

Desenvolvimento de LAMP PCR para Diagnóstico de Babesiose Causada por *Babesia bigemina*

Raíssa Cury Ferreira^{(1) (5)}, Nicole Tafnes de Brito Silva Honório⁽²⁾, Cinthia de Carvalho Coutinho⁽²⁾, Lidiane Loeffler Lima⁽¹⁾, Leticia Milena de Jesus⁽¹⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽³⁾, Robert Domingues⁽³⁾, Marco Antônio Machado^(4,6), Emanuelle Baldo Gaspar⁽⁴⁾ e Marta Fonseca Martins⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq.), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estudante de graduação, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisadores, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

⁽⁵⁾E-mail: raissacuryferreira08@gmail.com.

Resumo — A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) causa grandes perdas econômicas na pecuária, especialmente em áreas tropicais, devido a protozoários como *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, e a bactéria *Anaplasma marginale*. Diagnósticos convencionais, limitados em sensibilidade, impulsionam o interesse por técnicas moleculares, como a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), que oferece maior precisão e rapidez. Este estudo visou desenvolver um método LAMP PCR para diagnóstico de TPB, utilizando primers específicos para *Babesia bigemina*. Após incubação a 95 °C, as amostras de DNA foram submetidas por reação de LAMP em um termociclador por temperatura constante. Os resultados mostraram eficácia na detecção de *Babesia bigemina*, confirmada por mudança de cor nas amostras devido ao pH. Estudos anteriores em doenças como COVID-19 demonstraram a eficiência da LAMP, sugerindo sua aplicabilidade em TPB. Com isto, futuros passos incluem otimização dos primers, testes em PCR em tempo real, e validação do método em diversas amostras, visando um diagnóstico robusto e eficiente para TPB e outras doenças bovinas.

Termos para indexação: tristeza parasitária bovina, amplificação isotérmica, bovinocultura, saúde animal.

Development of LAMP PCR for the Diagnosis of Babesiosis Caused by *Babesia bigemina*

Abstract — Tick-borne disease causes significant economic losses in livestock, especially in tropical areas, due to protozoa such as *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, and the bacteria *Anaplasma marginale*. Conventional diagnosis are limited in sensitivity and drive interest in molecular techniques such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which offers greater precision and speed. This study aimed to develop a LAMP PCR method for babesiosis diagnostic using specific primers for *Babesia bigemina*. After denaturation, DNA samples were submitted by the LAMP reaction in a thermocycler. Results showed efficacy in detecting *Babesia bigemina*, confirmed by a color change in samples due to pH. Previous studies on diseases such as COVID-19 have demonstrated LAMP's efficiency, suggesting its applicability for that disease. Future steps include primer optimization, real-time PCR testing, and method validation in various samples, aiming for a robust and efficient diagnosis for babesiosis and other bovine diseases.

Index terms: bovine parasitic sadness, isothermal amplification, cattle farming, animal health.

Introdução

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é uma doença que provoca grandes perdas econômicas na pecuária global, especialmente em áreas tropicais e subtropicais, onde a infestação por carrapatos é mais prevalente. Os principais causadores da TPB são os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, juntamente com a bactéria *Anaplasma marginale*, todos transmitidos por carrapatos do gênero *Rhipicephalus* (Silva et al., 2021). A complexidade do ciclo de vida desses patógenos e a sua interação com o gado bovino tornam o controle da doença um desafio, aumentando a necessidade de diagnósticos rápidos e precisos (Santos et al., 2017).

Além disso, o diagnóstico convencional da TPB é realizado por meio de métodos sorológicos e de microscopia, que, embora amplamente utilizados, têm limitações em termos de sensibilidade e especificidade, especialmente durante períodos em que a carga parasitária é baixa (Cadioli et al., 2015). Em tais períodos, a detecção por métodos tradicionais torna-se difícil, comprometendo a eficácia do controle da doença. Portanto, há um crescente interesse no desenvolvimento de técnicas moleculares que ofereçam maior precisão e rapidez na identificação dos patógenos envolvidos (Costa et al., 2021).

