

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIA FERNANDA CHIARI

**NOVA METODOLOGIA DE DIAGNÓSTICO PARA *EHRlichia canis*:
PCR X LAMP**

São Carlos
2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Maria Fernanda Chiari

**NOVA METODOLOGIA DE DIAGNÓSTICO PARA *EHRlichia canis*:
PCR X LAMP**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

*Orientação: Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior
Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira*

**São Carlos
2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C532nm

Chiari, Maria Fernanda.

Nova metodologia de diagnóstico para *Ehrlichia canis* :
PCR X LAMP / Maria Fernanda Chiari. -- São Carlos :
UFSCar, 2010.

71 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. *Ehrlichia canis*. 3. LAMP. 4. Reação
em cadeia de polimerase. 5. Diagnóstico molecular. I. Título.

CDD: 660.6 (20ª)

Maria Fernanda Chiari

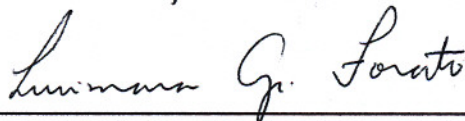
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 30/07/2010

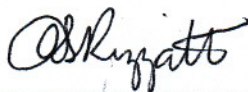
BANCA EXAMINADORA



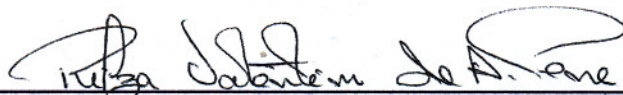
Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos – DGE/UFSCar



Prof. Dra. Lucimara Aparecida Forato
EMBRAPA



Dra. Ana Carolina Segato Rizzatti
(AFRENTE ASSESSORIAS)



Prof. Dra. Rilza Valentim de Almeida Pena
(Prefeitura Municipal de São Francisco do Conde/BA)

“DÊ-ME UMA ALAVANCA LONGA
O BASTANTE E, COM UMA DAS
MÃOS MOVEREI O MUNDO”

[Arquimedes]

Aos meus pais Anésio e Beth, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha saúde e de minha família.

À minha mãe Elisabeth, meu pai Anésio e meus irmãos Aline e Denilson, pelo amor, carinho, compreensão, pelo apoio psicológico, financeiro e emocional. Amo muito vocês, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada.

Ao meu marido Gustavo, pelo apoio, pela paciência, pela amizade, carinho e muito amor, que me ajudou superar muitos obstáculos. Obrigada, te amo.

Ao meu orientador, professor e amigo Dr. Euclides Matheucci Junior. Essas páginas não representam nem a metade do que aprendi com você. Muito obrigada.

Às minhas amigas Monica, Rachel e Roberta, por todos os anos de companheirismo, de risadas e histórias pra contar, pelos conselhos, pelo carinho, e por nunca terem me abandonado. Amo vocês.

À minha amiga em Renata, por me ensinar a ter força de vontade, por me ensinar a nunca desistir, por me ensinar dar valor até aos pequenos passos. Toda vez que pensei em desistir pensei em você, e continuei. Obrigada. Te amo.

Às clínicas veterinárias que foram essenciais na produção deste trabalho, obrigada.

Aos meus amigos de laboratório Bruno, Evandro, Gisele, Fábio, Drica, André e Milena pela ajuda, pela troca de experiências, pela paciência e pela descontração. Aprendi muito com vocês, espero ter ajudado vocês também. Obrigada.

À todos os meu amigos da pós-graduação. Foi muito bom estar com vocês.

À Claudia, secretária da Biotecnologia, pela boa vontade e paciência.

À Dra. Daniella Tambasco Talhari, ao Dr. Marcelo Cervine e Adriana Medaglia.
Obrigada.

À CAPES e à Qgene pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

CHIARI, M. F. **NOVA METODOLOGIA DE DIAGNÓSTICO PARA *EHRlichia CANIS*: PCR X LAMP**. 2010. 71f. Monografia (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

RESUMO

Devido à estreita relação entre o homem e o cão, eventualmente alguns ectoparasitas de cães podem ser observados parasitando o homem. O carrapato *Rhipicecephalus sanguineus* é um ectoparasita que possui a capacidade de carregar e transmitir patógenos aos seres humanos. Esse artrópode, por exercer hematofagia, é o principal vetor biológico e reservatório da bactéria *Ehrlichia canis*. Atualmente, o diagnóstico da erliquiose é baseado em testes hematológicos, bioquímicos e sorológicos, embora sejam pouco confiáveis para diagnóstica-lá, uma vez que suas características clínicas e clinicopatológicas são amplamente inespecíficas. As tetraciclinas são comumente utilizadas no tratamento da Erliquiose, mas estudos mostram que alguns cães permanecem soropositivos para *E. canis* após o tratamento ou após a perda da infecção espontânea. A Erliquiose crônica por ter falhas de prognóstico, pode resultar em alta mortalidade. Portanto, testes mais sensíveis e confiáveis poderão auxiliar na seleção de cães portadores. A PCR (reação em cadeia da polimerase) tem sido usada com sucesso no diagnóstico da bactéria *E. canis*. Entretanto, esta tecnologia molecular necessita de equipamentos caros e pessoal especializado para sua execução, o que limita o seu uso na rotina dos laboratórios. Assim uma metodologia mais sensível, específica, e simples de detectar o microorganismo é desejável. Neste trabalho desenvolvemos a detecção da bactéria *Ehrlichia canis* pela técnica de LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), que se mostrou muito eficaz. Utilizamos sequências específicas do gene *dsb* (*disulfide bond*) de *E. canis* como alvo para as técnicas testadas. O gene *dsb* mostrou-se altamente específico para a detecção de *E. canis*, já que é divergente até mesmo das bactérias filogeneticamente próximas. Os testes moleculares realizados mostram uma incidência maior da doença do que aquela preconizada por autores que utilizam técnicas diagnósticas tradicionais. No canil municipal, 80% das amostras estavam infectadas; das clínicas particulares e do hospital veterinário 40% apresentaram a doença pela técnica de PCR. A técnica de diagnóstico por LAMP que foi desenvolvida é mais sensível do que o PCR, altamente específica e não é necessária a extração do DNA para a sua amplificação. Além disso, o produto da amplificação pode ser visualizado a olho nu. Concluímos que o diagnóstico pela metodologia LAMP possibilita a identificação específica e com alta sensibilidade de animais infectados, com mínima estrutura laboratorial. Tais fatores viabilizam a utilização dessa metodologia diagnóstica para clínicas veterinárias, laboratórios e instituições de ensino.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*. *Rhipicecephalus sanguineus*. Diagnóstico Molecular. PCR. LAMP. DNA.

CHIARI, M. F. **NEW METHOD OF DIAGNOSTICS FOR *Ehrlichia canis*: PCR X LAMP**. 2010. 71f. Monografia (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

ABSTRACT

Because the close relationship between men and dogs, possibly some ectoparasites of dogs can be observed parasitizing man. The tick *Rhipicephalus sanguineus* is an ectoparasite that has the ability to carry and transmit pathogens to humans. This arthropod, that is blood-feeding, is the main biological vector of the bacteria *Ehrlichia canis*. Currently, the diagnosis of this disease ehrlichiosis is based on blood, biochemical and serological tests, although they are unreliable for diagnosing the disease, since their clinical and clinicopathological features are largely nonspecific. Tetracyclines are commonly used in the treatment of ehrlichiosis, but studies show that some dogs remain positive for *E. canis* after treatment or after the loss of spontaneous infection. The chronic ehrlichiosis, having high prognosis fails, can result in high mortality. Therefore, more sensitive and reliable tests may help in the selection of dog carrying the disease. The PCR (polymerase chain reaction) has been used successfully in the diagnosis of *E. canis*. However, this molecular technology requires expensive equipment and specialized personnel to handle, which limits its use in laboratories' routines. A more sensitive, specific, and simple to detect the microorganism method is desirable. In this work we develop the technique for detection of the bacterium *Ehrlichia canis* using the LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), which proved being very effective. Specific sequences of the *E. canis dsb* gene (disulfide bond) were used as target for the tested techniques. Dsb gene was highly specific in order to detect *E. canis*, since it is divergent of phylogenetically similar bacteria. Performed molecular tests showed a disease incidence greater than that indicated by authors using traditional diagnostic techniques. In the public kennel, 80% of the samples were infected, while in private clinics and veterinary hospital 40% had the disease. The developed diagnostic technique using LAMP is more sensitive than PCR, highly specific and does not require the prior DNA extraction to amplification. In addition, the product of amplification can be seen with the naked eye. We conclude that the diagnosis by the LAMP method enables the specific and high sensitivity identification of infected animals with minimal laboratory settings. These factors make possible the use of this diagnostic methodology for veterinary clinics, laboratories and educational institutions.

Keywords: *Ehrlichia cani*. *Rhipicephalus sanguineus*. Molecular Diagnostics. PCR. LAMP. DNA.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** ACESSO GENBANK ONDE FOI DEPOSITADA A SEQUÊNCIA GENÔMICA DE *EHRlichia canis*.----- 32
- FIGURA 2:** PARTE DA SEQUÊNCIA DO GENOMA DE *EHRlichia canis*, ONDE ESTÃO DESTACADOS OS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO POR PCR. NO INÍCIO DA FIGURA TEMOS A IDENTIFICAÇÃO ATRIBUÍDA PELO GENBANK PARA O ACESSO DA SEQUÊNCIA. ----- 33
- FIGURA 3:** ACESSO GENBANK ONDE FOI DEPOSITADA A SEQUÊNCIA GENÔMICA DE *canis lupus familiaris*. ----- 34
- FIGURA 4:** PARTE DA SEQUÊNCIA DO GENOMA DE *canis lupus familiaris*, ONDE ESTÃO DESTACADOS OS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO CONTROLE DE REAÇÃO POR PCR. NO INÍCIO DA FIGURA TEMOS A IDENTIFICAÇÃO DADA PELO GENBANK QUE DÁ ACESSO A SEQUÊNCIA. ----- 35
- FIGURA 5:** A FIGURA MOSTRA O DESENHO DOS QUATRO INICIADORES: FIP, F3, BIP E B3, QUE SÃO REALIZADOS A PARTIR DE SEIS DISTINTAS REGIÕES DA SEQUÊNCIA ALVO: F3C, F2C E F1C PRESENTES NA EXTREMIDADE 3' , E B1, B2 E B3 NA EXTREMIDADE 5' (TARGET DNA = DNA ALVO). ----- 37
- FIGURA 6:** ESTRUTURA FORMADA APÓS OITO PASSOS SUCESSIVOS DE REAÇÃO, NA ETAPA NÃO-CÍCLICA, COM GRAMPOS NAS EXTREMIDADES 3' E 5'. ESTA ESTRUTURA SERVE COMO MOLDE PARA A AMPLIFICAÇÃO CÍCLICA PROPRIAMENTE DITA. ----- 38
- FIGURA 7:** PRINCÍPIOS DE AMPLIFICAÇÃO POR LAMP. ETAPA NÃO-CÍCLICA [1 - 8]: INICIALMENTE, A ATIVIDADE DA *BST* DNA POLIMERASE AJUDA NA SÍNTESE DE UMA FITA DE DNA COMPLEMENTAR, A COMEÇAR PELO INICIADOR FIP. O INICIADOR EXTERIOR F3, EM SEGUIDA, DESLOCA O FIP LIGADO A CADEIA COMPLEMENTAR, QUE CONSTITUI UMA ESTRUTURA-HASTE DE LOOP NO FINAL 5'. ESTA ESTRUTURA SERVE COMO MODELO

PARA O INICIADOR BIP INICIAR A SÍNTESE DE DNA E SUBSEQUENTEMENTE O INICIADOR B3 INICIA O DESLOCAMENTO DA FITA. O PRODUTO FINAL É UMA ESTRUTURA EM FORMA DE HALTERES EM AMBAS AS EXTREMIDADES, QUE ESTÁ PRONTO PARA ENTRAR NA ETAPA DE AMPLIFICAÇÃO CÍCLICA (EIKEN CHEMICAL CO.LTD). ----- 39

FIGURA 8: AS SEIS FIGURAS ACIMA ILUSTRAM A ETAPA CÍCLICA DA REAÇÃO DE LAMP, ONDE É DEMONSTRADO DESDE O ENCAIXE DO PRIMEIRO INICIADOR FIP [A] DESTA ETAPA, ATÉ O RESULTADO DESTE PROCESSO, ONDE TEMOS VÁRIAS ESTRUTURAS QUE SE REPETEM ALTERNADAMENTE, MÚLTIPLAS DA ESTRUTURA INICIAL EM FORMA DE GRAMPO DUPLO [E]. ----- 40

FIGURA 9: PRINCÍPIOS DE AMPLIFICAÇÃO POR LAMP. ETAPA CÍCLICA [9 - 11]: ETAPA EXPONENCIAL EMPREGANDO OS INICIADORES LOOP INTERNOS. COMO RESULTADO DESTE PROCESSO, TEMOS VÁRIAS ESTRUTURAS QUE SE REPETEM ALTERNADAMENTE, MÚLTIPLAS DA ESTRUTURA INICIAL DE GRAMPO DUPLO (EIKEN CHEMICAL CO.LTD). ----- 41

FIGURA 10: INFORMAÇÕES CEDIDAS PELO SOFTWARE INICIADOR EXPLORER V4, DISPONÍVEL EM: ([HTTP://INICIADOREXPLORER.JP/E/](http://iniciadorexplorer.jp/e/)). --- 42

FIGURA 11: FOTO DO GEL DE QUANTIFICAÇÃO, MOSTRANDO QUATRO AMOSTRAS EXTRAÍDAS PELO PROTOCOLO MODIFICADO DE BRAZOL, MOSTRANDO A EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE ALTA MASSA MOLECULAR, NÃO DEGRADADO, ONDE AS AMOSTRAS POSSUEM UM VALOR APROXIMADO DE 300, 500, 200, 350 NG DE DNA/ μ L RESPECTIVAMENTE. GEL DE AGAROSE 1,0% CORADO COM GELRED - BIOTIUM® E VISUALIZAÇÃO EM TRANSILUMINAÇÃO ULTRAVIOLETA. ---- 44

FIGURA 12: A AMOSTRA QUANTIFICADA EM NANODROP, MOSTRANDO UM GRADIENTE COM A TÉCNICA DE PCR, ONDE É POSSÍVEL SE DIAGNOSTICAR A ERLIQUIOSE EM ATÉ 10PG DE DNA TOTAL. 1KB= MARCADOR DE MASSA MOLECULAR INVITROGEN®. GEL DE AGAROSE 1,5%, CORADO COM GELRED - BIOTIUM® E VISUALIZAÇÃO EM TRANSILUMINAÇÃO ULTRAVIOLETA. ----- 48

FIGURA 13: GEL DE AGAROSE 1,5% CORADO COM GELRED - BIOTIUM® COM VISUALIZAÇÃO EM TRANSILUMINAÇÃO ULTRAVIOLETA, MOSTRANDO O PRODUTO DO NESTED-PCR COM 2 AMOSTRAS, SENDO A AMOSTRA 1 POSITIVAS PARA ERLIQUIOSE E A AMOSTRA 2 APRESENTANDO SOMENTE O CONTROLE DE REAÇÃO, MOSTRANDO SER NEGATIVA PARA ERLIQUIOSE. 1KB= MARCADOR DE MASSA MOLECULAR INVITROGEN®.49

FIGURA 14: GEL DE AGAROSE 1,5% CORADO COM GELRED - BIOTIUM® COM VISUALIZAÇÃO EM TRANSILUMINAÇÃO ULTRAVIOLETA, MOSTRANDO O PRODUTO DA PCR COM 20 AMOSTRAS, SENDO 8 POSITIVAS PARA ERLIQUIOSE. AS AMOSTRAS POSITIVAS POSSUEM A BANDA DE 409PB. A BANDA COM 230PB É REFERENTE AO CONTROLE DE REAÇÃO. 1KB= MARCADOR DE MASSA MOLECULAR INVITROGEN®.----- 50

FIGURA 15: FOTOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA (50X), CORADO COM HE (HEMATOXILINA-EOSINA). AS SETAS INDICAM AS MÓRULAS ENCONTRADAS EM CÉLULAS MONONUCLEARES, NAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE ANIMAIS INFECTADOS. ESTAS AMOSTRAS TAMBÉM FORAM POSITIVAS PARA ERLIQUIOSE QUANTO FORAM SUBMETIDAS AOS TESTES PELAS TÉCNICAS DE PCR E LAMP, MOSTRANDO QUE AS TÉCNICAS NÃO RESULTARAM EM FALSO NEGATIVO. FOTO CEDIDA PELA UNICASTELO.----- 53

FIGURA 16: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO DOS QUATRO INICIADORES FIP, F3, BIP E B3 QUE AMPLIFICAM SEIS DISTINTAS REGIÕES DA SEQUÊNCIA ALVO: F3C, F2C E F1C PRESENTES NA EXTREMIDADE 3' , E B1, B2 E B3 NA EXTREMIDADE 5'.----- 55

FIGURA 17: A AMOSTRA QUANTIFICADA EM NANODROP™, MOSTRA UM GRADIENTE COM A TÉCNICA DE LAMP, ONDE PODE SE DIAGNOSTICAR A ERLIQUIOSE EM ATE 1FG DE DNA TOTAL. 1KB= MARCADOR DE MASSA MOLECULAR INVITROGEN®, CN= CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA). GEL DE AGAROSE 1,5%, CORADO COM GELRED - BIOTIUM® E VISUALIZAÇÃO POR TRANSILUMINAÇÃO ULTRAVIOLETA.----- 57

