nos leucócitos parasitados encontrados na avaliação de esfregaços com amostra sanguínea (MACHADO, 2004; MOREIRA et al., 2005; NAKAGHI et al., 2008), por testes envolvendo a biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (CASTRO et al., 2004; ALVES et al., 2005; NAKAGHI et al., 2008). Uma opção é o teste sorológico do tipo ELISA, ou a técnica de imunofluorescência indireta (IFI)

de anticorpos (RISTIC et al., 1972; ORIÁ, 2001; CASTRO et al., 2004; NAKAGHI, 2004; NAKAGHI et al., 2008). Na presente ocasião, selecionamos o teste de Biologia Molecular, a PCR.

O objetivo então, foi realizar uma PCR para detecção de diversas cepas de *Ehrlichia* spp. advindas de carrapatos e amostra biológica.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O objetivo deste projeto é facilitar o diagnóstico de distintas espécies da bactéria *Ehrlichia* através de um único teste. Optamos por uma Nested-PCR devido ao aumento de sensibilidade que esse teste de biologia molecular recebe quando é realizado dessa maneira.

Apesar do fato de haver vários testes relacionados ao diagnóstico da *Ehrlichia* spp. o uso de um teste com alta confiabilidade de mercado e que representasse um diagnóstico preciso e distintivo entre espécies seria extremamente interessante e bem visto pela área da saúde.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta

As coletas de carrapatos foram realizadas no município de Cumari região do Limoeiro (18°15'S,48°09'W), que se encontra em uma área de transição entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica e possui clima tropical. É considerada uma área de “alta prioridade” para a conservação da biodiversidade. Essa região está localizada no sudoeste de Goiás e abrange propriedades criadoras de gado (*Bos taurus indicus*). Houve coleta também em uma reserva natural (17 ° 46'S e 48 ° 39'O) a 77 km de Cumari, no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas (PESCAN), Estado de Goiás. Esta reserva tem 12.500 ha, com clima similar a região do Limoeiro, mas com resquícios de vegetação do bioma Cerrado (SANO & ALMEIDA, 1998).

A escolha dessa região deve-se ao fato de estar inclusa no Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, coordenado pelo docente da Universidade Federal de Goiás, MSc. Frederico Gemesio Lemos, cujo projeto definiu os pontos de amostragem coincidentes com áreas utilizadas por canídeos selvagens: raposa do campo (*Lycalopex vetulus*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).

Uma amostra de material sanguíneo de cães domésticos advinda do hospital veterinário da UFU (HV) também foi disponibilizada para extração. Trata-se de uma amostra biológica extraída de um canídeo sabidamente positivo para *Ehrlichia* spp.

3.2 Método de captura dos canídeos

A coleta de animais obteve a aprovação pelo Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG; processo número 086/14) e pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU; processo número 089/14).

Os animais selvagens foram então capturados em armadilhas de gaiola localizadas estrategicamente em pontos observados previamente como sendo uma parte do caminho feito pelas espécies estudadas e então, foi realizada a coleta de carrapatos para extração.

Diferentemente dos selvagens, os cães domésticos estudados foram contidos manualmente devido ao fato de possuírem o comportamento menos arisco. Foi então realizada a inspeção visual e a coleta ocorreu manualmente durante o período de aproximadamente 10 minutos.

Os carrapatos coletados foram acondicionados em frascos individuais identificados por carnívoro ou por cão e transportados para o Laboratório de Ixodologia.

3.3 Identificação de carrapatos

Carrapatos adultos e ninfas foram identificados de acordo com chaves dicotômicas descritas anteriormente (MARTINS et al. 2010; ONÓFRIO et al. 2006) e por comparação fenotípica com a coleção de referência do Museu de Carrapatos do Laboratório de Ixodologia da UFU (LABIX).

3.4 Extração de amostra biológica

A extração do material genético ocorreu regida pelo protocolo do kit Wizard® Genomic DNA Purification (disponível em: <https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol>)

