



## **XXVI Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**

Orden Poster: CA-065 (ID: 2171)

**Autor: Mansilla Fernandez, Silvia Lorena**

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

Director: Merino, Luis Antonio

Palabras clave: Ehrlichia canis, PCR, secuenciación de ADN, perros

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Conicet

Periodo: 01/04/2021 al 01/04/2023

Lugar de trabajo: Imr - Instituto De Medicina Regional

Proyecto: (17B002) Enfermedades transmitidas por vectores, gamapatías mono y policlonales, identificación del agente causal en medicina veterinaria.

### **Resumen:**

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es causada por Ehrlichia canis, una bacteria gran negativa intracelular obligada (Rickettsiales, Anaplasmataceae) de importancia en salud animal por ser considerada de alta mortalidad en caninos domésticos. La presentación de esta patología está ligada a la distribución del vector, las garrapatas Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.). El diagnóstico oportuno de la enfermedad es un desafío debido a las diferentes fases con que cursa la patología y sus múltiples manifestaciones clínicas. El diagnóstico de EMC se basa en la visualización de la mórula dentro del monocito y el uso de inmunoensayo enzimático; sin embargo, las herramientas moleculares como la PCR y secuenciación posterior del amplicón resultante han sido utilizadas exitosamente para caracterizar al agente etiológico. El objetivo del siguiente trabajo fue confirmar la presencia de Ehrlichia canis por diagnóstico molecular y posterior secuenciación del gen 16S para compararlos con diferentes aislados encontrados en Argentina. Se recolectaron muestras de sangre anticoagulada con EDTA (200µl de sangre con 0,342 mol/l de sales sódicas y potásicas de ácido etilendiaminotetraacético) de perros con sintomatología compatible con EMC naturalmente infectados de las provincias de Chaco y Corrientes. Se utilizó un método comercial de extracción de ADN por columnas (Roche) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se implementó un control de calidad de extracción ADN de doble testeo, utilizando un espectrofotómetro UV (Nanodrop lite) y un control genómico correspondiente a ADN canino para verificar la viabilidad del material extraído y purificado. Se realizó la técnica PCR convencional para detección de patógenos de la familia Anaplasmataceae utilizando primers 16S GE2´F2 HE3 y Ehrlichia sp. utilizando primers dsb 330/728 con el cual se obtuvo un amplicón de 400 pb. La detección de las bandas de amplificación se hizo por corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5%. Los fragmentos dsb amplificados y purificados fueron enviados a la unidad de genómica del INTA Castelar. Se procesó un total de 175 muestras en el período comprendido entre junio de 2018 y julio de 2020, de las cuales 14 fueron diagnosticadas como positivas por PCR a Ehrlichia sp. y 3 fueron seleccionadas para secuenciación. Se detectó una tasa de positivos del 8%, las muestras secuenciadas hasta la fecha representan el 22% del total de positivos diagnosticados por PCR. Estas secuencias se compararon con secuencias depositadas en el GenBank del NCBI. El análisis realizado muestra que las secuencias encontradas se corresponden en un 100% con secuencias de dsb de E. canis aisladas de perros en Argentina, Brasil, Estados Unidos y Colombia (Nº Genbank: KU253450, GU586135, CP000107, MK783026). No se observaron diferencias entre las secuencias del gen dsb, el cual es apropiado para el diagnóstico, pero su carácter conservado no permite la diferenciación genética de las diferentes cepas dentro de la especie. Una vez terminada esta etapa de análisis de construirá un árbol de máxima verosimilitud (ML) para finalizar el estudio filogenético. 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.