FIGURA 18: FORAM REALIZADAS DUAS AMPLIFICAÇÕES POR LAMP COM DNA EXTRAÍDOS, UM ANIMAL CONTAMINADO E UM ANIMAL NÃO CONTAMINADO, APÓS A AMPLIFICAÇÃO FOI ADICIONADO A REAÇÃO 1 µL

DE PICOGREEN® (CONFORME INSTRUÇÕES DO FABRICANTE). ESTAS AMOSTRAS FORAM SUBMETIDAS A LUZ UV, ONDE CLARAMENTE OBSERVA-SE A DIFERENÇA DE COR, SENDO QUE A AMOSTRA AMPLIFICADA BRILHA NA PRESENÇA DA LUZ UV, E A AMOSTRA NÃO AMPLIFICADA PERMANECE SEM BRILHO. ----- 58

FIGURA 19: FORAM REALIZADAS DUAS AMPLIFICAÇÕES POR LAMP COM DNA EXTRAÍDO, UM ANIMAL CONTAMINADO E UM ANIMAL NÃO CONTAMINADO. APÓS A AMPLIFICAÇÃO FOI ADICIONADO A REAÇÃO 1 µL DE PICOGREEN® MOSTRANDO CLARAMENTE A DIFERENÇA DAS CORES A OLHO NU, ONDE A AMPLIFICAÇÃO NEGATIVA APRESENTA A COR LARANJA E A AMPLIFICAÇÃO POSITIVA APRESENTA A COR VERDE. ----- 59

FIGURA 20: GEL DE AGAROSE 1,5% CORADO COM GELRED - BIOTIUM® COM VISUALIZAÇÃO EM TRANSILUMINAÇÃO ULTRAVIOLETA, MOSTRANDO O PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO POR LAMP, USANDO A ENZIMA PHUSION™FLASH DNA POLIMERASE, SEM EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL, ONDE 2 AMOSTRAS ERAM POSITIVAS PARA ERLIQUIOSE (1 E 2) E 2 AMOSTRAS ERAM NEGATIVAS (3 E 4), CN= CONTROLE NEGATIVO (H₂O), 1KB= MARCADOR DE MASSA MOLECULAR INVITROGEN®.----- 61

FIGURA 21: NESTA FIGURA DEMONSTRAMOS CLARAMENTE A REDUÇÃO NAS ETAPAS DESDE A COLETA DAS AMOSTRAS ATÉ A ANÁLISE FINAL. COM A UTILIZAÇÃO DA ENZIMA PHUSION™FLASH DNA POLIMERASE A EXTRAÇÃO É DESNECESSÁRIA, E A UTILIZAÇÃO DO CORANTE PICOGREEN® PERMITE ANALISARMOS OS RESULTADOS JUNTAMENTE COM A AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS, DISPENSANDO O USO DO GEL DE AGAROSE.----- 62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DE <i>EHRlichia canis</i> (DSB) E DO CONTROLE DE REAÇÃO (CANIS_X) POR PCR SEUS RESPECTIVOS VALORES DE T _M	31
TABELA 2: CONCENTRAÇÃO E QUANTIDADE DOS REAGENTES EMPREGADOS NA PCR, PARA UM VOLUME FINAL DE 15UL.....	36
TABELA 3: CONDIÇÕES DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	36
TABELA 4: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO POR LAMP DO GENE <i>DSB</i>	43
TABELA 5: CONCENTRAÇÃO DO DNA, EXTRAÍDO PELO PROTOCOLO MODIFICADO DE BRAZOL, NAS AMOSTRAS DO CANIL E DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS, RESPECTIVAMENTE.....	45
TABELA 6: AMOSTRAS INFECTADAS POR <i>EHRlichia canis</i> , NO CANIL MUNICIPAL E EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS.....	50
TABELA 7: CONCENTRAÇÃO E QUANTIDADE DOS REAGENTES EMPREGADOS NO LAMP, PARA UM VOLUME FINAL DE 25 µL.....	43
TABELA 8: CONCENTRAÇÃO E QUANTIDADE DOS REAGENTES EMPREGADOS NA PCR, USANDO A ENZIMA PHUSION™FLASH DNA POLIMERASE PARA UM VOLUME FINAL DE 20UL.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
ANFAL PET	Associação nacional de fabricantes de alimentos para animais
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
C	Citosina
CMV	Citomegalovírus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
<i>dsb</i>	Tio-dissulfóxido-oxireductase
dsDNA	DNA de fita dupla
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
fg	Fentograma
G	Guanina
H₂O	Água
HE	Hematoxilina-Eosina
HPV	Papiloma vírus humano
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
ICC	Isolamento de cultura de células
IFI	Imunofluorescência Indireta
KCl	Cloreto de potássio
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
M	Mol/L
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
ml	Mililitro
mmol/L	Milimol/L
ng	Nanograma
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amônio

pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PETS	Pequenos animais domésticos
pg	Picograma
pmol	Picomol
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
r.p.m.	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T	Timina
TAE	Tris - acetato - EDTA
TE	Tris - ácido clorídrico - EDTA
Tm	Temperatura de Melting
VZV	Vírus da varicela zoster
µL	MicroLitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1- Introdução	17
1.1- Histórico.....	18
1.2- <i>Ehrlichia canis</i>	19
1.3- <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	20
1.4- Erliquiose em Humanos	20
1.5- Diagnósticos Atuais.....	22
1.6- Tratamento.....	25
1.7- LAMP no diagnóstico clínico.....	26
2- Objetivos Gerais	27
3- Objetivo Específico.....	27
4- Material e Métodos.....	28
4.1- Coleta das Amostras	28
4.2- Extração do DNA.....	28
4.3- PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	30
4.3.1- Protocolo utilizado na amplificação por PCR.	35
4.4- LAMP (<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>)	37
4.4.1- Etapa não-cíclica	38
4.4.2- Etapa cíclica.....	39
4.4.3- Protocolo utilizado na amplificação por LAMP.....	43
5- Resultados e Discussão.....	44
5.1- Extração do DNA.....	44
5.2- PCR (reação em cadeia da polimerase)	47
5.3- LAMP (<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>).	53
5.3.1- Amplificação por LAMP.	56
5.3.2- Visualização da amplificação por LAMP a olho nu.....	57
5.3.3- Diagnóstico de Erliquiose sem extração do DNA.....	59
6- Conclusão	62
7- Referências	63

1- Introdução

Recentemente NOTOMI *et al.*, (2000), desenvolveram a tecnologia da amplificação isotérmica de DNA (ácido desoxiribonucléico), o LAMP do inglês “*Loop-Mediated Isothermal Amplification*”, onde é possível amplificar sequências de DNA com grande especificidade. Esta tecnologia está sendo aplicada em diagnóstico rápido em todo o mundo. No Brasil, ainda não existem publicações a respeito da utilização da técnica de LAMP.

Para testar a técnica de LAMP com possibilidade de aplicação, pesquisamos nichos de mercado onde novas tecnologias diagnósticas poderiam ser utilizadas. O mercado de diagnóstico em humanos é bastante atraente, porém requer muita regulamentação. O mercado de pequenos animais domésticos (PETS) está em franco crescimento e carece de novas tecnologias. Verificamos que a população absoluta de cães no país é de 28,8 milhões, de acordo com a Associação Nacional de Fabricantes de Alimentos para Animais (ANFAL Pet), ou seja, aproximadamente um cão para cada 4,5 pessoas (censo IBGE, 2002), chegando a uma proporção de um animal para cada 1,5 humano nas cidades com maior incidência no país. O número coloca o Brasil como o segundo país em maior população de animais domésticos, atrás somente dos Estados Unidos.

Em 2008, a Universidade de São Paulo estimou que houve um crescimento de 60% no número de cães, só na grande São Paulo. Estima-se que no Brasil o mercado de Pets cresça cerca de 16% ao ano. Assim, focamos os nossos esforços na identificação de doenças infecto-contagiosas em cães.

A doença canina de maior incidência que identificamos foi aquela causada pela bactéria *Ehrlichia canis* (*Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae; Ehrlichia*). Assim focamos nosso estudo e, realizamos através da técnica de PCR (AGUIAR, 2006; CARRET *et al.*, 1999), o diagnóstico de 90 animais do canil municipal da cidade de São Carlos (Departamento de Proteção Animal do Município). Constatamos que 80% dos animais estudados estavam infectados com erliquiose. Verificamos ainda que o diagnóstico tradicional da erliquiose é realizado através de microscopia, o qual não é

100% eficiente. Já existem metodologias diagnósticas de erliquiose com uso da PCR, porém são de alto custo. Além disso, discutimos o caso com dezenas de veterinários que foram unânimes na solicitação de método diagnóstico mais preciso e barato para a doença.

Desta forma, identificamos uma demanda importante para o diagnóstico molecular de erliquiose e concentramos os nossos esforços para o desenvolvimento de uma metodologia inovadora para o diagnóstico da erliquiose canina.

1.1- Histórico

A primeira espécie de *Rickettsia canis* foi descrita em um cão Pastor Alemão, na Argélia, por DONATIEN e LESTOQUARD em 1935 e reclassificada como *Ehrlichia canis*, por MOSHKOVSKI em 1945. No Brasil, o primeiro relato de erliquiose canina ocorreu em Belo Horizonte – MG, por COSTA em 1973. A erliquiose canina é uma doença transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, causada por um parasita intracelular obrigatório, a bactéria *Ehrlichia canis* (GREENE *et al.*, 1990).

A doença vem sendo relatada em vários estados brasileiros, acometendo aproximadamente 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias (BULLA *et al.*, 2004; DAGNONE *et al.*, 2003; LABARTHE *et al.*, 2003; TRAPP *et al.*, 2002).

Desde a identificação do parasita bacteriano intracelular obrigatório *Ehrlichia canis* há 74 anos, a erliquiose canina tornou-se uma das mais importantes doenças infecciosas domésticas de cães em todo o mundo, levando a uma substancial morbidade e morte, e epizootias ocasionais, em populações vulneráveis à infestação por carrapato (HESS *et al.*, 2006) que tem sido descritas em todo o mundo, especialmente em áreas tropicais e subtropicais (RIKIHISA, 1999).

1.2- *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis pertence ao reino das bactérias, filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales, família das Anaplasmataceae, ao gênero *Ehrlichia* que contempla cinco espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER *et al.*, 2001). Constitui bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias dos leucócitos (monócitos e polimorfonucleares) ou trombócitos (DAVOUST *et al.*, 1991).

Erliquiose canina exibe as fases aguda, subclínica e crônica. Na fase aguda, os sinais clínicos como febre, depressão, dispnéia, anorexia, linfadenopatia, perda de peso leve, hemorragia, epistaxe, distúrbios gastrointestinais, como vômitos ou diarreia, doenças respiratórias, petéquias especialmente nas membranas mucosas (EWINGE e BUCKNER., 1965; HUXSOLL *et al.*, 1972) e sintomas oculares são observados. A fase subclínica de infecção segue a fase aguda e está associada com a persistência da infecção por *E. canis*. Trombocitopenia, leucopenia variável, e anemia persistem na ausência de sinais clínicos (GREENE, *et al.*, 1990). A fase crônica é caracterizada por hemorragias, epistaxe, edema periférico, emagrecimento, hipotensão e choque, levando à morte. Os achados laboratoriais mais determinantes incluem trombocitopenia, leucopenia, anemia e hipergamaglobulinemia (WOODY e HOSKINS., 1991). Em infecções experimentais, é possível diferenciar as três fases, mas em animais naturalmente infectados, é difícil definir a fase da doença, uma vez que a apresentação clínica e os achados laboratoriais são similares e a duração e severidade dos sinais clínicos são variáveis (HARRUS *et al.*, 1997; SANTARÉM, 2003).

Os cães infectados podem servir como uma fonte direta de infecção para outros cães através da transfusão de sangue e indiretamente através da picada de carrapatos. Apesar do tratamento e aparente recuperação clínica, a erliquia pode permanecer no hospedeiro por longos períodos, que se torna portador crônico, constituindo-se em fonte de infecção (HARRUS *et al.*, 1998).

1.3- *Rhipicephalus sanguineus*

Originário da África é a única espécie do gênero *Rhipicephalus* nas Américas, o *Rhipicephalus sanguineus* (Eukaryota; Metazoa; Eumetazoa; Bilateria; Coelomata; Protostomia; Panarthropoda; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Acari; Parasitiformes; Ixodida; Ixodoidea; Ixodidae; Rhipicephalinae; Rhipicephalus; Rhipicephalus) foi introduzido no Brasil possivelmente a partir do século XVI, com a chegada dos colonizadores europeus e seus animais domésticos. *R. sanguineus* é um carrapato trioxeno e possui hábito nidícola vivendo em ninhos, tocas ou abrigos dos hospedeiros, o que torna os cães sempre sujeitos a grandes infestações, visto que este carrapato tem grande capacidade de se multiplicar e se manter em ambientes urbanos e quando não estão parasitando o hospedeiro, estão sob as formas de vida livre, escondidos nas frestas e buracos das tocas (LABRUNA *et al.*, 2005). Esse artrópode, por exercer hematofagia, é o principal vetor biológico e reservatório de *Ehrlichia canis*, sendo responsável também pela transmissão de outros patógenos (SEXTON *et al.*, 1976). *Rhipicephalus sanguineus*, comumente chamado de “carrapato marrom do cão”, é um dos carrapatos mais amplamente distribuídos (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1999).

1.4- Erliquiose em Humanos

A relação entre o homem e o cão foi criada há milhões de anos. Devido a esse longo período e o estreito relacionamento, eventualmente alguns ectoparasitas de cães domésticos podem ser observados parasitando o homem. Este parasitismo, embora incomum, pode ser responsável por uma lesão de pele simples ou pela transmissão de agentes infecciosos.

O carrapato marrom do cão é um ectoparasita de interesse de saúde pública e isso se deve a sua capacidade de carregar e transmitir inúmeros patógenos aos seres humanos (PALMAS *et al.*, 2009). Os sinais clínicos em humanos variam de infecção assintomática ou doença grave que requer hospitalização ou pode levar até mesmo a morte. A erliquiose monocítica humana grave, é caracterizada por febre,

calafrio, dor de cabeça, mialgias, anorexia, náuseas ou vômitos e perda de peso (PADDOCK *et al.*, 2003), trombocitopenia, leucopenia e alterações de enzimas hepáticas também são frequentemente relatados. Meningite, encefalite ou encefalopatia também podem ocorrer como resultado da infecção (BARTON *et al.*, 1990).

Apesar de ser incomum, há uma série de relatos sobre o parasitismo humano por *R. sanguineus* no mundo (GODDARD., 1989.; CARPENTER *et al.*, 1990.; RAOULT e ROUX, 1997). No entanto, o parasitismo humano por esta espécie de carrapato historicamente ocorre na região do Mediterrâneo, na América Central, e mais raramente no Brasil, isso sugere uma doença não reconhecida ou talvez erroneamente diagnosticada como uma doença viral. O reconhecimento da erliquiose humana nos Estados Unidos ocorreu em 1986 e na Europa o parasitismo humano por *R. sanguineus* é de especial importância por este ser também o transmissor de outras importantes patologias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Desde que as espécies de Ehrlichia emergiram como patógenos humanos, mais de 700 casos de erliquiose humana foram relatados na década seguinte ao reconhecimento do primeiro caso (OLANO e WALKER, 2002).

Até 2004 não houve registro de parasitismo humano por *R. sanguineus* no Brasil (LABRUNA, 2004). No entanto, no início de 2005, relatou-se brevemente a primeira descrição de parasitismo humano por esta espécie de carrapato ixodídeo. (DANTAS-TORRES *et al.*, 2005). Alguns autores relataram que os estágios imaturos de *R. sanguineus* são mais comumente envolvidos no parasitismo humano. Este aspecto é importante devido ao fato de que as ninfas de *R. sanguineus* são consideradas os principais transmissores da *Rickettsia conorii* (RAOULT e ROUX., 1997). Os estágios imaturos são facilmente ignorados por causa de seu pequeno tamanho. Assim, acredita-se que este carrapato se alimenta de sangue de seres humanos mais do que reconhecido previamente (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006).

Foi demonstrado nos Estados Unidos que o parasitismo humano pelo carrapato marrom do cão ocorre predominantemente durante o verão e o outono (CARPENTER *et al.*, 1990). No entanto, pouco se sabe sobre a biologia desta espécie de carrapato sob condições naturais brasileiras. Na verdade, os estudos

sobre este assunto são cruciais para uma melhor compreensão das interações carrapatos-humanos em nossa área (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006). A hipótese é que qualquer pessoa que vive em um ambiente com cães parasitados pode ser incluída no grupo de risco para contaminação por *E. canis*. Os veterinários estão também incluídos neste grupo, porque eles entram em contato com cães infestados durante a sua rotina diária em áreas endêmicas. Doenças transmitidas por carrapatos são reconhecidas como um problema emergente de saúde pública (PAROLA, 2004).

É sabido que o papel do *R. sanguineus* como vetor do agente causador da erliquiose canina e outros agentes infecciosos para o homem pode ser subestimada (CARPENTER *et al.*, 1990). Por conseguinte, existe uma necessidade urgente de novas investigações com o objetivo de melhorar a compreensão atual da epidemiologia das “doenças de carrapatos” no Brasil. A presença de *R. sanguineus* em diferentes hospedeiros demonstra seu comportamento alimentar eclético e, certamente, reforça a possibilidade de existir casos anteriores não declarados de parasitismo humano por esta espécie de carrapato no país. No Brasil as interações carrapato-humano podem ser menos raras do que pensamos (LIMA *et al.*, 1995).