Para extração da amostra biológica sanguínea sabidamente positiva para *Ehrlichia* spp. foi feita a separação de 10 µl desse fragmento em um *ependorf* e 30 µl no segundo gerando um limiar de concentrações. A primeira etapa segundo o protocolo Wizard® Genomic DNA Purification foi realizar a lise das células e núcleos através da adição de 600 µl da Nucley Lysis Solution refrigerada e homogeneização em vórtex por 10 s. Após esse procedimento, foi feita a incubação em banho seco durante 15 minutos na temperatura de 65°C e posteriormente, ocorreu a adição de 200 µl de Protein Precipitation Solution. O microtubo passou então por resfriamento em gelo durante 5 minutos e logo após por centrifugação a 14.000 x g por 4 min na temperatura de 24°C. Houve então a transferência do sobrenadante para outro microtubo e adição de 600 µl de isopropanol. Realizou-se então um novo processo de centrifugação seguindo o mesmo parâmetro, durante 1 minuto. O sobrenadante foi então descartado, pois o *pellet* já havia sido formado nessa última centrifugação. Posteriormente, foi realizado o processo de lavagem com 600 µl de álcool 70% que fora então descartado. Desse modo, houve a secagem durante o período de 5 minutos e por fim o acréscimo de 30 µl de TE mod e para solubilização do DNA. A amostra foi estocada no freezer a -20°C para uso nos próximos passos do experimento.

Outra extração ocorreu posteriormente de acordo com Sangioni et al, 2005. Essa iniciou-se com 150 µl de sangue, posteriormente foi adicionado 450 µl de GT, houve então a repetição entre deixar descansar e colocar no vórtex. O próximo passo foi adicionar 100 µl de clorofórmio, foi então colocado no vórtex, centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos, transferir 400 µl da fase aquosa para outro *ependorf* contendo 600 µl de isopropanol, foi então realizada a centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos e desprezado o sobrenadante. Após o descarte, houve a adição de 800 µl de etanol 70% e o procedimento na centrifuga foi repetido dessa vez, durante 10 minutos. Houve o descarte do sobrenadante e após secagem do *pellet*, este foi ressuspendido com TE modificado. A amostra foi então armazenada a -20° para uso no congelador.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras extraídas foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com o primer dsb com o intuito de amplificar as ligações dissulfídicas que a bactéria tem. Foi então realizado o alinhamento de sequências utilizando o sistema Blast da NCBI (disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Os primers selecionados foram o dsb 330, dsb_728 (Doyle et al. 2005) e dsb 380 (Almeida et al. 2013). Entretanto, foram feitas algumas modificações para que a produção destes fosse solicitada, objetivando a otimização na sensibilidade da detecção *Ehrlichia spp.* nesta PCR. Desse modo, foi inserido no código genético do dsb 728 uma sequência do T7t e na sequência do dsb 380 foi incorporada o T7p. Essas amostras encontram-se na tabela 1.

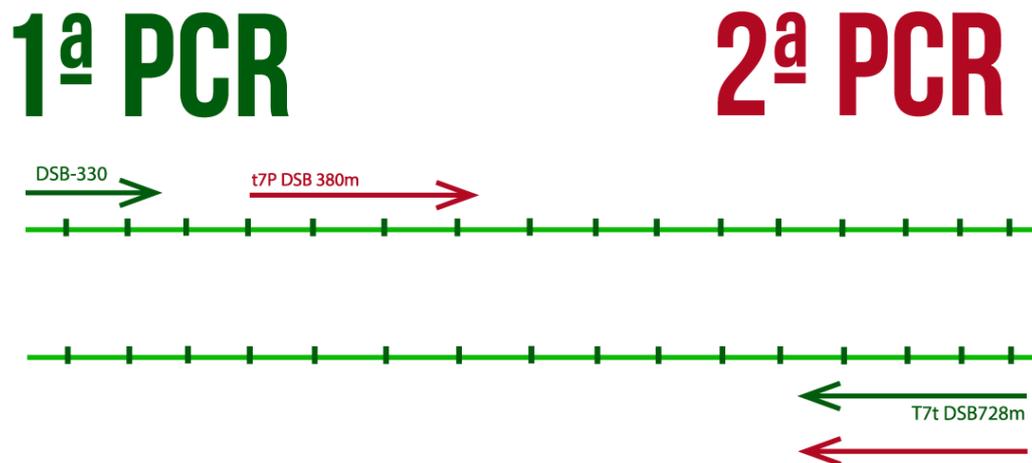


FIG. 1: PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR.

FONTE: IMAGEM AUTORAL

<i>Gene</i>	<i>Primers Foward (f) & Reverse (r)</i>	<i>Sequência 5' - 3'</i>
Dsb	dsb 330 (f)	GAT GAT GTT TGA AGA TAT SAA ACA AAT (Doyle et al. 2005)
	<u>T7t</u> -DSB-728 mod (r)	<u>GCT AGT TAT TGC TCA GCG</u> <u>GCT GCT CRT CTA TTT TAC TTC</u> TTA AAG T
	T7pDSB 380 mod (f)	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> <u>GGA TTT TTA GRG ATT TTC</u> CAA TAC TTG G

Tabela 1. Primers usados em ensaios de PCR para amplificar genes de *Ehrlichia* spp.

