

Tipificación de *Ehrlichia canis* por secuenciación del gen dsb en perros naturalmente infectados de las provincias de Chaco y Corrientes, Argentina.

Área del Conocimiento: Ciencias Agropecuarias

Becario/a: M.V. MANSILLA FERNÁNDEZ, Silvia Lorena

Director: Dr. MERINO, Luis

Co Directora: Dra. KOSCINCZUK, Patricia

Facultad: Facultad de Ciencias Veterinarias

E-mail: sl_mansilla@hotmail.com

Objetivo

Confirmar la presencia de *Ehrlichia canis* en muestras de sangre de perros con sintomatología compatible con ehrlichiosis monocítica canina (EMC) de las provincias de Chaco y Corrientes por diagnóstico molecular y posterior secuenciación del gen 16S comparando la secuencia obtenida con diferentes aislados encontrados en Argentina.

Materiales y Método

Recolección de muestras: Se recolectaron 3 ml de sangre anticoagulada con EDTA (0,342 mol/l de sales sódicas y potásicas de ácido etilendiaminotetraacético) de caninos sospechosos de EMC de las ciudades de Resistencia, Barranqueras de la provincia de Chaco y Corrientes capital y zonas aledañas de la provincia de Corrientes. Los meses de muestreo se determinaron en función al vector, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Cicuttin et al, 2016).

Extracción de ácidos nucleicos: Se utilizó un método comercial de extracción por columnas (Roche), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se implementó un doble control de calidad de extracción ADN, por espectrofotometría UV (Nanodrop lite) y un control genómico (Peleg, 2010).

Detección molecular: Se realizó la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para detección de patógenos de la familia Anaplasmataceae utilizando primers 16S GE2'F2 HE3 (Monje et al., 2019) y *Ehrlichia* sp. utilizando primers dsb 330/728 (Doyle et al., 2005) (Aguar et al., 2007) (Figura 1). La detección de las bandas de amplificación se hizo por corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% (Figura 2).



Figura 1: Preparación de reactivos para amplificar gen dsb por PCR convencional



Figura 2: Siembra de amplificadores para corrida electroforética.

Secuenciación de amplicones: Los fragmentos amplificados y purificados se están estudiando en un trabajo en conjunto entre el laboratorio de Bacteriología del Instituto de Medicina Regional (UNNE) y el laboratorio de Ecología de Enfermedades, el ICIVET Litoral y la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (EEA Rafaela), del centro Regional Santa Fe del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

Resultados

Se procesó un total de 175 muestras de caninos con sintomatología clínica compatible de EMC en el período comprendido entre junio de 2019 y julio de 2020. Resultaron positivas por PCR 14 a *Ehrlichia* sp (Figura 3). Se detectó una tasa de positivos del 8% y las secuencias en estudio representan el 22% de la tasa de positivos.



Figura 3: Visualización de los amplificadores en trasluminador UV. La primera columna es el marcador de peso molecular, desde el pocillo N°3 corrió por el gel una muestra positiva a EMC. En el pocillo N°7 se depositó el control negativo y en el N° 8 el control positivo.

Se seleccionaron al azar 3 muestras, las cuales se secuenciaron en un trabajo en conjunto con el ICIVET-Litoral y la EEA Rafaela-INTA. Estas secuencias se compararon con secuencias depositadas en el GenBank del NCBI. El análisis realizado a la fecha muestra que las secuencias encontradas en perros naturalmente infectados de las provincias de Chaco y Corrientes se corresponden en un 100% con secuencias de dsb de *E. canis* aisladas de perros en Argentina (Figura 4).

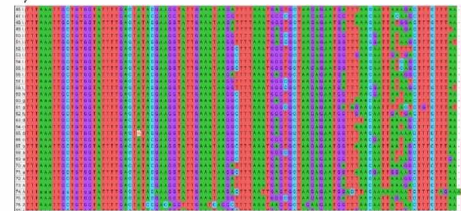


Figura 4: Imagen capturada de Mega X software, herramienta utilizada en el proceso de alineación de secuencias.

Discusión y conclusión

El gen dsb es apropiado para el diagnóstico, pero su carácter conservado no permite la diferenciación genética de las diferentes cepas dentro de la especie, es por ello que se analiza incluir en el estudio genes con mayor polimorfismo para evidenciar variaciones genéticas intraespecíficas.

La búsqueda de variaciones genéticas asociada a la presentación clínica de los pacientes incluidos en el estudio nos permitirá evaluar la virulencia de la cepa infectante de *E. canis* en la región.