1.5- Diagnósticos Atuais

Atualmente, o diagnóstico de rotina da erliquiose canina é baseado em testes hematológicos, bioquímicos, em resultados sorológicos (imunofluorescência indireta - IFI, ELISA, *Western immunoblotting*) (RISTIC *et al.*, 1972.; GREENE *et al.*, 1990.; WANER *et al.*, 2001) e placa de aglutinação em látex que detectam anticorpos contra *E. canis* no soro (GREENE *et al.*, 1990).

Segundo ALMOSNY (2002), o diagnóstico laboratorial mais comum é realizado pela observação de mórulas em esfregaços de sangue periférico (extraído da ponta de orelha). As erliquias se replicam dentro de fagossomos da célula hospedeira, onde os corpos elementares entram nos monócitos por fagocitose, a fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, permitindo aos corpos elementares crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo, formando os

corpúsculos iniciais que são observados como inclusões pleomórficas e após multiplicações adicionais desenvolvem-se para inclusões maduras, que na microscopia óptica têm aspecto de “amora”, as chamadas mórulas que tipificam o gênero. Os monócitos infectados, geralmente apresentam mórulas e cada mórula contém vários corpos elementares. As mórulas liberam corpos elementares quando as células infectadas se rompem ou então são liberadas por exocitose e onde há o ciclo infeccioso. (DAGNONE *et al*, 2001).

Diagnóstico das infecções por *E. canis* por avaliação de manchas de sangue tem sido sempre difícil por causa da parasitemia baixa associada a infecção (HUXSOLL *et al.*, 1972). Portanto, a sorologia para diagnóstico pode ser enganosa, especialmente nas áreas endêmicas da doença (WANER *et al.*, 2001; NEER *et al.*, 2002).

O teste de imunofluorescência foi o teste mais sensível para o diagnóstico da infecção por *E. canis*, uma vez desenvolvido em 1972 por RISTIC *et al*. Embora o teste de IFI seja muito sensível na detecção da prevalência da exposição a *E. canis*, não é útil para determinar o estado de infecção atual ou avaliação de apuramento de *E. canis* após tratamento com antibióticos (IQBAL e RIKIHISA., 1994). Os testes sorológicos têm várias desvantagens, uma vez que suas características clínicas e clinicopatológicas são amplamente inespecíficas (COUTO, 1998). Especialmente nas regiões geográficas onde *E. canis* é endêmica, o teste sorológico isolado é muitas vezes pouco confiável, desde que os cães possam ser IFI positivo devido à exposição múltipla a erliquiose. Reatividades cruzadas entre *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Ehrlichia spp* e outros (PEREZ *et al.*, 1996) constituem outro problema em potencial para a especificidade do teste. Estes reagem sorologicamente de forma cruzada com *E. canis* fazendo com se torne difícil a diferenciação das infecções individuais. (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998 a).

Alternativamente, o uso de isolamento de cultura de células (ICC) para detecção de *E. canis* em sangue de cães infectados tem se mostrado a forma mais sensível e específica (IQBAL *et al.*, 1994). No entanto, o isolamento é trabalhoso e pouco prático em laboratórios de microbiologia clínica, o ICC exige de 1 a 4 semanas para obter resultados, limitando assim a sua utilidade como uma

ferramenta de diagnóstico rápido. Este requer uma técnica de cultura de células e instalações adequadas, além de seu alto custo.

Ainda há muita confusão e contradição quanto à sensibilidade do diagnóstico citológico para *E. canis*, especialmente em relação ao tipo de tecido utilizado e a fase da doença nos animais estudados (TROY *et al.*, 1980; ELIAS, 1991; MATTHEWMAN *et al.*, 1993; HARRUS *et al.*, 1998; SAINZ *et al.*, 2000). Além disso, tem havido pouca informação sobre o número de campos microscópicos examinados e o tempo necessário para um diagnóstico definitivo nos estudos relevantes (DU PLESSIS *et al.*, 1990).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido usada com sucesso para amplificar o DNA de *E. canis* de cães infectados durante a fase aguda da infecção (ANDERSON *et al.*, 1992). Mais recentemente a PCR combinada com hibridação DNA (PCR-CH) (MCBRIDE *et al.*, 1996) e *nested* PCR (WEN *et al.*, 1997), cuja técnica envolve dois ensaios sucessivos de reação em cadeia da polimerase e tem sido utilizados para melhorar a sensibilidade sobre o da PCR convencional.

A observação de mórulas de *E. canis* em monócitos e/ou linfócitos, a detecção de seu DNA nos tecidos-alvo por PCR, ou a cultura *in vitro* são necessários para um diagnóstico correto (NEER *et al.*, 2002). No entanto, os dois últimos métodos necessitam de equipamentos especiais, o que pode limitar a sua utilidade na prática diária.

Os cães na fase crônica da doença têm um prognóstico ruim e podem não melhorar após o tratamento (KUEHN e GAUNT., 1985.; GREENE e HARVEY., 1990). Devido à possibilidade de os cães em condições naturais poderem ser infectados por *E. canis* tanto como por *E. chaffeensis*, há necessidade de exames laboratoriais para diferenciar entre as 2 bactérias. O sequenciamento dos genes que codificam as proteínas de superfície p30 16S RNA ribossomal (16S rRNA), revelou uma estreita relação genotípica entre *E. canis* e *E. chaffeensis* (INOKUMA *et al.*, 2001). Conseqüentemente, ensaios de laboratório comumente utilizado para o diagnóstico de ambas as infecções podem ser de baixa especificidade devido à reatividade cruzada.

Portanto, para o diagnóstico da erliquiose canina, um método mais sensível, específico e simples de detectar diretamente o organismo é desejável. O

desenvolvimento de testes de PCR para a detecção do DNA de *E. canis* no sangue e nos tecidos de cães experimentalmente infectados foi muitas vezes não suficientemente sensível para detectar alguns organismos em amostras de sangue assintomática (IQBAL *et al.*, 1994) e em cães naturalmente infectados, em especial aqueles que já tinham sido tratados com antibióticos (WEN *et al.*, 1997).

A técnica de LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) amplifica rapidamente o DNA alvo sob condições isotérmicas. A reprodutibilidade do LAMP, usando banho seco e a facilidade de leitura dos resultados apresenta um grande potencial para o diagnóstico específico (NJIRU *et al.*, 2008).

1.6- Tratamento

As Tetraciclina são comumente usadas no tratamento da erliquiose monocítica canina. A doxiciclina, em particular é o antibiótico mais aceitável e amplamente utilizado no tratamento da erliquiose canina (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998 b). Estudos mostraram que a doxiciclina (10 mg/kg/dia) durante 7 dias foi ineficaz na eliminação de infecção experimentalmente induzida por *E. canis* do sangue e tecidos de três dos cinco cães testados (IQBAL e RIKIHISA., 1994). Em outro estudo, a doxiciclina (5,6 a 6 mg/kg) duas vezes ao dia, usado por 14 dias foi eficaz na eliminação de *E. canis* induzida experimentalmente a partir do sangue de oito cães com infecção aguda (BUHLES *et al.*, 1974). Porém, outros estudos experimentais têm demonstrado que os cães permanecem soropositivos para *E. canis* por muitos meses após a perda espontânea da infecção (EWING *et al.*, 1995) e após o tratamento com tetraciclina (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998 b).

Cães com sinais clínicos ou na fase aguda da doença mostram significativa melhora nos parâmetros clínicos e hematológicos dentro de 24 a 48 horas após a terapia instituída. Os cães com erliquiose crônica podem apresentar melhora gradual ou nenhuma melhora após o tratamento (GREENE e HARVEY., 1990).

A Erliquiose crônica, portanto, pode resultar em uma alta mortalidade ou resultar na recuperação clínica dos cães, que se tornam portadores e podem servir como fonte de infecção. É, portanto, extremamente importante o diagnóstico da erliquiose numa fase precoce, podendo melhorar o prognóstico dos cães tratados. A

identificação do teste mais sensível e confiável também irá ajudar na seleção de cães portadores.

1.7- LAMP no diagnóstico clínico

Embora o lançamento do LAMP remete-se a 1998, este tornou-se popular depois de 2003, após a emergência do vírus SARS no Nilo Ocidental (HONG *et al*, 2004). Desde então a técnica de LAMP tem sido cada vez mais adaptada por pesquisadores do Japão, principalmente para o diagnóstico clínico das doenças emergentes. Entretanto, a maioria das pesquisas publicadas tem sido dirigida para vírus de RNA, talvez devido ao aumento da incidência de viroses em um passado recente, sob a forma de epidemias de grandes dimensões com uma significativa importância para a saúde pública.

A utilidade do LAMP para amplificação de DNA viral também foi relatado para o HPV (papilomavírus humano) tipo 6, 11, 16 e 18, herpes, VZV (varicela), CMV (citomegalovírus), adenovírus e vírus BK (OKAMOTO *et al.*, 2004; YOSHIKAWA *et al.*, 2004; WATABAYASHI *et al.*, 2004 ENOMOTO, *et al.*, 2005; KANEKO *et al.*, 2005; SUGIYAMA, *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2006; BISTA *et al.*, 2007; HAGIWARA *et al.*, 2007; IHIRA *et al.*, 2007; KUARA *et al.*, 2007) e encontrou-se superior em termos de sensibilidade, especificidade, rapidez e simplicidade, e pode potencialmente ser uma ferramenta valiosa para a detecção da bactéria *Ehrlichia canis*.

Entre os animais, foi relatado a detecção por LAMP do vírus da febre aftosa (VFA) (DUKES *et al.*, 2006), diagnóstico doença de *newcastle*, cinomose, parvovirose canina e septicemia hemorrágica viral e na agricultura o plum pox vírus (PHAM *et al.*, 2005; VARGAS *et al.*, 2006).

O diagnóstico por LAMP da bactéria *Ehrlichia canis* nunca foi publicado, ou sequer citado, mas neste trabalho pudemos fazer a detecção do microorganismo, através desta técnica, que se mostrou muito eficaz.

2- Objetivos Gerais

- Desenvolver metodologia para diagnóstico de erliquiose canina a partir da análise do DNA;
- Comparar a eficiência do diagnóstico da técnica de PCR com a técnica de LAMP.

3- Objetivo Específico

- Desenvolver diagnóstico por LAMP de erliquiose canina a partir da análise do DNA.

4- Material e Métodos

4.1- Coleta das Amostras

As amostras de sangue foram coletadas por médicos veterinários, por meio de punção venosa em tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As coletas foram realizadas nos seguintes locais:

1) Canil municipal da cidade de São Carlos (coleta devidamente autorizada pelo Secretário de Agricultura e Abastecimento, Departamento de Proteção Animal Dr. Sérgio Gonçalves Dutra), a coleta foi realizada em três etapas. Em cada etapa foram coletadas as amostras de 30 animais, totalizando 90 amostras diferentes, tendo a colaboração da veterinária Dra. Glauce Mendes;

2) Clínica Veterinária Amigão, onde foram coletadas amostras de 14 animais;

3) Clínica Veterinária Kerry, cinco amostras coletadas;

4) Clínica Clínica Veterinária, cinco amostras coletadas;

5) Clínica Veterinária Sanavet, coletadas 19 amostras;

6) *Hospital Veterinário da Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), na cidade de Descalvado - SP, onde foram analisadas 49 amostras.

* Na faculdade o projeto foi analisado pelo seu respectivo Comitê de ética, onde foi aprovado. As amostras foram coletadas pela Dra. Roberta Casale, com o aval da Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira. Obtivemos um total de 182 amostras de todos os pontos de coleta, entre agosto de 2008 a abril de 2009.

4.2- Extração do DNA

Inicialmente o DNA foi extraído pela metodologia da extração por Proteinase K, modificado do protocolo de BELLO *et al.*, (2001), onde:

1. Adicionamos 150 µL de sangue total a um tubo *ependorf* estéril;
2. Lavamos com 500 µL de TE (Tris - ácido clorídrico – EDTA);
3. Centrifugamos a solução por 1 minuto a 13.000 r.p.m.;
4. Descartamos o sobrenadante e adicionamos 1,0 mL de água ultrapura;

5. Centrifugamos a solução por 1 minuto a 10.000 r.p.m., descartamos o sobrenadante e acrescentamos:
 - a. 80 μ L de 5X tampão de Proteinase K (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7,8, 5mmol/L EDTA e 0,5% SDS (dodecil sulfato de sódio));
 - b. 20 μ L de Proteinase K, 20 mg/mL;
 - c. 40 μ L de SDS 10%;
 - d. 240 μ L de água.
6. Agitamos, homogeneizamos e incubamos 30 minutos a 60°C;
7. Adicionamos 120 μ L de NaCl 5mol/L, homogeneizar;
8. Centrifugamos a solução por 10 minutos a 13.000 r.p.m.;
9. Transferimos o sobrenadante para um tubo limpo e adicionamos 800 μ L de Etanol absoluto;
10. Homogeneizamos e centrifugamos por 10 minutos a 13.000 r.p.m.;
11. Descartamos o sobrenadante;
12. Adicionamos cuidadosamente 600 μ L de etanol 70%;
13. Centrifugamos por 10 minutos a 13000 r.p.m., a 4°C;
14. Descartamos o sobrenadante e deixamos secar o precipitado a temperatura ambiente;
15. Ressuspendemos o DNA em 30 μ L de água ultrapura;
16. Armazenamos a amostra a -20°C.

A metodologia descrita acima se mostrou eficiente, porém devido ao seu longo tempo de execução, testamos também o protocolo reformulado de extração de sangue utilizando Brazol - LGC do Brasil (CHOMCZYNSKKI e SANCCHI., 1987), o qual foi realizado da seguinte forma:

1. A um tubo *Eppendorf* de 1,8 mL contendo 250 μ L de Brazol foram adicionados 150 μ L de sangue total;
2. Homogeneizamos por dois minutos em vortex;
3. Adicionamos 50 μ L de clorofórmio, homogeneizando-a novamente;
4. Centrifugamos a 10.000 r.p.m., por 15 minutos;
5. Transferimos a fase aquosa para um tubo limpo;
6. Adicionamos 300 μ L de isopropanol resfriado a 4°C;

7. Centrifugamos a 10.000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C;
8. Desprezamos o sobrenadante;
9. Adicionamos cuidadosamente 500µL de etanol 70%;
10. Centrifugamos a 10.000 r.p.m. por 10 minutos;
11. Desprezamos o sobrenadante
12. Deixamos secar a temperatura ambiente;
13. Ressuspendemos o DNA precipitado em 30µL de água ultrapura;
14. Armazenar a -20°C.

O protocolo modificado de Brazol se mostrou muito eficaz, com um menor tempo de execução, portanto foi o utilizado em todas as amostras.

4.3- PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 80 (SAIKI *et al.*, 1986). O princípio da técnica é multiplicar trechos específicos de DNA, utilizando desoxiribonucleotídeos, para que possa ser facilmente detectável por métodos de separação e identificação de DNA.

A multiplicação destes trechos específicos se dá alternando a temperatura de ensaio entre a desnaturação das cadeias do DNA.

1ª etapa: desnaturação, onde se eleva a temperatura à 95°C para que haja a separação da dupla fita.

2ª etapa: anelamento dos iniciadores, onde a temperatura é reduzida, dependendo da T_m (Temperatura de fusão de um oligonucleotídeo) é a temperatura na qual exatamente metade da fita do DNA está anelada e a outra metade está desnaturada. Cada iniciador tem seu T_m específico, e o T_m dos iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1.

3ª etapa: extensão, a temperatura é elevada à 72°C, para que a enzima Platinum® Taq DNA polymerase - Invitrogen®, possa inserir os dNTPs e fazer a nova fita.

Foram utilizadas reações de amplificação por PCR contendo: DNA quantificado em gel de agarose 1% ou em NanoDrop™ (equipamento que quantifica

amostra de DNA e determina seu grau de pureza); 1,25 mmol/L de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega®); 1,0 µL de cada iniciador Dsb-330 e Dsb-729 a 15 pmol/µL (*E. canis*), e Canis_F e Canis_R a 1 pmol/µL (controle de reação) (tabela 1); 0,2 U/µL de Platinum® Taq DNA polymerase - Invitrogen®; 1,5 µmol/L de solução tampão contendo 50 mol/L de KCl; 20 mol/L Tris-HCl e 0,45 µmol/L de MgCl₂. Foi adicionada à solução água ultrapura autoclavada para completar 15µL e a amplificação foi efetuada em termociclador com gradiente de temperatura da Applied Biosystem®, modelo Veriti. Em cada série, foram incluídos controles positivo e negativo (água).

Os iniciadores para erliquiose foram desenhados a partir da sequência do gene *dsb*, conforme publicado por AGUIAR (2006). Os números de acesso no GenBank para as sequências de nucleotídeos do gene estudado para erliquiose é CP000107.1 (figuras 1 e 2).

Os iniciadores para controle interno de reação foram desenhados a partir da sequência de *Canis lupus familiaris*, cromossomo 26, acesso ao GenBank: AC186993 (figuras 3 e 4).

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE (tris - acetato – EDTA) tamponado, revelados com GelRed - Biotium® em transiluminação ultravioleta. Compararam-se os fragmentos amplificados com marcadores de DNA de 100 pares de base (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®).

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de *Ehrlichia canis* (Dsb) e do controle de reação (Canis_x) por PCR e seus respectivos valores de Tm.