A PCR escolhida foi a semi-Nested PCR, já que na segunda PCR apenas um dos primers é trocado. Esse tipo de PCR é caracterizado por ofertar uma maior especificidade e eficácia da reação. Neste tipo, o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, posteriormente, utilizando este primeiro produto, na segunda PCR ocorrerá a amplificação de uma sequência-alvo.

A PCR foi realizada sob as seguintes condições. Primeiro foi feita a mistura e distribuída em cada tubo de PCR a quantidade de 23 μL e mais 2 μL das amostras de DNA das quais se esperavam a amplificação. As amostras foram então levadas até o termociclador que foi configurado do seguinte modo:

- 95°C por 5min
- 35 ciclos de: 94°C por 30 s
- **49°C por 30 s**
- 72°C por 1 min
- 72°C por 7min
- 4°C ∞

Os tubos foram estocados no freezer.

Amplicon da 1ª PCR: 428 pb

A segunda PCR foi então preparada através de uma nova mistura, sendo transferido 24 μL para os microtubos de PCR e mais 1 μL das amostras da 1ª PCR. Essas amostras passaram por diluição 1:10 pois inicialmente no gel de agarose realizado elas demonstraram um arraste de DNA. Na diluição 1:10 coloca-se 9 μL de água na quantidade de tubos de acordo com a PCR e mais 1 μL das amostras. Após a mistura entre esses dois 1 μL dessa amostra foi pipetado na mistura 2.

A 2ª PCR ocorreu então sob as seguintes condições:

- 95°C por 5min
- 35 ciclos de: 94°C por 30 s
- **54°C por 30 s**
- 72°C por 1 min
- 72°C por 7min
- 4°C ∞

Amplicon da semi-NESTED PCR: 376pb

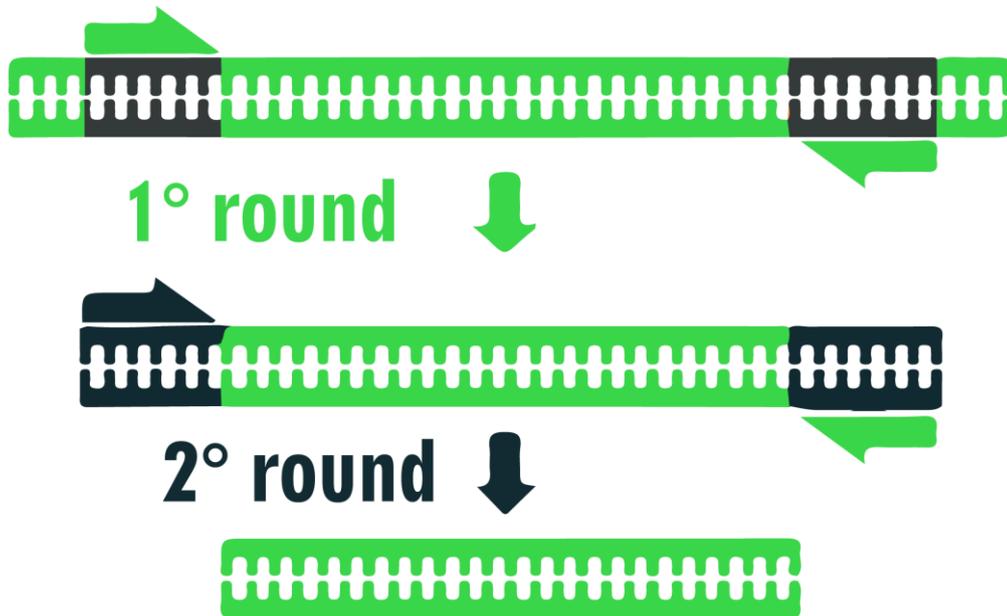


FIG. 2: ESQUEMA DE UMA REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR.

FONTE: IMAGEM AUTORAL

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados alguns testes de PCR, contendo os primers DSB-330, T7t -DSB-728 mod e T7pDSB 380 mod.

Inicialmente selecionamos um controle negativo. Os outros 5 compostos serviriam como controle positivo para testar a extração, sendo respectivamente representados por:

- T1= controle negativo (amostra com água destilada utilizada para biologia molecular);
- T2= amostra biológica DNA 1 extraído em 04/05/2021;
- T3= amostra biológica DNA 2 extraído em 04/05/2021;
- T4= amostra biológica DNA 1 +H2O destilada utilizada para biologia molecular;
- T5= amostra biológica DNA 2 +H2O destilada utilizada para biologia molecular;
- T6= amostra biológica DNA 3, extraído em 16/02/2022.

A amostra de DNA 1 e 2 foram extraídas da amostra sanguínea sob o protocolo da Promega, enquanto a extração do DNA 3 foi realizada sob o protocolo presente em Sangioni et al. 2005. As amostras contendo a terminação “N” são as da semi-NESTED PCR

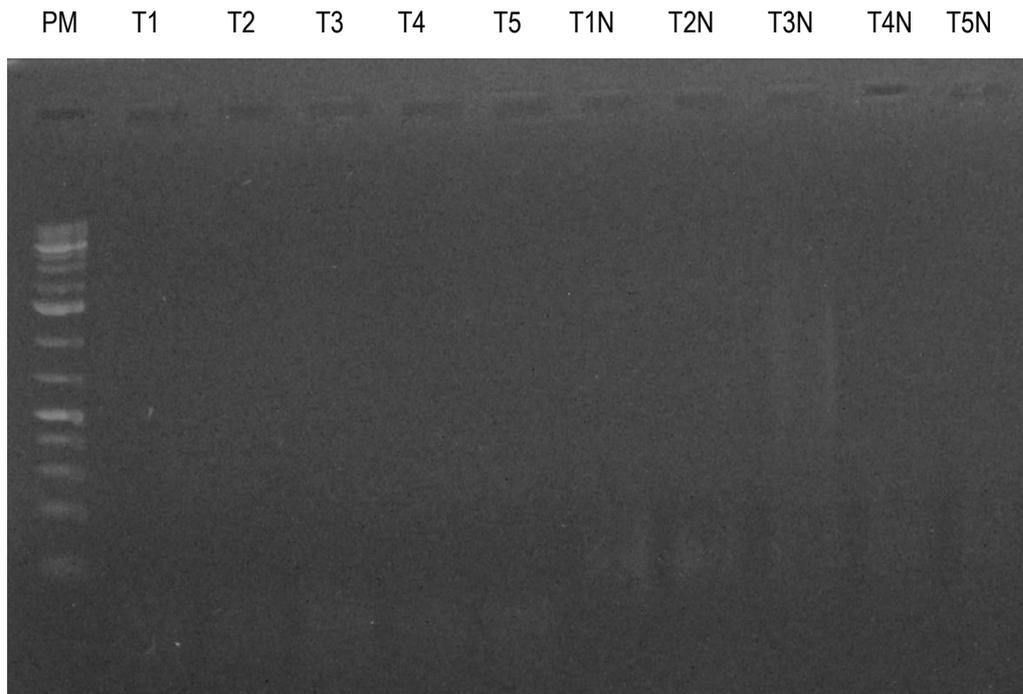


FIG. 3:TESTE DE PCR EM GEL DE AGAROSE.

FONTE: IMAGEM AUTORAL

O resultado demonstrou algumas bandas com arraste de material genético. Na tentativa de solucionar o problema do arraste foi então feita a tentativa de diluição dos próximos experimentos.

Uma nova tentativa de repetição do experimento foi então realizada, por meio da diluição 1:10. Esse método funciona através da pipetagem de 9 μ l de água mais 1 μ l de amostra da primeira PCR em 4 *eppendorfs* respectivamente e após mistura, é colocado na segunda mistura que posteriormente servirá para o processo de semi-NESTED PCR.

Nessa ocasião usamos apenas 4 *eppendorfs* para realização da PCR e utilizamos um controle negativo a mais para testar as extrações feitas no dia 04/05/2021.