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Pares de Bases
Dsb - 330	5' ATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT 3'	53,8°C	409 pb
Dsb - 729	5' CTTTAAGAAGTAAAATAGATATGCAGA 3'	52,7°C	409 pb
Canis_F	5'CGGGGTCTGGGTTCTTGTGAC 3'	60,2°C	230 pb
Canis_R	5'CGTCCCTGGTCGTTCCAGATT 3'	59,2°C	230 pb

Ehrlichia canis str. Jake, complete genome

[Comment](#) [Features](#)

LOCUS CP000107 1315030 bp DNA circular BCT 11-JUL-2008
DEFINITION Ehrlichia canis str. Jake, complete genome.
ACCESSION CP000107 AAEJO1000000 AAEJO1000001 AAEJO1000002 AAEJO1000003
AAEJO1000004 AAEJO1000005 AAEJO1000006 AAEJO1000007 AAEJO1000008
AAEJO1000009 AAEJO1000010 AAEJO1000011 AAEJO1000012 AAEJO1000013
AAEJO1000014 AAEJO1000015 AAEJO1000016
VERSION CP000107.1 GI:72393774
KEYWORDS .
SOURCE Ehrlichia canis str. Jake
ORGANISM [Ehrlichia canis str. Jake](#)
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales;
Anaplasmataceae; Ehrlichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1315030)
AUTHORS Palenik,B., Copeland,A., Lucas,S., Lapidus,A., Barry,K.,
Detter,J.C., Glavina,T., Hammon,N., Israni,S., Pitluck,S.,
Chain,P., Malfatti,S., Shin,M., Vergez,L., Schmutz,J., Larimer,F.,
Land,M., Mavrommatis,K. and Richardson,P.
TITLE Complete sequence of Ehrlichia canis str. Jake
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1315030)
AUTHORS Palenik,B., Copeland,A., Lucas,S., Lapidus,A., Barry,K.,
Detter,J.C., Glavina,T., Hammon,N., Israni,S., Pitluck,S.,
Chain,P., Malfatti,S., Shin,M., Vergez,L., Schmutz,J., Larimer,F.,
Land,M., Mavrommatis,K. and Richardson,P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-JUL-2005) US DOE Joint Genome Institute, 2800
Mitchell Drive, Walnut Creek, CA 94598, USA
COMMENT URL -- <http://www.jgi.doe.gov>
Source DNA and bacteria available fro Jere McBride
(jemcbri@utmb.edu)
Whole genome sequencing and draft assembly at JGI-PGF

Figura 1: Acesso GenBank onde foi depositada a sequência genômica de *Ehrlichia canis*.

gi|72393774|gb|CP000107.1| Ehrlichia canis str. Jake, complete
genome

AAATGCGTAAAACATTTTATGTAGTGCAATTCATGTTAGAATATAAAAATGAATCCTACAAC
ATACATAACACTTTTTGCTTCAATCAATATAGTTAATCACATGTTGTAGATGTAAACAAT
TCTTAATAATATAAACACTAAAAAATTCACAAATACTACAACGTTACATATATACTTTTC
AGAGATTTTCTACTATTGACTTTCATCAAAAATCTATAGTAGTTTTAACATTCTACATTTTT
TAAGGCAGTAATAATGCTAAGGATTCTATTTTTATTAAGCTTAGTAATACTAGTGGCAAG
TTTTCCACTAATAAATAACTGGTTATCTAATAAATCTGGTAAGCCTATAGTAGATAAAGA
TACAATTATTGCAATTATTGAAGAATATATATCAAATTACCCTCAAAAAGTGATAGATCT
GCTCACCAAAGGGCAAGTGCGGGCAGAGAATGAAGAAATGAGTCAAAACATAAAAAAATA
CAAATCTGAATTGGAAAATACTTCATATCCTTCAGCTGGAAAATAAAGATAGTAAAATAGT
ATTTGTAGAGTTCTTTGATTACTCATGCGGCTATTGCAAAATGATGCTGAAGATATGAA
ACAAATAGTACAAGACGGTAAAGTGCATGTTATATTTCAGAGATTTTCCAATACTTGGTGA
GTCTTCACTCAAAGTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTA
CATAGACTTCTATTATGCAGCACTACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATATT
AAGTATCATAAAATCAATAGGTATAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAA
TGCTGATGCTATAGACAAAATGATACAATCTACCAGAGAAGTACACAGAACATTAATAT
AAGGGGCACTCCTGCTATCATAGTAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATC
AACTTTAAGAAGTAAAATAGATATGCAGAATAAGTCACTTCTGAAAATAATTACTATTA
AAATTTTTGGGTTTTAATGCATCTTATTATGGTCAGGTTTTACACGAAAAATATCAGGGT
TCTGAGTTTTAGTAAAGATGTTTTACGCTCAAGTAAGCATGTTTCTTCTCAGCAACAT
CATCCTTCTGGTTATAAATTTGCATGGCTGTAATACAACAGCATAGTATTGATATGACTA
AACAAATAACAGCTATTACTACACATGAAACAAACAACATTGTATTCTTCTTGACTTGCAA
AAGCAATAGATAACAATAAAACAGACATACATCCCATAGTTAAAGCTATTACAGGAGCAC
TATAAACACAAACATCCATCTTAAATAATGATGTACTTTCTTTCTTCTTCTTAAGTATG
CTTTACGATAGAAATCAGAATCAAAGTATGATTTCAAACCATCTTTCATTTTAGATATTT
CAACCTTATCAATTTCTGATTCAAATCAATATCATAAAAATCAGATGACAACCTTTTCAT
ATTTATGAGCAACTTTTATCATCTGTTATAATTAACCTGCTTGTACTTGTGCTTTCATCTT

Figura 2: Parte da sequência do genoma de *Ehrlichia canis*, onde estão destacados os iniciadores utilizados na amplificação por PCR. No início da figura temos a identificação atribuída pelo GenBank para o acesso da sequência.

Canis familiaris chromosome 26, clone XX-367D6, complete sequence

Comment	Features	Sequence
LOCUS	AC186993	183773 bp DNA linear MAM 19-JUN-2008
DEFINITION	Canis familiaris chromosome 26, clone XX-367D6, complete sequence.	
ACCESSION	AC186993	
VERSION	AC186993.25 GI:190684784	
KEYWORDS	HTG.	
SOURCE	Canis lupus familiaris (dog)	
ORGANISM	Canis lupus familiaris Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia; Canidae; Canis.	
REFERENCE	1 (bases 1 to 183773)	
AUTHORS	Birren,B., Nusbaum,C. and Lander,E.	
TITLE	Canis familiaris chromosome 26, clone XX-367D6	
JOURNAL	Unpublished	
REFERENCE	2 (bases 1 to 183773)	
AUTHORS	Birren,B., Nusbaum,C., Lander,E., Abouelleil,A., Allen,N., Anderson,M., Anderson,S., Arachchi,H.M., Barna,N., Bastien,V., Bloom,T., Boguslavkiy,L., Boukhgalter,B., Camarata,J., Chang,J., Choepel,Y., Collymore,A., Cook,A., Cooke,P., Corum,B., DeArellano,K., Diaz,J.S., Dodge,S., Dooley,K., Dorris,L., Erickson,J., Faro,S., Ferreira,P., FitzGerald,M., Gage,D., Galagan,J., Gardyna,S., Graham,L., Grand-Pierre,N., Hafez,N., Hagopian,D., Hagos,B., Hall,J., Horton,L., Hulme,W., Iliev,I., Johnson,R., Jones,C., Kamat,A., Karatas,A., Kells,C., Landers,T., Levine,R., Lindblad-Toh,K., Liu,G., Liu,X., Lui,A., Mabbitt,R., MacLean,C., Macdonald,P., Major,J., Manning,J., Matthews,C., McCarthy,M., Meldrim,J., Meneus,L., Mihova,T., Mlenga,V., Murphy,T., Naylor,J., Nguyen,C., Nguyen,T., Nicol,R., Norbu,C., O'Connor,T., O'Donnell,P., O'Neil,D., Oliver,J., Peterson,K.,	

Figura 3: Acesso GenBank onde foi depositada a sequência genômica de *Canis lupus familiaris*.

>gi|190684784|gb|AC186993.25| *Canis familiaris* chromosome 26, clone XX-367D6, complete sequence

```
GAATTCCTCAAGGCCTGGCGCAACCTAGGGACGCAGGTACGGTTCACCCCGGGCACCCACGTGCCACC
GGTCGGTAGTGAGGATCCCCCTCGTGACCTGAGTGTGCGCACGGGGTCTGGGTCTTGTGACAGACTGCGG
CCCGTTGCTTGGGCCGGAAGGCAGCTTCGCTCCCTCCTCCACCCCATCATCACCGCCCCAGTGGGCCCCA
ATATCCTCAATGATCTCAAAGAAACATAGGGTTTGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCTTCAGGAAAGGT
CCATTTCCCTGATGCCTTCTAGGCCTTAACCCATTCCCCAAACCCCTCTCATGTGGATAAATCTGGAACGAC
CAGGGACGGTCTCTTGAACAGACCAGCTGATCCCTGCTAACGAAGAAGGAGAGCTCCAGCGCGGGCCCC
GGGCCACCCCGCAGACCCCGTAGCCCCAGCCAACACCCCGCGTACCCCGTAGCCCCAGCCAACACCCCG
CGTACCCCGTAGCCCCAGCCAACACCCCGCGTACCCCGTAGCCCCAGCCAACACCCCGCGTACCCCGTAG
CCCCATCAACACCCTGCGTACCCCGTAGCCCCAGCCAACACCCCGCGTACCCCGTAGCCCCAGCCAAATA
CCCCGAGTACCCCGTAGCCCCATCAACACCCCGCGTACCCCGTAGCCCCAGCCAAATACCCCGCATAACCC
CGTAGCCCCAGCCAACACCCTGCGTACCCCGTAGCCCCAGCCAAATACCCCGCATAACCCCGTAGCCCCAG
CCAACACCCCGCATAACCCCGTAGCCCCAGCCAAATAGCCCTTTAAGTATTTGAGGCCTTGCCAGCACTT
CACTGGAGTGTTTTAAGAATCAAGCAGTAGGTGTGCATTTTTTATTTTTGATGCATTCCTTCAATTCATA
GAATCCCATTTTTTCGGTTTTATGGGGTTTTTCAGCTATTGCCGGCTTAAAAAAAAATTCATGGTCGTCACCAG
TGAGCGTGTGCTCTGTGCCTTTGGGTGCTGTGGGTCTGCGTGGACGGCAGCAGCTGCGCCGTGTCATGAG
GACGCCCGTAGGGCCCTCTGGACGCCAGCTACGGTGCCGCGGGCTCTATCCGCATCCGTCTCATTTAACT
TTCACAATAACCTGGAGAAACTGCCGCTCACGGAGCTTGGGCAACCTGTCCGGGAGCCAGGCCGGCACT
TTGCTGGAAGGTTGTGAAACCTGCAGAGACCTGCCCGCCACCCTGACCCAGTTCTTAACTGGGACCGGAG
CAGGTCGGGCGGATGCTGTGGTCTTCGGGGCCAACAAGCTGCAGGGTTCTGTTGTATTCCAATTTGCCCG
TTTGCAGCTTTTTTGAACCCGACTTTAAAAAAAAAAATTTATGTATCTATTACAAAGAGACAGAGAGAGA
GAGAGAGAAAGGCAGAGACACAGGCAGAGGGAGAAGCAGAGGGAGCCCGACGTGGGACTCGATCCCGGGA
CCCCGGGGTACGCCCTGAGCCGAAGGCAGACGCTCCACCACGGAGCCATCAGGTGTCCCAGAAAACCGGA
TTTTTTAAATACCAGCTGCCAGCTGCCCTTGGTGTCTGCATGTGGAGCATGAGCCAACCTCAGTGCAT
TCGGATGCACGTTTCTCGCCATGGGGTCTGCACCCTGGCCTGGGCCTCGTGCGGGTGCTCTCCATCGCG
CTTCCCTGAGCACCCCTTTGAAAATGGCAGCACCGTGCCCCAGGTGGGGTCTGGCCCCGTGTCCTCGT
```

Figura 4: Parte da sequência do genoma de *Canis lupus familiaris*, onde estão destacados os iniciadores utilizados na amplificação do controle de reação por PCR. No início da figura temos a identificação dada pelo GenBank que dá acesso a sequência.

4.3.1- Protocolo utilizado na amplificação por PCR.

A concentração e quantidade dos reagentes empregados na reação de PCR estão demonstradas na tabela 2, e foram padronizadas para um volume final de 15µL.

Tabela 2: Concentração e quantidade dos reagentes empregados na PCR, para um volume final de 15µL.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O (ultrapura autoclavada)	-	5,45 µL
Tampão	[10x]	1,5 µL
MgCl ₂	[2mol/L]	0,45 µL
dNTP	[1,25mol/L]	2,4 µL
Iniciadores	Dsb: 15pmol/µL (forward e reverse) Canis: 1pmol/µL (forward e reverse)	1 µL
Taq Platinum	[5U/µL]	0,2 µL
DNA	[200 a 600 ng/µL]	1 µL

Inicialmente as amostras foram desnaturadas a 95°C por dois minutos, seguida de uma sequência de 50 ciclos repetidos de 15 segundos a 95°C (desnaturação da fita de DNA), 30 segundos a 58°C (pareamento dos iniciadores) e 30 segundos a 72°C (extensão da cadeia) (tabela 3). A quantidade de ciclos interfere no resultado final, sendo que, a amplificação ideal do controle positivo ocorre com 50 ciclos. Considera-se positivo para erliquiose as amostras cujos produtos de amplificação por PCR apresentam as bandas de 409 pb e 230 pb referentes a banda específica para *E. canis* e o controle positivo, respectivamente. Os iniciadores para erliquiose foram desenhados a partir da sequência do gene *dsb*, conforme publicado por AGUIAR (2006) (tabela 1).

Tabela 3: Condições da amplificação por PCR.

Etapas	-
Desnaturação inicial	95°C / 5 minutos
Número de ciclos	50
Desnaturação	95°C / 15 segundos
Anelamento	58°C / 30 segundos
Extensão	72°C / 30 segundos
Extensão Final	72°C / 5 minutos

4.4- LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

A tecnologia da amplificação isotérmica de DNA foi desenvolvida por NOTOMI *et al.*, em 2000. Através desta tecnologia é possível amplificar sequências de DNA com grande especificidade. O LAMP utiliza uma DNA Polimerase com atividade de deslocamento de fita (*strand displacement activity*), a *Bst* DNA Polimerase (*Bacillus stearothermophilus*). Este permite a amplificação isotérmica de sequências de DNA e RNA da ordem de 10^9 a 10^{10} , em tempos que variam entre 15 a 60 minutos (NOTOMI *et al.*, 2000).

A tecnologia LAMP utiliza um conjunto de quatro iniciadores específicos, desenhados a partir da sequência que se deseja amplificar. Estes iniciadores são denominados genericamente de FIP (*forward inner primer*), F3, B3 e BIP (*backward inner primer*) e são desenhados a partir de seis segmentos específicos da sequência a ser amplificada (figura 5).

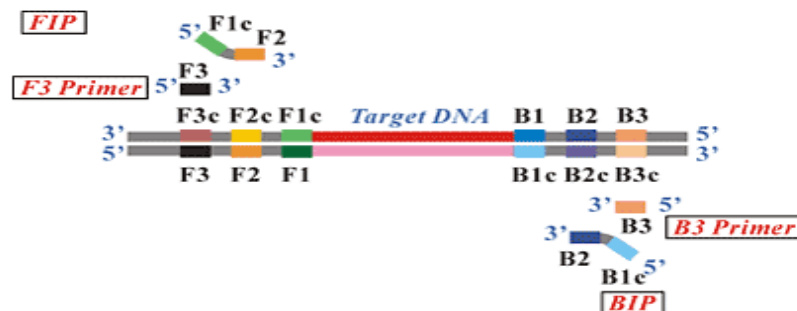


Figura 5: A figura mostra o desenho dos quatro iniciadores: FIP, F3, BIP e B3, que são realizados a partir de seis distintas regiões da sequência alvo: F3c, F2c e F1c presentes na extremidade 3', e B1, B2 e B3 na extremidade 5'. (Target DNA = DNA alvo)

Há duas etapas de amplificação na técnica de LAMP, que inclui a etapa não-cíclica e etapa cíclica (USHIKUBO, 2004). A estrutura em forma de grampo (também chamada de halteres) é a que dá nome à técnica e esta estrutura é formada após oito passos de reação sucessiva da etapa não-cíclica da técnica de LAMP (figura 6).



Figura 6: Estrutura formada após oito passos sucessivos de reação, na etapa não-cíclica, com grampos nas extremidades 3' e 5'. Esta estrutura serve como molde para a amplificação cíclica propriamente dita.

4.4.1- Etapa não-cíclica

Na etapa não-cíclica (figura 7) há a formação de *loops* (voltas) em cada extremidade do DNA que servem de estrutura de partida para a amplificação pelo ciclo do LAMP. (NOTOMI *et al.*, 2000,; USHIKUBO, 2004).

Através da atividade da *Bst* DNA polimerase (que faz a atividade de deslocamento da fita), uma fita de DNA complementar ao DNA molde é sintetizada a partir da região 3' final da região F2 do iniciador FIP (figura 7 – 1 e 2). O anelamento do iniciador F3 na região F3c, libera o FIP do DNA alvo e inicia a síntese do DNA (figura 7 – 3). A fita dupla é formada a partir da fita de DNA sintetizada pelo iniciador F3, a partir do DNA molde (figura 7 - 4). O iniciador FIP ligado à cadeia complementar é liberado como fita simples (figura 7 - 5), então esta fita liberada forma um laço no final 5' porque a região F1c é complementar a região F1 (figura 7 - 6). O DNA de fita simples, por sua vez, serve como molde para o anelamento do iniciador BIP, iniciando a síntese do DNA, e subsequentemente faz-se o anelamento do iniciador B3 partindo da região 3' final da fita molde (figura 7 – 6 e 7), liberando a fita simples de DNA complementar sintetizada pelo BIP, formando as voltas na estrutura em cada extremidade (figura 7 - 8).