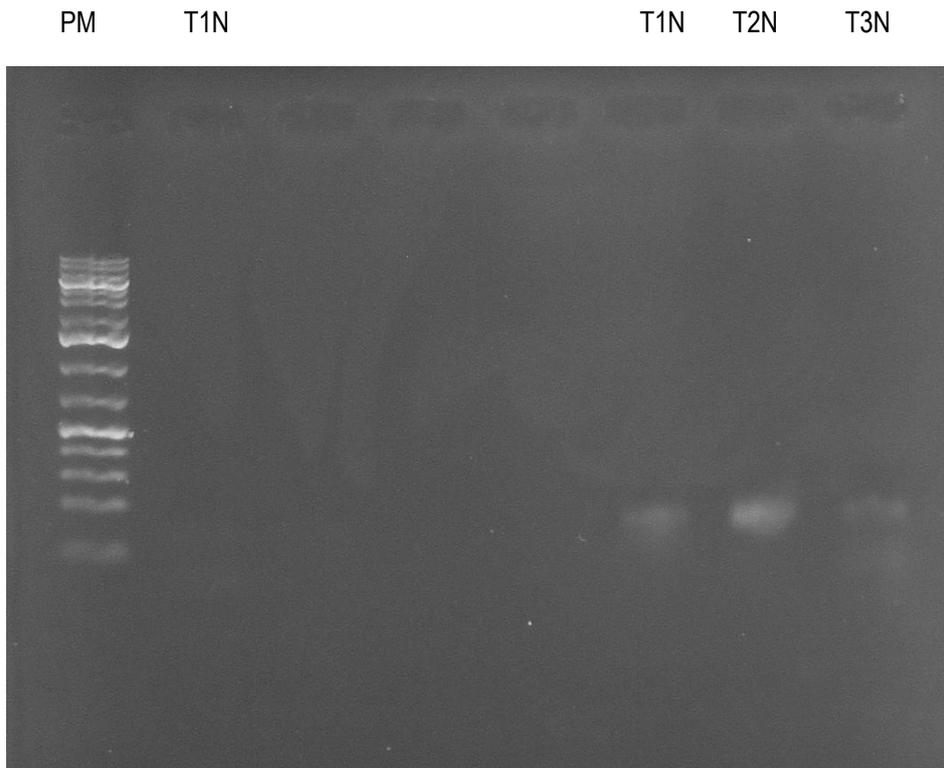


FIG. 4:TESTE DE PCR EM GEL DE AGAROSE.

FONTE: IMAGEM AUTORAL

Nessa semi-NESTED PCR o teste se demonstrou como falho pois o tamanho das bandas dos controles positivos não estiveram de acordo com a *Amplicon* da semi-NESTED PCR de 376pb. Além disso, o espaçamento entre as amostras ocorreu por um erro de execução, tendo em vista que os compostos pipetados nos poços próximos não decantaram e então houve a pipetagem com um maior distanciamento entre as amostras. Por esses motivos, optamos por realizar uma nova tentativa.

Durante essa nova tentativa foi feita uma terceira extração da amostra biológica sanguínea representada por T6. Essa extração ocorreu sob o protocolo de Sangioni et. al. 2005.

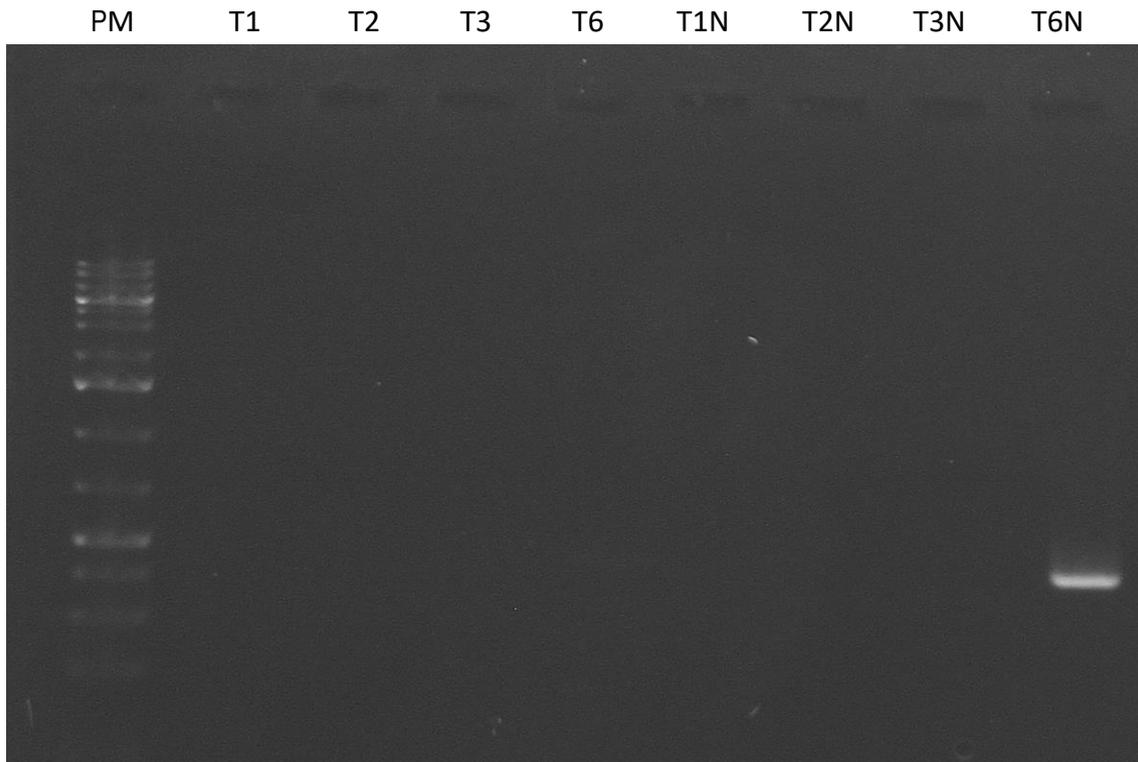


FIG. 5:TESTE DE PCR EM GEL DE AGAROSE.

FONTE: IMAGEM AUTORAL

O resultado dessa vez foi próximo ao esperado já que o *Amplicon* da semi-NESTED PCR se aproximou de 376 pb, porém precisávamos confirmar se esse seria mesmo o nosso controle positivo e então outra repetição ocorreu utilizando as extrações feitas na região de Cumari.

Essa PCR contou então com 5 compostos extraídos tiveram sua origem a partir de amostras de carrapatos provenientes do município Cumari e mais os outros 3 compostos extraídos da amostra biológica sanguínea sabidamente positiva para *Ehrlichia* spp.

Os compostos advindos da região de Cumari foram identificados da seguinte forma:

- T7: CT(C4) +H2O destilada utilizada para biologia molecular;
- T8: CB 02 +H2O destilada utilizada para biologia molecular;
- T9: LV06 +H2O destilada utilizada para biologia molecular;
- T10: CT16 +H2O destilada utilizada para biologia molecular;
- T11: CT 02 +H2O destilada utilizada para biologia molecular.

Em que, respectivamente:

- CT= *Cerdocyon thous* ou cachorro do mato
- CB = *Chrysocyon brachyurus* ou Lobo-Guará

- LV= *Lycalopex vetulus* ou Raposinha

Nomenclatura	Espécie de carrapato	Data de extração
CT(C4)	<i>A. sculptum</i>	17/03/2016
CB02	<i>A. sculptum</i>	17/03/2016
LV06	<i>R. microplus</i>	17/03/2016
CT16	<i>A. sculptum</i>	17/03/2016
CT02	<i>A. sculptum</i>	17/03/2016

Tabela 2. Amostras da região de Cumari, Goiás, utilizadas para amplificação em gel de agarose.