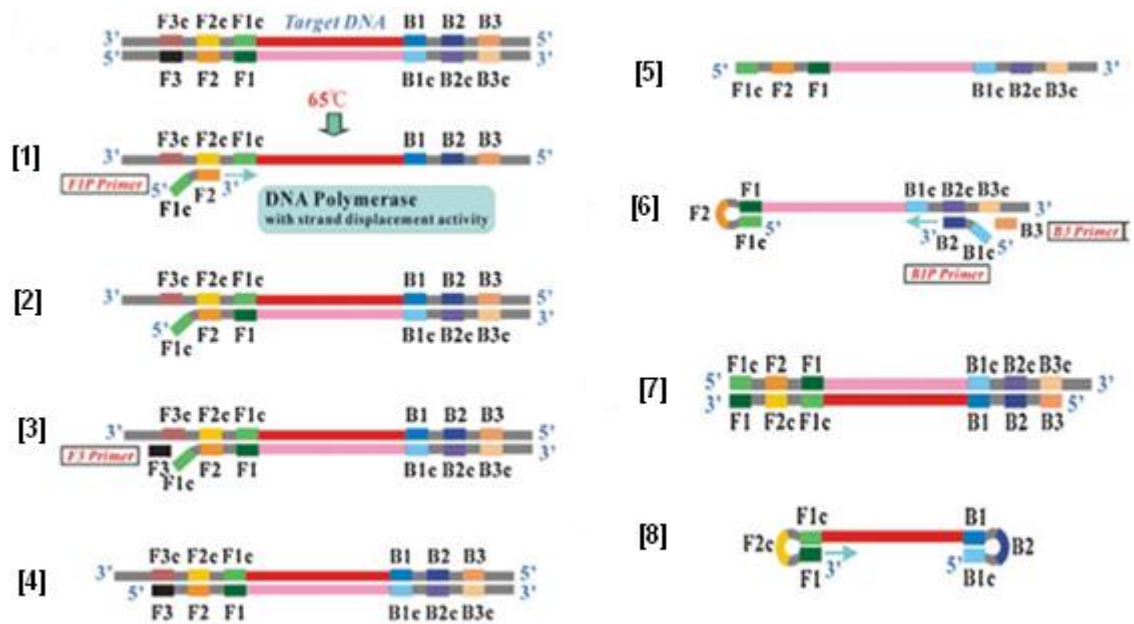


Figura 7: Princípios de amplificação por LAMP. Etapa não-cíclica [1 - 8]: Inicialmente, a atividade da *Bst* DNA polimerase ajuda na síntese de uma fita de DNA complementar, a começar pelo iniciador FIP. O iniciador exterior F3, em seguida, desloca o FIP ligado a cadeia complementar, que constitui uma estrutura-haste de loop no final 5'. Esta estrutura serve como modelo para o iniciador BIP iniciar a síntese de DNA e subsequentemente o iniciador B3 inicia o deslocamento da fita. O produto final é uma estrutura em forma de halteres em ambas as extremidades, que está pronto para entrar na etapa de amplificação cíclica (Eiken Chemical Co.Ltd).

4.4.2- Etapa cíclica

Na etapa cíclica (figuras 8 e 9) o iniciador FIP se anela na fita simples da estrutura em forma de halteres sintetizando o DNA (figura 8 – a). A cadeia única liberada forma grampos no final da região 3' porque a região B1 e B1c são complementares (figura 8 – b). Nesta etapa a síntese do DNA é feita a partir da região B1, começando a usar a sua auto-estrutura como molde, liberando o iniciador FIP e sua cadeia complementar (figura 8 – c). A fita simples liberada forma outra estrutura do tipo grampo (estrutura inicial do ciclo de LAMP), pois as regiões F1 - F1c e B1 – B1c são complementares (figura 8 – d). Além disso, temos o anelamento do iniciador BIP na região B2c (figura 8 – e). Como resultado deste processo, temos várias estruturas que se repetem alternadamente, múltiplos da estrutura inicial de

grampo duplo (figura 8 – f). A reação cíclica contínua libera cerca de 10^9 exemplares do alvo em menos de uma hora.

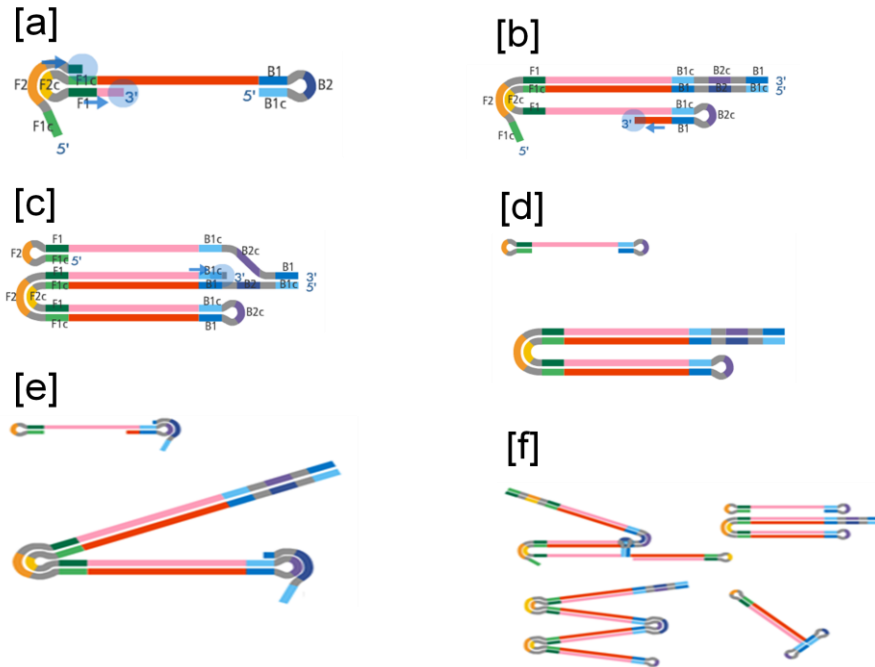


Figura 8: As seis figuras acima ilustram a etapa cíclica da reação de LAMP, onde é demonstrado desde o encaixe do primeiro iniciador FIP [a] desta etapa, até o resultado deste processo, onde temos várias estruturas que se repetem alternadamente, múltiplas da estrutura inicial em forma de grampo duplo [e].

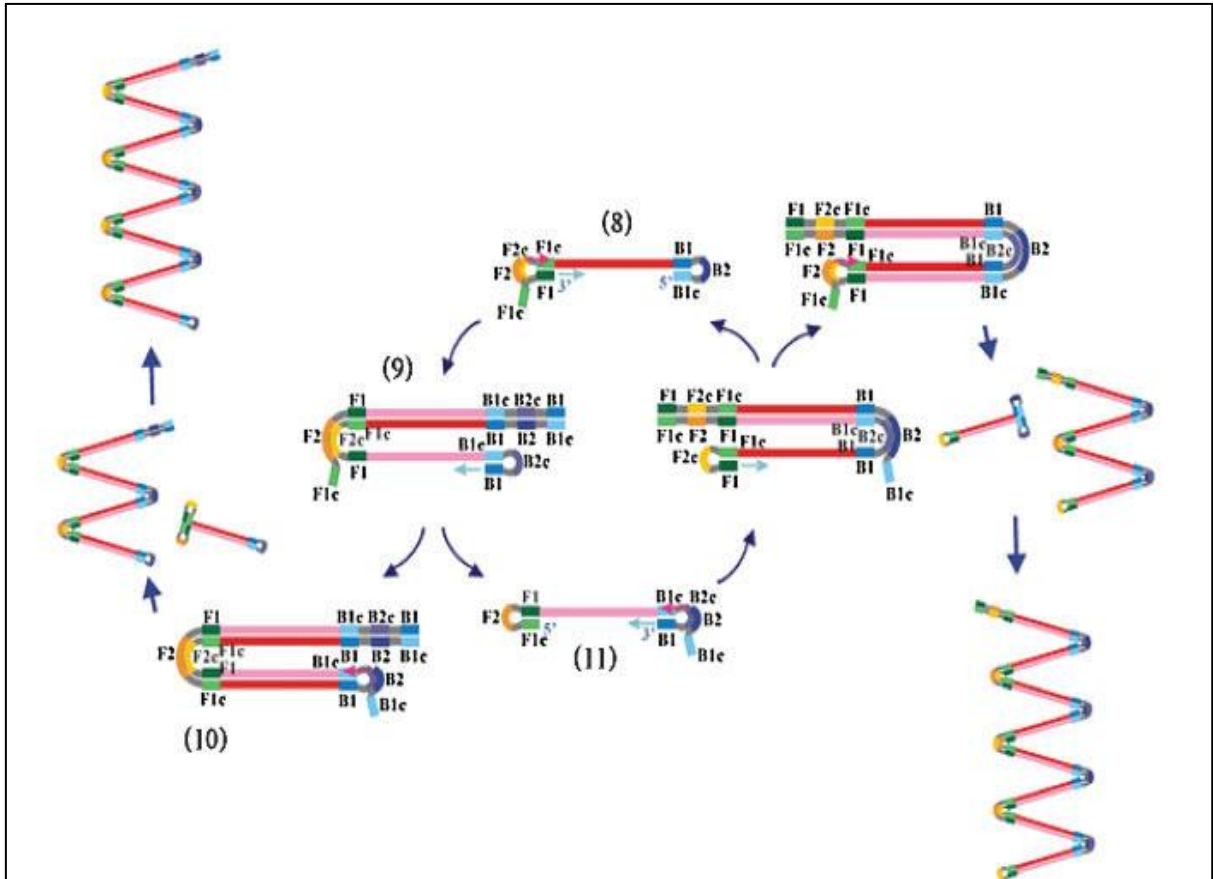


Figura 9: Princípios de amplificação por LAMP. Etapa cíclica [9 - 11]: etapa exponencial empregando os iniciadores loop internos. Como resultado deste processo, temos várias estruturas que se repetem alternadamente, múltiplos da estrutura inicial de grampo duplo (Eiken Chemical Co.Ltd).

A empresa japonesa que comercializa os kits e reagentes para o LAMP, Eiken Chemical Co.Ltd., disponibiliza o software “Primer Explorer” em sua página na internet que auxilia no desenho dos iniciadores (<http://primerexplorer.jp/e/>), e explica detalhadamente, com animações, o princípio do LAMP (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>).

O desenho dos quatro iniciadores FIP, F3, BIP e B3 é realizado a partir de seis distintas regiões da sequência alvo: F3c, F2c e F1c presentes na extremidade 3', e B1, B2 e B3 na extremidade 5'. Assim como ocorre com os iniciadores utilizados em reações de amplificação por PCR, os iniciadores utilizados no LAMP devem seguir alguns princípios básicos, tais como: dependendo da quantidade de GC ou AT devem possuir um T_m entre 55°C e 65°C; a distância entre a extremidade

5' de F2 e B2 deve ser de 120 a 180 pb; os iniciadores devem ser desenhados de maneira a não apresentarem complementaridade (Extraído da página da internet da empresa Eiken Chemical Co. Ltd.).

Os iniciadores que foram utilizados para amplificação por LAMP foram desenhados nas mesmas regiões dos iniciadores utilizados para amplificação por PCR (gene *dsb*). O desenho dos iniciadores foi realizado utilizando o software Iniciador Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) (figura 10).

Primer Information								
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrat	Sequence
2	ID:6	dimer(minimum)	dG=-1.52					
F3	1063	1083	21	55.47	-5.35	-4.85	0.38	CACGAAAAATATCAGGGTTCT
B3	1245	1264	20	56.19	-4.51	-4.10	0.40	GCTTTTGCAAGTCAAGAGAA
FIP			47					GGATGATGTTGCTGAGGAAGAA-GAGTTTTAGTAAAGATGTTTTACG
BIP			47					ATTTGCATGGCTGTAATACAACAGC-ATGTTGTTTGTTCATGTGTAG
F2	1084	1108	25	56.59	-4.01	-5.35	0.32	GAGTTTTAGTAAAGATGTTTTACG
F1c	1124	1145	22	60.12	-4.76	-3.87	0.45	GGATGATGTTGCTGAGGAAGAA
B2	1219	1240	22	55.00	-4.21	-4.23	0.32	ATGTTGTTTGTTCATGTGTAG
B1c	1158	1182	25	62.57	-4.56	-5.40	0.40	ATTTGCATGGCTGTAATACAACAGC

Figura 10: Informações cedidas pelo software Iniciador Explorer V4, disponível em: (<http://iniciadorexplorer.jp/e/>).

Foram utilizadas reações de amplificação por LAMP contendo: 100 ng de DNA quantificadas em NanoDrop™; 1,25 mol/L de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega®); 1,0 μmol/L de cada iniciador FIP e BIP a 15 pmol/μL e B3 e F3 a 5 pmol/μL (tabela 4); 8U/μL de *Bst* DNA Polimerase (*Bst Polymerase, Large Fragment* - BioLabs®); 2,5 μmol/L de solução tampão contendo 20 mmol/L de Tris-HCl, 10 mol/L de KCl, 10 mol/L de (NH₄)₂SO₄, 2 mol/L de MgSO₄, 0,1% de Triton X – 100 e Betaína 1,8 M. Foi adicionado a solução água ultrapura autoclavada para completar 25 μL e a amplificação foi efetuada em termociclador automático com gradiente de temperatura da Applied Biosystem®, modelo Veriti, e em banho seco (Digital Dry Baths - Labnet®). Em cada série, foram incluídos controles positivo e negativo (água).

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE tamponado, revelados com GelRed - Biotium® em

transiluminação ultravioleta. Compararam-se os fragmentos amplificados com marcadores de DNA de 100 pares de base (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®).

Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação por LAMP do gene *dsb*.

Iniciador	Sequência (5' - 3')
F3_DSB	5' CACGAAAAATATCAGGGTTCT 3'
B3_DSB	5' GCTTTTGCAAGTCAAGAGAA 3'
FIP_DSB	5' GGATGATGTTGCTGAGGAAGAATTTTGAGTTTTAGTAAAGATGTTTTACAG 3'
BIP_DSB	5' GCATGGCTGTAATACAACAGCATTTTATGTTGTTTGTTCATGTGTAG 3'

4.4.3- Protocolo utilizado na amplificação por LAMP

A concentração e quantidade dos reagentes empregados na reação por LAMP estão demonstrados na tabela 5, e foram padronizadas para um volume final de 25 µL.

Tabela 5: Concentração e quantidade dos reagentes empregados no LAMP, para um volume final de 25 µL.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O (ultrapura autoclavada)	-	8,5 µL
Tampão	[10x]	2,5 µL
Betaina	[5mol/L]	4,0 µL
dNTP	[1,25mol/L cada]	4,0 µL
Iniciadores	Fip e Bip: 15pmol/µL F1 e B1: 5pmol/µL	1,0 µL
<i>Bst</i> DNA Polimerase	[8U/µL]	1,0 µL
DNA	[200 a 600 ng/µL]	1,0 µL

Como a técnica de LAMP se caracteriza por ser uma técnica isotérmica (transformação termodinâmica na qual a temperatura é mantida constante), a temperatura constante de reação foi padronizada sendo 63°C durante um tempo de 60 minutos.

5- Resultados e Discussão

5.1- Extração do DNA

A extração do DNA genômico, foi realizada pelo protocolo reformulado de extração de sangue utilizando Brazol - LGC do Brasil (CHOMCZYNSKI *et al.*, 1987), o qual se apresentou mais eficaz do que a extração com proteinase K, em um menor tempo de execução e foi padronizada de forma que otimizássemos a utilização do reagente, sendo que conseguimos utilizar uma menor quantidade de Brazol, e obtivemos excelentes amostras de DNA genômico, caracterizada por não ter rastro (figura 11). Diminuímos também a quantidade de lavagens do DNA com isopropanol, onde após esse passo lavamos diretamente com etanol 70%. Deixamos secar e ressuspendemos com 30 μ L de água ultrapura autoclavada.

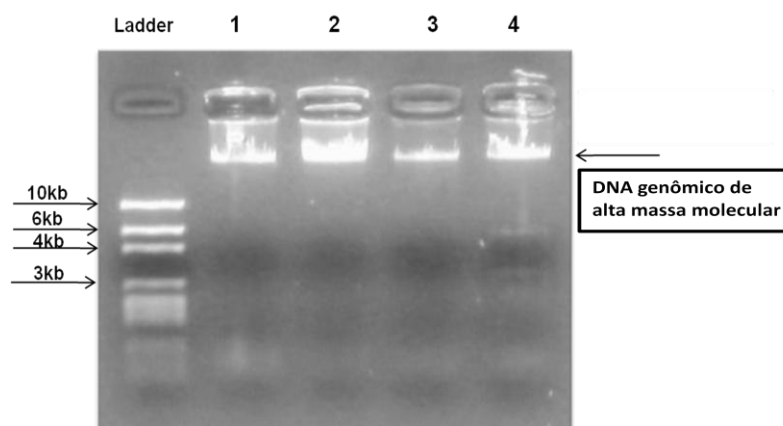


Figura 11: Foto do gel de quantificação, mostrando quatro amostras extraídas pelo protocolo modificado de Brazol, mostrando a extração do DNA genômico de alta massa molecular, não degradado, onde as amostras possuem um valor aproximado de 300, 500, 200, 350 ng de DNA/ μ L respectivamente. Gel de agarose 1,0% corado com GelRed - Biotium® e visualização em transiluminação ultravioleta.

O DNA extraído é total, portanto em cada amostra há uma grande concentração de DNA do cão, além de conter também DNA de outros microorganismos que possam estar presentes. Estes não interferem no resultado final, pois os iniciadores são específicos para Eriquiiose.