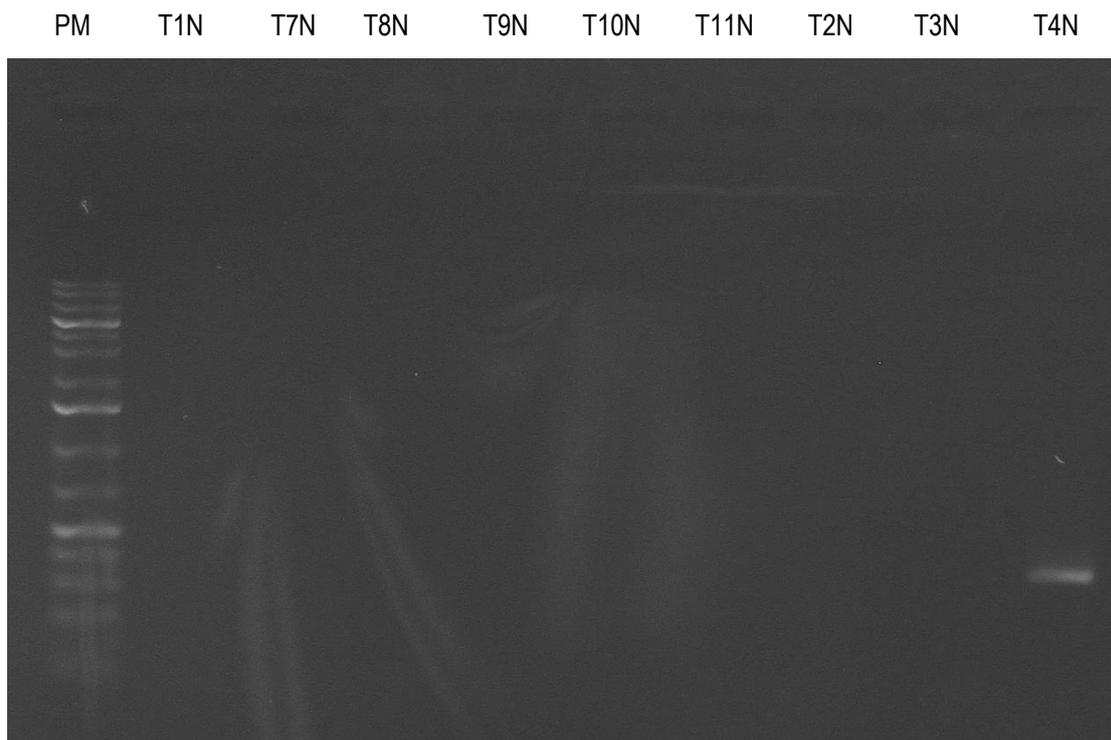


FIG. 6:TESTE DE PCR EM GEL DE AGAROSE.

FONTE: IMAGEM AUTORAL

O resultado, não demonstrou nenhuma banda relativa as extrações realizadas no município de Cumari o que era esperado, pois essas amostras haviam sido descritas como negativas para *Ehrlichia* spp. Apenas a banda advinda da extração do dia

16/02/2022 apareceu, enquanto na PCR anterior ela não havia aparecido, tornando o resultado inconclusivo.

5 CONCLUSÃO

O que ficou explícito nesse projeto foi que muito provavelmente com mais amostras de DNA de carrapatos haveria a obtenção de um resultado próximo ao esperado que seria a amplificação com tamanho aproximado de 376pb. As amostras escolhidas da região de Cumari, Goiás, demonstraram o resultado esperado pois não amplificaram e essas amostras haviam sido reconhecidas anteriormente como negativas para *Ehrlichia* spp.

Por isso, acredito que tivemos um resultado promissor no desenvolvimento de um método que possibilite a detecção de variadas cepas de *Ehrlichia* spp.

REFERÊNCIAS

ALLSOPP, B. A. (2010). Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), 123–135. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.09.014>

ALMEIDA, A.P., SOUZA, T.D., MARCILI, A., LABRUNA, M.B., 2013. Novel *Ehrlichia* and Hepatozoon agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. *J. Med. Entomol.* 50 (3), 640–646.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Eriquiiose canina: revisão. *Clínica Veterinária*, v. 4, n. 18, p. 31-38, 1999.

ANDERSON, B. E.; DAWSON, J. E.; JONES, D. C.; WILSON, K. H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 12, p. 2838-2842, 1991.

ANDERSON, B. E.; SUMNER, J. W.; DAWSON, J. E.; TZIANABOS, T.; GREENE, C. R.; OLSON, J. G.; FISHBEIN, D. B.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; HOLLOWAY, B. P.; GEORGE, E. H.; AZAD, A. F. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 4, p. 775-780, 1992b

BALASHOV, Yu S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)—vectors of diseases of man and animals. Entomological Society of America, 1972.

BREMER, W. G.; SCHAEFER, J.J.; WAGNER, E.R.; EWING, S.A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D.L.; STICH, R.W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v. 131, n. 1-2, p.95-105, 2005.

BUHLES Jr, W.C.; HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.- Tropical canine pancytopenia: Role of aplastic anaemia in the pathogenesis of severe disease. *J. Comp. Path.*, 85: 511-21, 1975.

CABEZAS CRUZ, A. et al. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasites & Vectors*, v5, p. 291, 2012.

CABEZAS-CRUZ A. et al. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., a new species within the genus *Ehrlichia* isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016.

CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.C.T.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, 2004.

CLEAVELAND, S.; MLENGEYA, T.; KAARE, M.; HAYDON, D.; LEMBO, T.; LAURENSEN, M.K. & PACKER, C. 2007. The conservation relevance of epidemiological research into carnivore viral diseases in the serengeti. *Conservation Biology*, 21: 612-622

COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. *Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, v. 25, p. 199-200, 1973.

DIAS E., MARTINS A.V., 1939. Spotted fever in Brazil. A summary. *Am J Trop Med*. 19:103--108.