A tabela 6 mostra as concentrações de DNA para cada amostra extraída. Os resultados obtidos variaram de aproximadamente 200 ng a 600 ng de DNA/ μL , e foram comparados com o padrão molecular *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen®). Para resultados mais objetivos utilizamos em algumas dessas amostras a quantificação por NanoDrop™. Os melhores resultados de análise foram obtidos quando utilizamos o DNA recém extraído.

Tabela 6: Concentração do DNA, extraído pelo protocolo modificado de Brazol, nas amostras do canil e de clínicas veterinárias, respectivamente.

Amostras do canil	Concentração do DNA (ng/μL)	Amostras de clínicas	Concentração do DNA (ng/μL)
cao_01	300	vet_01	350
cao_02	500	vet_02	250
cao_03	200	vet_03	200
cao_04	350	vet_04	250
cao_05	300	vet_05	250
cao_06	250	vet_06	250
cao_07	300	vet_07	550
cao_08	200	vet_08	300
cao_09	350	vet_09	400
cao_10	600	vet_10	250
cao_11	250	vet_11	300
cao_12	250	vet_12	250
cao_13	350	vet_13	200
cao_14	250	vet_14	200
cao_15	350	vet_15	250
cao_16	300	vet_16	300
cao_17	250	vet_17	400
cao_18	400	vet_18	350
cao_19	450	vet_19	200
cao_20	250	vet_20	350
cao_21	300	vet_21	350
cao_22	300	vet_22	200
cao_23	350	vet_23	200
cao_24	550	vet_24	250
cao_25	250	vet_25	300
cao_26	450	vet_26	200
cao_27	600	vet_27	350
cao_28	400	vet_28	550
cao_29	250	vet_29	200

cao_30	300
cao_31	250
cao_32	300
cao_33	300
cao_34	350
cao_35	300
cao_36	400
cao_37	350
cao_38	250
cao_39	200
cao_40	250
cao_41	300
cao_42	300
cao_43	400
cao_44	200
cao_45	200
cao_46	250
cao_47	250
cao_48	250
cao_49	300
cao_50	450
cao_51	200
cao_52	200
cao_53	250
cao_54	300
cao_55	200
cao_56	350
cao_57	550
cao_58	200
cao_59	250
cao_60	250
cao_61	250
cao_62	450
cao_63	300
cao_64	400
cao_65	250
cao_66	300
cao_67	600
cao_68	500
cao_69	400
cao_70	450
cao_71	300
cao_72	400

vet_30	250
vet_31	550
vet_32	200
vet_33	250
vet_34	200
vet_35	250
vet_36	550
vet_37	450
vet_38	250
vet_39	300
vet_40	300
vet_41	350
vet_42	250
vet_43	250
vet_44	200
vet_45	350
vet_46	450
vet_47	200
vet_48	200
vet_49	250
vet_50	300
vet_51	200
vet_52	350
vet_53	550
vet_54	200
vet_55	250
vet_56	450
vet_57	200
vet_58	250
vet_59	200
vet_60	250
vet_61	550
vet_62	250
vet_63	250
vet_64	300
vet_65	300
vet_66	350
vet_67	250
vet_68	250
vet_69	200
vet_70	350
vet_71	350
vet_72	200

cao_73	350
cao_74	350
cao_75	200
cao_76	250
cao_77	300
cao_78	450
cao_79	200
cao_80	200
cao_81	250
cao_82	300
cao_83	200
cao_84	350
cao_85	450
cao_86	200
cao_87	250
cao_88	250
cao_89	300
cao_90	200

vet_73	250
vet_74	350
vet_75	200
vet_76	250
vet_77	200
vet_78	250
vet_79	550
vet_80	450
vet_81	250
vet_82	300
vet_83	300
vet_84	350
vet_85	250
vet_86	250
vet_87	200
vet_88	350
vet_89	250
vet_90	200
vet_92	250

5.2- PCR (reação em cadeia da polimerase)

Os resultados obtidos se mostraram condizentes com ANDERSON *et al.* (1992), onde foi dito que a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido usada com sucesso para amplificar o DNA de *E. canis* de cães infectados.

Os oligonucleotídeos para o diagnóstico de erliquiose foram baseados na sequência do gene da Tio-dissulfóxido-oxireductase (*dsb*). Este gene foi caracterizado em várias bactérias, sendo recentemente identificado no gênero *Ehrlichia* (MCBRIDE *et al.*, 2002). O *dsb* codifica a proteína responsável pelas ligações dissulfídicas (*disulfide bond - dsb*) das bactérias. Apesar disso, tem a sequência de DNA bastante polimórfica entre as diferentes espécies de bactérias, sendo útil para ensaios moleculares de alta especificidade (KUYLER DOYLE *et al.*, 2005). A amplificação por PCR do gene *dsb* de *E. canis* mostrou-se altamente específica e eficiente.

Segundo AGUIAR. (2006), o fragmento do gene *dsb* obtido pela amplificação por PCR, demonstrou completa conservação entre as amostras estudadas de *E.*

canis, em contraste com as outras espécies de *Ehrlichia*, o qual variou de 74% a 81% de similaridade. Estes resultados concordam com KUYLER DOYLE *et al.* (2005), os quais afirmam que o gene *dsb* é altamente conservado entre as espécies do gênero *Ehrlichia*. Mesmo assim, o gene possui regiões de ácido nucléico, suficientemente heterólogas, que permite ser utilizado como alvo específico para PCR de *E. canis*. Os resultados mostraram-se concordantes à análise da sequência de aminoácidos da proteína *dsb*, a qual se revelou idêntica ao isolado Jake (AF403710) e divergente das outras espécies de *Ehrlichia* (AGUIAR, 2006). Segundo MCBRIDE *et al.* (2002), a *dsb* possui até 87% de homologia entre as espécies *E. canis* e *E. chaffeensis*, descartando desse modo as reações cruzadas.

A metodologia da PCR amplifica amostras positivas com até 10pg de DNA total (figura 12), e é independente da concentração inicial, ou seja, todas as amostras com DNA em concentração maior do que 10pg de DNA total amplificam normalmente, sem falsos positivos ou negativos, deixando claro que é preciso as duas bandas (230pb e 409pb) para que o diagnóstico tenha valor. A extração do DNA tem que ter sido realizada em até 20 dias antes da amplificação, para evitar falsos negativos. O nested-PCR também teve resultados satisfatórios (figura 13), como descrito por WEN *et al.* em 1997, e confirmado no respectivo trabalho.

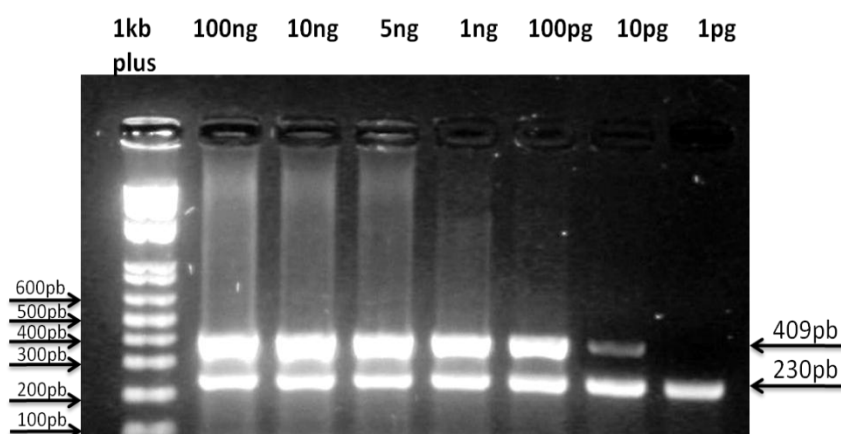


Figura 12: A amostra quantificada em NanoDrop, mostrando um gradiente com a técnica de PCR, onde é possível se diagnosticar a Eriliquiose em até 10pg de DNA total. 1kb= Marcador de massa molecular INVITROGEN®. Gel de agarose 1,5%, corado com GelRed - Biotium® e visualização em transiluminação ultravioleta.

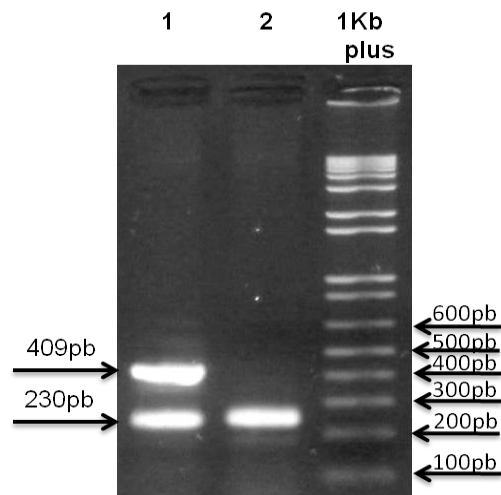


Figura 13: Gel de Agarose 1,5% corado com GelRed - Biotium® com visualização em transiluminação ultravioleta, mostrando o produto do nested-PCR com 2 amostras, sendo a amostra 1 positivas para Erliquiose e a amostra 2 apresentando somente o controle de reação, mostrando ser negativa para Erliquiose. 1kb= Marcador de massa molecular INVITROGEN®.

Após a conclusão de todos os testes, desde otimização do protocolo de extração, onde padronizamos o reagente Brazol - LGC do Brasil para ser usado na extração do DNA das amostras de sangue, a *T_m* específica, que foi padronizada para amplificar dois diferentes conjuntos de iniciadores, passando pela quantidade de ciclos exatos, a concentração mínima e máxima de DNA possível para que não tenha possibilidades de falsos negativos e falsos positivos, chegamos aos resultados esperados nesta etapa, que era a padronização do teste por PCR (figura 14).

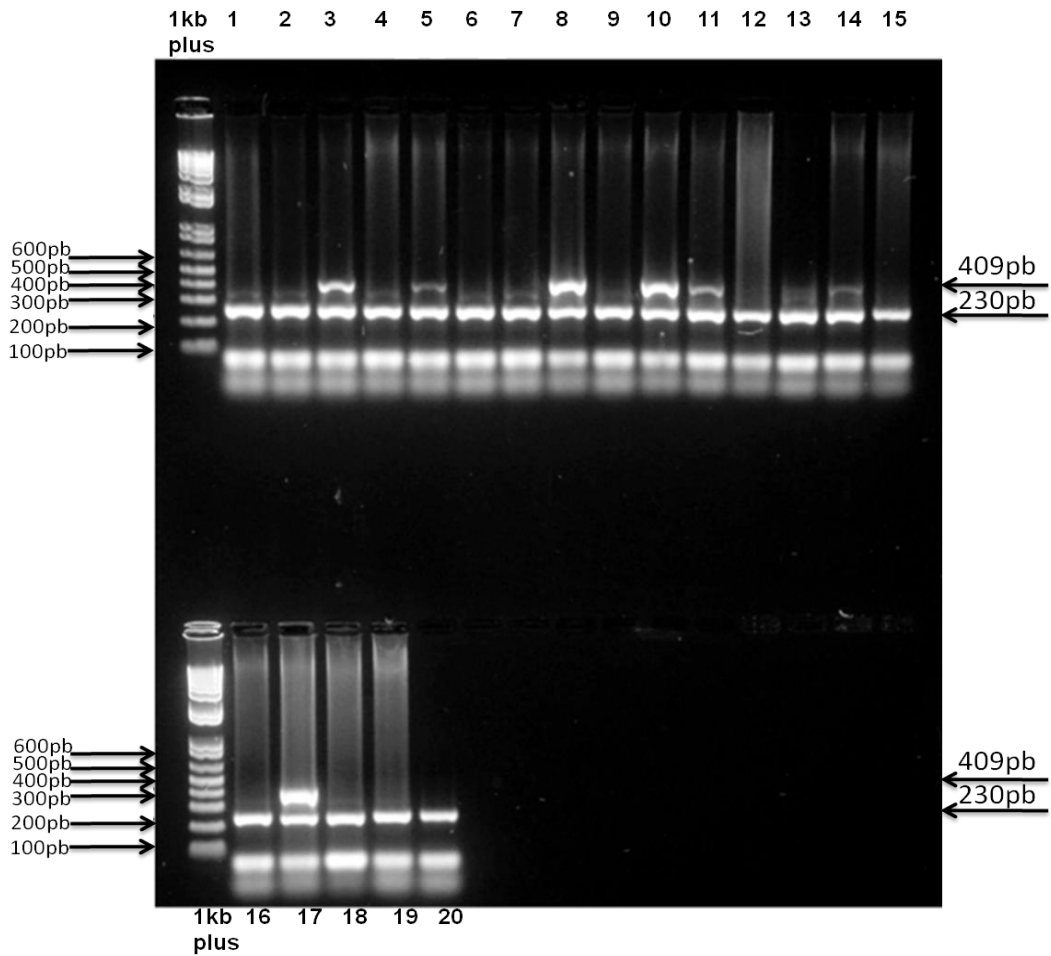


Figura 14: Gel de Agarose 1,5% corado com GelRed - Biotium® com visualização em transiluminação ultravioleta, mostrando o produto da PCR com 20 amostras, sendo 8 positivas para Erliquiose. As amostras positivas possuem a banda de 409pb. A banda com 230pb é referente ao controle de reação. 1kb= Marcador de massa molecular INVITROGEN®.

No canil municipal, onde foram coletadas 90 amostras de animais, 80% deles estavam infectados com a doença, e quanto às amostras recebidas das clínicas particulares 40% apresentaram a doença (tabela 7).

Tabela 7: Amostras infectadas por *Ehrlichia canis*, no canil municipal e em clínicas veterinárias.

Amostras canil	PCR
cao_01	x
cao_02	x
cao_03	x
cao_04	x
cao_05	x
cao_06	x
cao_07	x

Amostras de clínicas	PCR
vet_01	
vet_02	
vet_03	x
vet_04	
vet_05	x
vet_06	
vet_07	

cao_08	x
cao_09	x
cao_10	x
cao_11	x
cao_12	
cao_13	x
cao_14	x
cao_15	x
cao_16	x
cao_17	x
cao_18	x
cao_19	x
cao_20	x
cao_21	
cao_22	x
cao_23	x
cao_24	
cao_25	x
cao_26	x
cao_27	x
cao_28	x
cao_29	x
cao_30	x
cao_31	x
cao_32	x
cao_33	x
cao_34	x
cao_35	
cao_36	x
cao_37	
cao_38	x
cao_39	
cao_40	x
cao_41	x
cao_42	x
cao_43	x
cao_44	
cao_45	x
cao_46	x
cao_47	
cao_48	
cao_49	x
cao_50	x
cao_51	x
cao_52	x
cao_53	x
cao_54	
cao_55	
cao_56	
cao_57	x
cao_58	x
cao_59	x
cao_60	x
cao_61	x
cao_62	x
cao_63	x
cao_64	
cao_65	
cao_66	x
cao_67	x

vet_08	x
vet_09	
vet_10	x
vet_11	x
vet_12	
vet_13	x
vet_14	x
vet_15	
vet_16	
vet_17	x
vet_18	
vet_19	
vet_20	x
vet_21	
vet_22	
vet_23	
vet_24	
vet_25	x
vet_26	x
vet_27	x
vet_28	x
vet_29	x
vet_30	
vet_31	
vet_32	
vet_33	x
vet_34	
vet_35	
vet_36	x
vet_37	
vet_38	
vet_39	x
vet_40	x
vet_41	
vet_42	
vet_43	
vet_44	
vet_45	x
vet_46	
vet_47	
vet_48	x
vet_49	
vet_50	x
vet_51	x
vet_52	x
vet_53	
vet_54	
vet_55	
vet_56	x
vet_57	
vet_58	
vet_59	
vet_60	
vet_61	
vet_62	
vet_63	
vet_64	x
vet_65	
vet_66	x
vet_67	

cao_68	
cao_69	x
cao_70	x
cao_71	
cao_72	
cao_73	x
cao_74	
cao_75	x
cao_76	x
cao_77	
cao_78	x
cao_79	x
cao_80	x
cao_81	
cao_82	x
cao_83	x
cao_84	x
cao_85	x
cao_86	x
cao_87	x
cao_88	x
cao_89	x
cao_90	x

vet_68	
vet_69	x
vet_70	x
vet_71	
vet_72	x
vet_73	
vet_74	x
vet_75	
vet_76	
vet_77	
vet_78	x
vet_79	
vet_80	
vet_81	x
vet_82	
vet_83	x
vet_84	
vet_85	
vet_86	
vet_87	x
vet_88	x
vet_89	x
vet_90	
vet_91	
vet_92	x

Os resultados obtidos com as amostras cedidas pelas clínicas veterinárias foram comparados com as lâminas que foram cedidas pelos veterinários (figura 15), mostrando que as amostras que possuíam mórulas visíveis também foram detectadas por PCR. Em algumas amostras, não foi possível a visualização pela microscopia, mas foram detectadas pela técnica de PCR.

Todas as amostras enviadas a nós pelas clínicas tiveram relatos de sintomas de erliquiose ou infestações por carrapatos, já as amostras do canil municipal não tinham qualquer prognóstico, apesar dos animais não estarem em condições exemplares de higiene e cuidados.

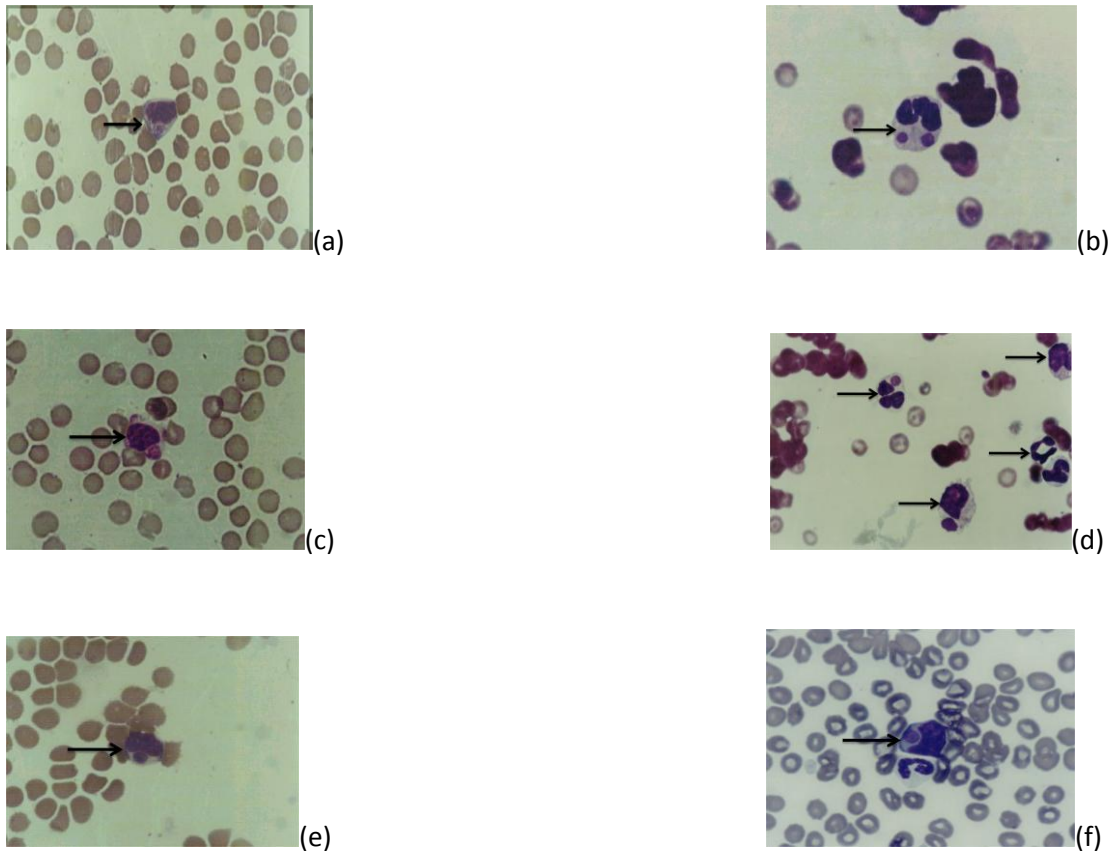


Figura 15: Fotos de microscopia óptica (50x), corado com HE (Hematoxilina-Eosina). As setas indicam as mórulas encontradas em células mononucleares, nas amostras de sangue periférico de animais infectados. Estas amostras também foram positivas para erliquiose quanto foram submetidas aos testes pelas técnicas de PCR e LAMP, mostrando que as técnicas não resultaram em falso negativo. Foto cedida pela UNICASTELO.

5.3- LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*).

A amplificação de ácidos nucleicos é uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de doenças infecciosas. Diversos métodos de amplificação estão disponíveis, incluindo o PCR que é o mais utilizado em várias formas como a PCR de transcrição reversa (RT-PCR), Nested-PCR e a PCR multiplex.

Estes métodos baseados em PCR necessitam de instrumentos precisos, tendo vários inconvenientes intrínsecos, como a exigência de ciclos térmicos longos, além disso, eles têm um alto custo de implantação, tornando a técnica não adaptável para uso clínico de rotina, especialmente em serviços públicos de saúde.

O diagnóstico pela metodologia LAMP possibilita a identificação de animais infectados com mínima estrutura laboratorial, não necessitando de equipamentos sofisticados, diminuindo o custo e viabilizando a utilização dessa metodologia de diagnóstico para qualquer clínica veterinária ou instituições de ensino com baixo custo.

A nova geração de amplificação de genes é caracterizada pelo uso de quatro diferentes iniciadores especialmente concebidos para reconhecer seis regiões alvo. A amplificação procede de uma temperatura constante, sendo completada em uma única etapa, podendo até ser realizada em um banho seco.

O desenho dos iniciadores é crucial para a realização de amplificação por LAMP. O *software "Primer Explorer"* é disponibilizado na página da internet (<http://primerexplorer.jp/e/>) e auxilia no desenho dos iniciadores, que precisam ser altamente específicos. As sequências para amplificação por LAMP incluem um conjunto de quatro iniciadores: dois externos e dois internos (figuras 5, 6 e 7). Os dois iniciadores externos são descritos como iniciador anterior (F3) e iniciador posterior (B3) e têm um papel no deslocamento da fita durante a vertente não-cíclica em um passo único. Os iniciadores internos foram descritos como anteriores (FIP) e posteriores (BIP), desenhados de tal forma que eles auxiliem na formação do ciclo.

O desenho acima mencionado dos quatro tipos de iniciadores é baseado nas seguintes seis regiões distintas da sequência alvo: o F3c, F2c, F1c na região 3' e B1, B2, B3 na região 5'.

O iniciador FIP consiste da região F2 (3' final), que é complementar à região F2c mais a mesma sequência da região F1c no final 5'. BIP consiste na região B2 (3' final), que é complementar para a região B2c mais a mesma sequência do B1c na região no final 5'. O iniciador externo F3 consiste da região F3, que é complementar a região F3c e o iniciador B3 consiste da região B3, que é complementar a região B3c (figura 16).

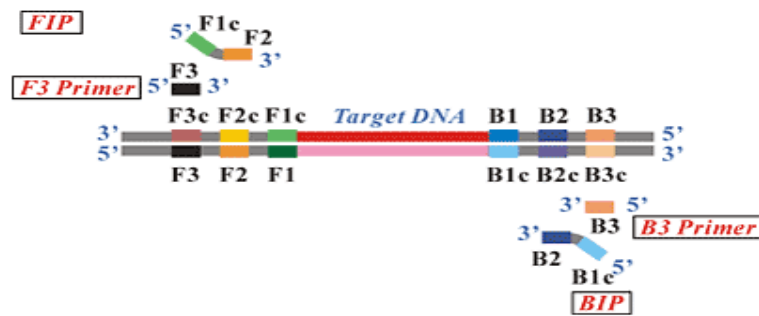


Figura 16: Representação esquemática do desenho dos quatro iniciadores FIP, F3, BIP e B3 que amplificam seis distintas regiões da sequência alvo: F3c, F2c e F1c presentes na extremidade 3', e B1, B2 e B3 na extremidade 5'.

Além disso, os seguintes critérios foram considerados para obter um conjunto de iniciadores para LAMP com excelente combinação de sensibilidade e especificidade: 1) a quantidade de G e C dos iniciadores deve ser de cerca de 50-60% e cerca de 40-50% de A e T; 2) Os iniciadores devem ser concebidos de modo a não formarem facilmente estruturas secundárias; 3) A distância entre 5' final de F2 e B2 devem ser 120-180 pb, e a distância entre F2 e F3 bem como B2 e B3 deve ser 0-20 pb; 4) A distância para o laço formando regiões (5' de F2 a 3' de F1, 5' de B2 a 3' de B1) deve ser de 40-60 pb.

Na análise em gel de agarose, as amplificações por LAMP revelam uma escada como padrão, em contraste com uma única banda como observado na reação por PCR. Isto é devido ao resultado final da amplificação por LAMP, que forma as múltiplas estruturas que se repetem alternadamente.

A principal característica da amplificação por LAMP é a sua capacidade de amplificar o ácido nucléico em condições isotérmicas, tendo alta especificidade e eficiência de amplificação no intervalo de 60°C à 65°C, permitindo a utilização de equipamentos de reação simples e de custo efetivo. A alta eficiência de amplificação do LAMP é atribuída a nenhuma perda de tempo em relação à mudança térmica pelo fato de sua reação ser isotérmica. Além disso, a amplificação e detecção do gene pode ser realizada em uma única etapa, por incubação da mistura de amostra de genes, iniciadores, DNA polimerase e substratos a uma temperatura constante. Ele fornece amplificação de alta eficiência, amplificando o DNA de 10^9 à 10^{10} vezes

em 15-60 minutos (extraído da página da internet da empresa Eiken Chemical Co. Ltd.).

Sua especificidade é extremamente alta porque pode amplificar uma única sequência do genoma humano, discriminando uma diferença em um único nucleotídeo. LAMP é um método de amplificação do gene com uma variedade de características e aplicações e uma ampla variedade de campos, incluindo o diagnóstico clínico, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) a caracterização e quantificação do DNA (PARIDA *et al.*, 2008).

A sensibilidade e especificidade da amplificação por LAMP é atribuída diretamente aos quatro conjuntos de iniciadores, abrangendo seis distintas sequências do gene alvo que estão sendo usadas para a amplificação. A amplificação só ocorre se todos os genes-alvo estiverem disponíveis. Em geral, a técnica de LAMP foi desenvolvida para ser de 10 a 100 vezes mais sensível que a técnica de PCR (HONG *et al.*, 2004; PARIDA *et al.*, 2005).

Além da construção dos iniciadores, a adição de betaína também foi usada para evitar a formação de estruturas secundárias durante a fase cíclica da amplificação por LAMP.

A técnica de LAMP mostrou-se eficiente em identificar animais infectados, com resultados rápidos e de fácil reprodução, podendo ser utilizadas em diagnósticos de erliquiose canina.

5.3.1- Amplificação por LAMP.

A metodologia LAMP amplifica amostras positivas com até 1 fg de DNA (figura 17), demonstrando uma maior eficiência do que a técnica de PCR, como apresentado na figura 12, onde a amostra só foi amplificada até 10 pg de DNA.

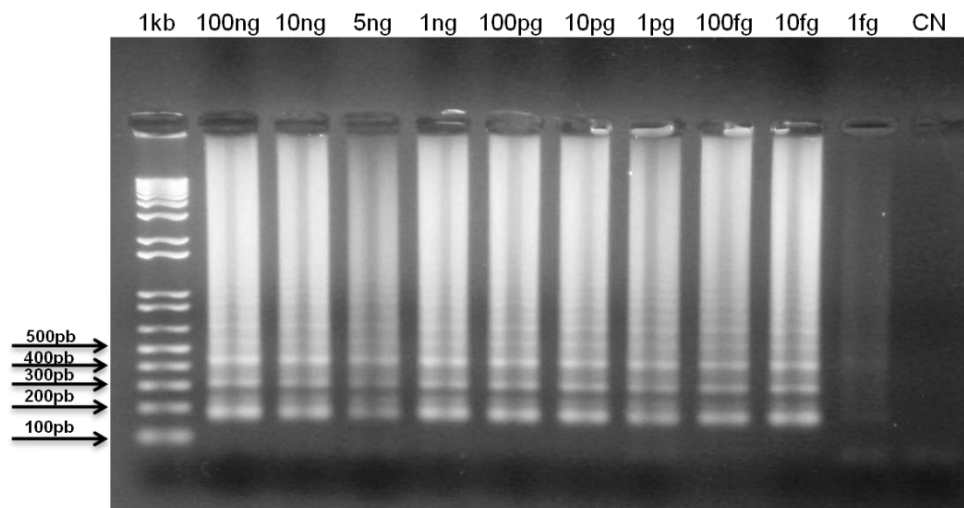


Figura 17: A amostra quantificada em NanoDrop™, mostra um gradiente com a técnica de LAMP, onde pode se diagnosticar a Erliquiose em até 1fg de DNA total. 1kb= Marcador de massa molecular INVITROGEN®, CN= controle negativo (água). Gel de agarose 1,5%, corado com GelRed - Biotium® e visualização por transiluminação ultravioleta.

Como podemos perceber na figura 17, a técnica de LAMP não amplifica as amostras linearmente, diminuindo a intensidade da banda conforme formos diminuindo a concentração do DNA. Como mostrado na figura 12, este padrão só ocorre na técnica de PCR, e isto foi mostrado também nos trabalhos publicados por LIN *et al.*, (2009), SALEH *et al.*, (2008), KAMACHI *et al.*, (2006), inclusive quando a técnica foi submetida ao *realtime*.

5.3.2- Visualização da amplificação por LAMP a olho nu.

O tubo contendo o produto de amplificação pode ser visualizado a olho nu, pois a reação também produz grandes quantidades de íon pirofosfato levando a um precipitado branco de pirofosfato de magnésio na mistura de reação. Dado que o aumento da turbidez da mistura de reação em função da produção de precipitado se correlaciona com a quantidade de síntese de DNA, as amostras que se encontram com esse precipitado apresentam positividade de reação. O acompanhamento em tempo real da reação por LAMP pode ser alcançado através da medição em tempo real de turbidez (MORI *et al.*, 2001).

O produto de amplificação também pode ser visualizado a olho nu, na presença de agentes fluorescentes intercalantes como o PicoGreen®, brometo de etídio, SYBR Green I, calceína, podendo também ser visto pela iluminação com uma lâmpada UV (figura 18). Na prática, após a amplificação por LAMP, foi adicionado à reação 1 µL de PicoGreen® (dsDNA, corante fluorescente intercalante) e pela observação de mudança de cor pudemos saber se a amostra tinha ou não sido amplificada. Em caso de amplificação positiva, a cor laranja original da tintura transforma-se em verde, que pode ser observada em luz natural, bem como à luz UV (302 nm) (figura 19), como confirmado por KARLESON *et al.*, (1995), IWAMOTO *et al.*, (2003), PARIDA *et al.*, (2008), SALEH *et al.*, (2008). No caso de não haver amplificação, a cor laranja original do corante será mantido. Esta mudança de cor é estável e, portanto, pode ser mantido para fins de registro, desde que não fiquem expostas a luz.

Assim, os métodos de análise da amplificação por LAMP demonstram resultados flexíveis e, portanto, mais sujeita a modificação para usar no campo ou em um laboratório modestamente equipado.

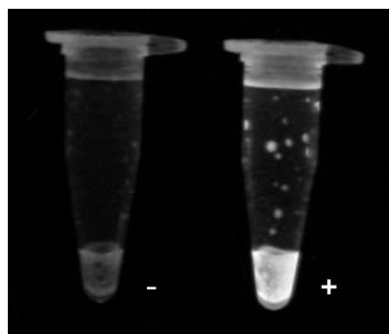


Figura 18: Foram realizadas duas amplificações por LAMP com DNA extraídos, um animal contaminado e um animal não contaminado, após a amplificação foi adicionado a reação 1 µL de PicoGreen® (conforme instruções do fabricante). Estas amostras foram submetidas a luz UV, onde claramente observa-se a diferença de cor, sendo que a amostra amplificada brilha na presença da luz UV, e a amostra não amplificada permanece sem brilho.

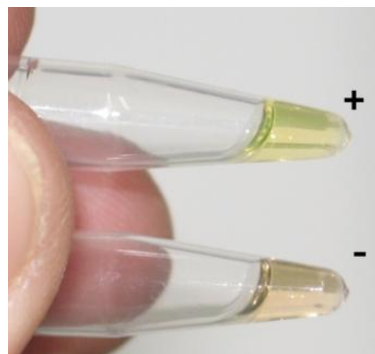


Figura 19: Foram realizadas duas amplificações por LAMP com DNA extraído, um animal contaminado e um animal não contaminado. Após a amplificação foi adicionado a reação 1 μ L de PicoGreen® mostrando claramente a diferença das cores a olho nu, onde a amplificação negativa apresenta a cor laranja e a amplificação positiva apresenta a cor verde.

5.3.3- Diagnóstico de Erliquiose sem extração do DNA

No presente trabalho foi testada também a utilização de enzimas que não necessitam de extração do DNA para que possam amplificar as amostras. Este procedimento foi possível devido ao uso da enzima Phusion™Flash DNA polimerase, que é uma enzima *hot start*, onde no *kit* encontramos todos os reagentes necessários para a PCR, exceto o DNA molde e os iniciadores.

A enzima Phusion™Flash DNA polimerase utiliza uma ligação reversível com uma proteína chamada Affibody®. Esta proteína inibe a atividade da DNA polimerase em temperatura ambiente, impedindo assim a amplificação de produtos não-específicos. Além disso, a Affibody® bloqueia a atividade da polimerase exonuclease 3'→ 5', impedindo a degradação dos iniciadores e do DNA molde durante o início da reação.

Segundo informações do fabricante a taxa de erro usando Phusion™Flash DNA polimerase é aproximadamente 25 vezes menor do que se usarmos *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerase e 3 vezes menor do que se usarmos a *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) DNA polimerase.

Devido à natureza da enzima Phusion™Flash DNA polimerase, a desnaturação inicial ocorre a temperatura de 98°C por 10 segundos. Por esta

enzima possuir elevada termoestabilidade, temperaturas mais elevadas podem ser utilizadas. Os demais ciclos foram feitos exatamente como aqueles usados na técnica de PCR convencional, onde inicialmente as amostras foram desnaturadas a 95°C por dois minutos, seguida de uma sequência de 50 ciclos repetidos de 15 segundos a 95°C (desnaturação da fita de DNA), 30 segundos a 58°C (pareamento dos iniciadores) e 30 segundos a 72°C (extensão da cadeia).

O protocolo utilizado foi o mesmo que o informado pelo fabricante, sendo mostrado na tabela 8.