DOYLE C.K., LABRUNA M.B., BREITSCHWERDT E.B., TANG Y.W., CORSTVET R.E., HEGARTY B.C., BLOCH K.C., LI P., WALKER D.H., MCBRIDE J.W.. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *J Mol Diagn*. 2005 Oct;7(4):504-10. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60581-8. PMID: 16237220; PMCID: PMC188849

DU PLESSIS, J. L. et al. The non-specific resistance of cattle to heartwater. 1987

DUMLER, J. Stephen et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

FISHBEIN, D. B. 1990. Human ehrlichiosis in the United States, p. 100-111. *In* J. C. Williams and I. Kakoma (ed.), *Ehrlichiosis*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

FISHBEIN, D. B.; DAWSON, J. E.; ROBINSON, L. E. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Annals of Internal Medicine*, v. 120, n. 9, p. 736-743, 1994.

HARRUS, S., ALLEMAN, A.R., BARK, H., MAHAN, S.M., WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*, v.86, p. 361–368, 2002.

ISOLA, J. G. M. P.; CADIOLI, Fabiano Antonio; NAKAGE, Ana Paula. Erliquiose canina–revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 18, p. 1-11, 2012.

LABRUNA, Marcelo B.; PEREIRA, M. Campos. Carrapato em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, v. 30, n. 1, p. 24-32, 2001.

MAEDA, K., N. MARKOWITZ, R. C. HAWLEY, M. RISTIC, D. COX, AND J. E. MCDADE. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* 316:853-856.

MACHADO, R.Z. Erliquiose Canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.13, supl.1, 2004.

MAILLARD, J.C., MAILLARD, N., 1998. Historique du peuplement bovin et de l'introduction de la tique *Amblyomma variegatum* dans les îles françaises des Antilles: Synthèse bibliographique. *Ethnozootecnie* 1, 19–36.

MARTINS, T.F., PERES, M.G., COSTA, F.B., BACCHIEGA, T.S., APPOLINARIO, C.M., ANTUNES, J.M.A.P., ALLENDORF, S.D., VICENTE, A.F., MEGID, J., LABRUNA, M.B., 2015. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild small rodents (Rodentia: Cricetidae) in three areas of the state of São Paulo, Brazil. *Ciênc. Rural* (in press).

MCCALLUM, Hamish; DOBSON, Andy. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in ecology & evolution*, v. 10, n. 5, p. 190-194, 1995.

MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Erliquiose Canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. *Bioscience Journal*. v.21, n.1, p.167-174, 2005.

MORAES-FILHO J. Febre maculosa brasileira. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 15, n. 1, p. 38-45, 1 jan. 2017.

MOREIRA, S.M. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Ciência Rural*. v.35, n.4, p.958-960, 2005.

MURRAY, D.L.; KAPKE, C.A.; EVERMAN, J.J. & FULLER, T.K. 1999. Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *Animal Conservation*, 2: 241-254.

NAKAGHI, A.C.H. Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de *Ehrlichia canis* em cães com suspeita clínica de erliquiose. 2004. 63F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração: Patologia Animal) – FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*. v.38, n.3, p.766-700, 2008.

ONÓFRIO, V.C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F.G.; BARROS-BATTESTI, D.M. Comentários e chaves para as espécies de *Amblyomma*. In: BARROS-BATTESTI, D.M. ARZUA, M.; BECHARA, H.G. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 1. ed. São Paulo/BR: Vox /ICTTD-3/ Butantan, 2006. cap. 6, p.53- 71.

PADDOCK, CHRISTOPHER D.; CHILDS, JAMES E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clinical microbiology reviews*, v. 16, n. 1, p. 37-64, 2003.

PIZA J.T., MEYER J.R., GOMES L.S., 1993. Typho exantemático de São Paulo. São Paulo: Sociedade Imprensa Paulista.

SANGIONI, Luis A. et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 2, p. 265, 2005.

SANO SM, ALMEIDA SD. 1998. Cerrado: environment and flora. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados

VAN DE PYPEKAMP, H. E.; PROZESKY, L. Heartwater. An overview of the clinical signs, susceptibility and differential diagnoses of the disease in domestic ruminants. 1987.

ZWEYGARTH, E. et al. In vitro culture of a novel genotype of Ehrlichia sp. from Brazil. Transboundary and Emerging Diseases, v. 60, p. 86-92, 2013.

YABSLEY, Michael J. Natural history of Ehrlichia chaffeensis: vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries. Veterinary parasitology, v. 167, n. 2-4, p. 136-148, 2010.

WOODROFFE, R. 1999. Managing disease threats to wild mammals. Animal Conservation, 2: 185-193.