Tabela 8: Concentração e quantidade dos reagentes empregados na PCR, usando a enzima Phusion™Flash DNA polimerase para um volume final de 20ul.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O (ultrapura autoclavada)	-	8,0 µL
Phusion™Flash PCR Master Mix	[2x]	10,0 µL
Iniciadores	Dsb: 15pmol/µL (forward e reverse) Canis: 1pmol/µL (forward e reverse)	1,0 µL
Amostra de sangue total	-	1,0 µL

A técnica de LAMP também foi testada usando a enzima Phusion™Flash DNA polimerase, a diferença na reação além da temperatura constante de 63°C por 60 minutos após o 98C° iniciais de 10 segundos, foi o uso dos 4 iniciadores utilizados na técnica de LAMP (figura 20).

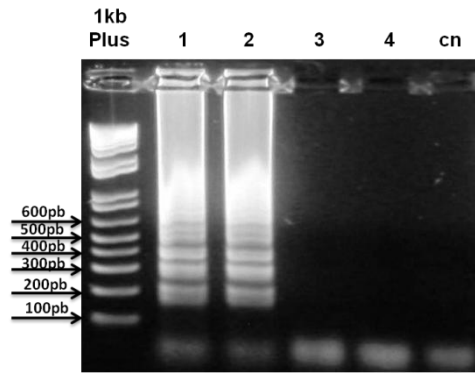


Figura 20: Gel de Agarose 1,5% corado com GelRed - Biotium® com visualização em transiluminação ultravioleta, mostrando o produto da amplificação por LAMP, usando a enzima Phusion™Flash DNA polimerase, sem extração do DNA das amostras de sangue total, onde 2 amostras eram positivas para Erliquiose (1 e 2) e 2 amostras eram negativas (3 e 4), cn= controle negativo (H₂O), 1kb= Marcador de massa molecular INVITROGEN®.

6- Conclusão

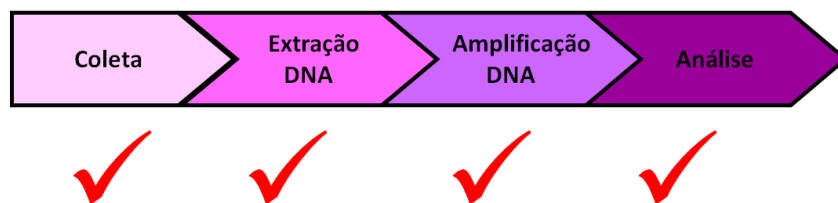
A técnica de amplificação por LAMP foi padronizada, avaliada e testada como uma nova ferramenta para o diagnóstico da bactéria *Ehrlichia canis*. O resultado se mostrou rápido, podendo ser realizado em 60 minutos, e mais sensível do que os métodos convencionais utilizados no diagnóstico da erliquiose.

O padrão utilizado na realização do teste de erliquiose foi a técnica de PCR, descrito por ANDERSON *et al.*, (1992) e AGUIAR, (2006).

A técnica de LAMP requer apenas um banho seco e, portanto é apropriado para o diagnóstico rotineiro, em clínicas públicas e privadas, e aplicações onde não há a possibilidade de adquirir equipamentos sofisticados como termociclador e cuba com acessório para eletroforese.

Obtivemos excelentes resultados pois diminuimos o número de etapas, não sendo preciso realizar a extração do DNA, pois utilizamos a enzima Phusion™Flash DNA polimerase. Além disso a análise das amostras foi feita juntamente com sua amplificação, pois na reação utilizamos o corante fluorescente intercalante PicoGreen® onde observamos a diferença de cor na reação positiva e negativa (figura 21).

Etapas do Diagnóstico:



Novas Etapas do Diagnóstico:



Figura 21: Nesta figura demonstramos claramente a redução nas etapas desde a coleta das amostras até a análise final. Com a utilização da enzima Phusion™Flash DNA polimerase a extração é desnecessária, e a utilização do corante PicoGreen® permite analisarmos os resultados juntamente com a amplificação das amostras, dispensando o uso do gel de agarose.

7- Referências

- AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. Departamento de medicina veterinária preventiva e saúde animal, 2006.
- ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonose**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2002.
- ANDERSON, B. E.; SUMMER, J. W.; DAWSON, J. E. **Detection of etiological agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction**. J. Clin. Microbiol 30:775–780, 1992.
- BARTON, L. L.; DAWSON, J. E.; LETSON, G. W.; LUISIRI, A.; SCALZO, A. J. **Simultaneous ehrlichiosis and Lyme disease**. Pediatr.Infect. Dis. J. 9:127-129, 1990.
- BELLO, N.; FRANCINO, O.; SANCHEZ, A. **Isolation of genomic DNA from feathers**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13:162–164. PubMed, 2001.
- BISTA, B. R.; ISHWAD, C.; WADOWSKY, R. M. **Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of BK virus**. J. Clin. Microbiol.; 45(5): 1581–1587, 2007.
- BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. **Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* and *Bartonella vinsonii***. J. Clin. Immunol.; 36:2645–2651, 1998 a.
- BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. **Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains**. Antimicrob. Agents Chemother. 42:362–368, 1998 b.
- BUHLES, W. C.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. **Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation**. J. Infect. Dis. 130:357–367, 1974.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO JR., J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WEIDMEYER, C. E. **The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area**. Veterinary Research, 35:141-146, 2004.

- CARPENTER, T. L.; MCMEANS, M. C.; MCHUGH, C. P. **Additional instances of human parasitism by the brown dog tick (Acari: Ixodidae).** Journal of Medical Entomology 27:1065-1066, 1990.
- CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B. ***Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes.** J. Eukaryot. Microbiol.; 46:298-303, 1999.
- CHOMCYZNSKI, P.; SANCCHI, N. **Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction.** Anal Biochem, 162: 156-159, 1987.
- COSTA, J. O. ***Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte - Brazil.** Arquivos Escola Veterinária UFMG 25: 199–200, 1973.
- COUTO, C.G. **It's a coagulopathy. But couldn't it be ehrlichiosis?** In: Proceedings of the Fourth European FECAVA-SCIVAC Congress, 135–136, 1998.
- DAGNONE, A. S.; AUTRAN, H. S. M.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO. **Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil.** Veterinary Parasitology, 4: 285-290, 2003.
- DAGNONE, A. S.; MORAIS, H., S., A.; VIDOTTO, O. **Erliquiose nos animais e no homem.** Semina: Ci. Agrárias, Londrina, 2: 191-201, jul./dez, 2001.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. **Primeira descrição de parasitismo humano por *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38: 411-412, 2005.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. ***Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), o carrapato vermelho do cão, parasitando humanos no Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39: 64-67, jan-fev, 2006.
- DAVOUST, B.; PARZY, D.; VIDOR, E.; HASSELOT, N.; MARTET, G. **Erliquiose canine experimentale : étude clinique et thérapeutique.** Rev. Méd. Vét. 167, 1991.
- DONATEIN, A.; LESTOQUARD, F. **Existence on algerie d'une rickettsia duchien.** Bull. Soc. Pathol. Exot. 28: 418–419, 1935.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. **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, 51, 2001.

DU PLESSIS, J. L.; FOURIE, N.; NEL, P. W.; EVEZARD, D. N. **Concurrent babesiosis and ehrlichiosis in the dog: blood smear examination supplemented by the indirect fluorescent antibody test, using Cowdria ruminantium as antigen.** Onderstepoort J. Vet. Res. 57, 151–155, 1990.

DUKES, J. P.; KING, D. P.; ALEXANDERSEN, S. **Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus.** Arch. Virol.; 151(6): 1093–1106, 2006.

ELIAS, E. **Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*.** J. S. Anim. Pract. 33, 540–543, 1991.

ENOMOTO, Y.; YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M. **Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method.** J Clin Microbiol; 43(2): 951–955, 2005.

ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. **Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission.** Experimental and Applied Acarology 23:685-715, 1999.

EWING S. A.; BUCKNER R.G. **Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infections in the dogs.** Am J. Vet. Res. 26:815–828, 1965.

EWING, S. A.; FOX, J. C.; MATHEW, J. S. **The efficacy of serology, blood smear evaluation, and polymerase chain reaction in the diagnosis of ehrlichial infections in dogs.** Am. Assoc. Vet. Parasitol. No. 153 [Abst.], 1995.

GODDARD, J. **Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).** Journal of Medical Entomology 26:628-629, 1989.

GREENE, C. E.; HARVEY J. W. **Canine ehrlichiosis. In: Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat.** ed. Greene CE, pp. 405-414. WB Saunders Co., Philadelphia, PA, 1990.

HAGIWARA, M.; SASAKI, H.; MATSUO, K. **Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11, 16, and 18.** J. Med. Virol., 79(5): 605–615, 2007.

- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. **Canine monocytic ehrlichiosis: an update. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.** 36, 431-447, 1997.
- HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. **Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*.** J. Clin. Microbiol. 36, 73–76, 1998.
- HESS, P. R.; ENGLISH, R. V.; HEGARTY, B. C.; BROWN, G. D.; BREITSCHWERDT, E. B. **Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression.** Veterinary Immunology and Immunopathology.; 109, 117-125, 2006.
- HONG, T. C.; MAI, Q. L.; CUONG, D. V. **Development and evaluation of a novel Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of SARS Corona virus.** J. Clin. Microbiol.; 42(5): 1956– 1961, 2004.
- HUXSOLL, D. L.; AMYX, H.L.; HEMELT, I. E. **Laboratory studies of tropical canine pancytopenia.** Exp. Parasitol. 31: 53–59, 1972.
- IHIRA, M.; AKIMOTO, S.; MIYAKE, F. **Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method.** J. Clin. Virol.; 39(1): 22–26, 2007.
- INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. **Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*.** J. Clin. Microbiol.; 39: 3031–3039, 2001.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. **Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis.** J. Clin. Microbiol.; 32: 1658-1662, 1994.
- IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. **Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment.** J. Clin. Microbiol. 32: 1644-1649, 1994.
- IWAMOTO, T.; SONOBE, T.; HAYASHI, K. **Loop-mediated isothermal amplification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples.** J. Clin. Microbiol.; 41:2616-2622, 2003.
- KANEKO, H.; IIDA, T.; AOKI, K. **Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification.** J. Clin. Microbiol.; 43(7): 3290–3296, 2005.
- KARLESON, F.; STEEN, H.; NESLAND, J. **SYBR green I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction.** J. Virol. Methods.; 55:153-156. 1995.

- KAMACHI, K.; TOYOIZUMI-AJISAKA, H.; TODA, K.; SOEUNG, S. C.; SARATH, S.; NARETH, Y.; HORIUCHI, Y.; KOJIMA, K.; TANAKAHASHI, M.; ARAKARA, Y. **Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection.** J. Clin. Microbiol.; 1899-1902, 2006.
- KUEHN, N. F.; GAUNT, S. D. **Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis.** J. Am. Vet. Med. Assoc.; 186: 355-358, 1985.
- KUHARA, T.; YOSHIKAWA, T.; IHIRA M. **Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification.** J. Virol. Methods.; 144(1–2): 79–85, 2007.
- KUYLER DOYLE, C.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y.; 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 PCR of the *dsb* Gene.** Journal of Molecular Diagnostics, 7: 504-510, 2005.
- LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M.; BALBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. **Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil.** Veterinary Therapeutics, 4: 67-75, 2003.
- LABRUNA, M. B. **Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 13 (supl I): 123-124, 2004.
- LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. **Prevalence of Rickettsia infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, Western Amazon, Brazil.** In: International Conference on Rickettsiae Rickettsial Diseases, 2005.
- LIMA, V. L.; FIGUEIREDO, A. C.; PIGNATTI, M. G.; MODOLO, M. **Spotted fever in the town of Pedreira, São Paulo State, Brazil. The relationship between the occurrence of cases and human parasitism by ixodid ticks.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 28:135-137, 1995.
- LIN, X.; CHEN, Y.; LU, Y.; YAN, J.; YAN, J. **Amplification of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic Leptospira.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 63: 237-242, 2009.
- MATTHEWMAN, L.A.; KELLY, P.G.; BOBADE, P.A.; TAQUIRA, M.; MASON, P. M.; MAJOK, A.; BROUQUI, P.; RAOULD, D. **Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in dogs in Zimbabwe.** Vet. Rec. 133, 344–346, 1993.

- MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D. **Polymerase chain reaction detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs.** J. Vet. Diagn. Invest.; 8:441–447, 1996.
- MCBRIDE, J. W.; NDIP, L. M.; POPOV, V. L.; WALKER, D. H. **Identification and functional analysis of an immunoreactive DsbA-like thio-disulphide oxidoreductase of *Ehrlichia spp.*** Infection and Immunity.; 70: 2700-2703, 2002.
- MORI, Y.; NAGAMINE, K.; TOMITA, N. **Detection of Loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation.** Biochem. Biophys. Res. Commun.; 289: 150–154, 2001.
- MOSHKOVSKI, S. D. **Cytotropic inducers of infection and the classification of the Rickettsiae with Chlamydozoa.** Adv. Mod. Biol. 19, 1-44, 1945.
- NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. **Consensus statement on ehrlichial diseases of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM.** J. Vet. Int. Med. 16, 309–315, 2002.
- NJIRU, Z. K.; MIKOSZA, A. S. J.; ARMSTRONG, T.; ENYARUA, J. C.; NDUNG, J. M.; THOMPOSON, A. R. C. **Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*.** 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2238707>. Acesso: 08 julho 2008.
- NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. **Loop-mediated isothermal amplification of DNA .** Nucleic. Acids. Research.; 28: 12, 2000.
- OLANO, J.P.; WALKER, D.H. **Human erliquioses.** Med. Clin. North Am. 86, 375–392, 2002.
- OKAMOTO, S.; YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M. **Rapid detection of varicella-zoster virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method.** J Med Virol; 74(4): 677–682. 2004.
- PADDOCK, C. D. AND CHILDS, J. E. ***Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen.** Clin. Microbiol. Rev. 16: 37–64. 2003.
- PALMAS, C.; BORTOLETTI, G.; CONCHEDDA, M.; CONTINI, C.; GABRIELE, F.; ECCA, A. R. **Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*.** Parasitological 43:29-35, 2009.

- PARIDA, M. M.; HORIOKE, K.; ISHIDA, H. **Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay.** J. Clin. Microbiol.; 43: 2895–2903, 2005.
- PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P. K.; RAO, P. V. L.; MORITA, K. **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases.** Rev. Med. Virol.; 18: 407-421, 2008.
- PAROLA, P. **Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe.** Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.; 27: 297-304, 2004.
- PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. **Antigenic and genetic characterization of an *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a human in Venezuela.** J. Clin. Microbiol. 34:2133–2139, 1996.
- PHAM, H. M.; NAKAJIMA, C.; OHASHI, K.; ONUMA, M. **Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus.** J. Clin. Microbiol.; 43(4): 1646–1650, 2005.
- RAOULT, D.; ROUX, V. **Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases.** Clinical Microbiology Reviews 10:649-719, 1997.
- RIKIHISA, Y. **Ehrlichiae of Veterinary Importance.** In: **Rickettsiae and Tick-borne Diseases at the turn of the third Millennium.** Eds. D. Rault and P. Brouqui. Elsevier.; Paris, 393-405, 1999.
- RISTIC, M., HUXSOLL, D. L.; WEISIGER, R. M.; HILDEBRANDT, P. K.; NYINDO, M. B. A. **Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence.** Infect. Immun.; 6:226–231, 1972.
- SAIKI, R. K.; BUGAWAN, T. L.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. **Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes.** Nature. Nov 13-19;324(6093):163-6, 1986.
- SAINZ, A.; TESOURO, M. A.; AMOUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ, F.; MAZZUCCELLI, F.; RODRIGUEZ, M. **Prospective comparative study of three treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis.** J. Vet. Int. Med.; 14, 134–139, 2000.
- SALEH, M.; SOLIMAN, H.; EL-MATBOULI, M. **Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the cause agent of enteric red mouth disease in fish.** BMN Veterinary research, 4: 31, 2008.

- SANTARÉM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis***. 127 f. Tese (Doutorado). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Botucatu, 2003.
- SEXTON, D. J.; BURGDORFER, W.; THOMAS, L. **Rocky mountain spotted fever in Mississippi: survey for spotted fever antibodies in dogs and for spotted fever group Rickettsiae in dog ticks**. American Journal of Epidemiology, 103: 192–197, 1976.
- SUGIYAMA, H.; YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M. **Comparison of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR and virus isolation for the detection of herpes simplex virus in genital lesions**. J. Med. Virol.; 75(4): 583–587, 2005.
- SUZUKI, R.; YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M. **Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA**. J. Virol. Methods.; 132(1–2): 216–221, 2006.
- TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; MORAIS, H. S. A. **Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a Hospital population in south Brazil**. Journal of Veterinary Internal Medicine.; 16: 365, 2002.
- TROY, G.C.; VULGAMOTT, J.C.; TURNWALD, G.H. **Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases**. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 16, 181–187, 1980.
- USHIKUBO, H. **Principle of LAMP method - a simple and rapid gene amplification method**. Uirus; 54(1): 107–112, 2004.
- VARGAS, A.; JAMES, D. **Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Plum pox virus**. J. Virol. Methods.; 138(1–2): 184–190, 2006.
- WANER, T.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELLISSEN, A. W. C. A. **Significance of serological testing for ehrlichial diseases with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis***. Vet. Parasitol. 95, 1–15, 2001.
- WAKABAYASHI, T.; YAMASHITA, R.; KAKITA, T. **Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method**. Curr Eye Res; 28(6): 445–450, 2004.
- WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M. **Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis***

infection in dogs treated with doxycycline. J. Clin. Microbiol.; 35:1852–1855, 1997.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. **Ehrlichial diseases of dogs.** Vet. Clin. N. Am. 21, 75–98, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The vector-borne human infections of Europe: their distribution and burden in public health.** WHO, Geneva, 2004.

YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M.; AKIMOTO, S. **Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification.** J. Clin. Microbiol.; 42(3): 1348–1352, 2004.