Nesse contexto, a técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) tem se destacado como uma ferramenta promissora no diagnóstico molecular de várias doenças infecciosas, incluindo a TPB. Diferente da PCR tradicional, a LAMP requer menos recursos para a amplificação do DNA, simplificando o procedimento e reduzindo os custos operacionais (Nunes, 2013). Além disso, a LAMP é reconhecida por sua alta sensibilidade, especificidade e, ainda, por não necessitar mudanças cíclicas de temperatura como a PCR o que a torna uma opção viável para a detecção de patógenos em campo (Parida et al., 2008).

Estudos anteriores demonstraram a eficácia da LAMP na detecção de diferentes patógenos, como *Trypanosoma vivax*, com resultados promissores mesmo em condições de campo (Cadioli et al., 2015). A habilidade da LAMP de amplificar DNA a partir de baixas concentrações é particularmente útil para diagnósticos durante períodos de baixa parasitemia, um desafio comum no manejo da TPB. Essa característica é essencial para intervenções precoces e eficazes, prevenindo a progressão da doença e suas repercussões econômicas (Ferreira, 2019).

Portanto, este estudo teve como objetivo desenvolver um novo método de diagnóstico para Tristeza Parasitária Bovina pelo LAMP PCR.

O conteúdo desse documento vai ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, nos seguintes objetivos específicos: ODS 1 – “Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares”; ODS 3 – “Saúde de qualidade: Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades”; ODS 8 – “Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos”; ODS 12 - “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”.

Material e métodos

Foi testada uma amostra de DNA extraído de sangue bovino infectado com *Babesia bigemina*. A LAMP utilizou um conjunto específico de primers

para *Babesia bigemina*, descritos por Iseki et al. (2007): primers internos 5' CCTAACCAAACGCTTCAACGCCGAATTCTTGCTTTCACAACCTCGCCTG 3' (FIP) e 5' AGCAACCTTCCCGTTGACCTTGAATTCCATCATGTACTCGCCGTAGC 3' (BIP), que são longos e se ligam a locais distantes no molde de DNA; e os primers externos 5' CGGCGGCTAAGTTCTTCAA 3' (F3) e 5' GAACGAGGTCATCGCAGG 3' (B3), que são mais curtos e se ligam mais lentamente devido às suas menores concentrações; A combinação desses primers, juntamente com a Bst DNA polimerase se ativa entre 60-65 °C.

A amostra foi diluída em duplicata de 6 pontos de uma diluição seriada na base dois, para que as concentrações finais fossem de 25,0, 12,5, 5,00, 2,5, 1,25 e 0,5 ng/μL e foram submetidas a um tratamento térmico específico no termociclador: foram incubadas a 95 °C por 5 minutos para a desnaturação do DNA e, em seguida, rapidamente resfriadas em gelo por 5 minutos para evitar o reanelamento das fitas de DNA.

Para a reação de LAMP, foi preparado o mix com os seguintes reagentes: 0,1 μL de água ultrapura, 7,5 μL de tampão a 1X de concentração, 2,4 μL de cada um dos primer FIP e BIP e 0,3 μL de cada um dos primers F3 e B3 (cada primer a 24 μM de concentração). Em seguida, 11 μL desse mix foram adicionados a cada microtubo, junto com 4 μL do DNA previamente diluído. Após a adição do mix, as amostras retornaram ao termociclador por um ciclo de 64 °C por 90 minutos e 80 °C por 5 minutos. Após isso, foi feita a análise dos resultados por meio da observação de troca de cor de rosa para amarelo/alaranjado.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos indicaram que o método de LAMP PCR desenvolvido foi praticamente eficaz na detecção de *Babesia bigemina* na amostra de DNA bovino testada. A confirmação da amplificação bem-sucedida foi visualizada pela mudança de cor devido à alteração do pH. A amostra, por ser positiva, apresentou uma mudança de cor característica para amarelo, confirmando a amplificação do DNA alvo. O controle negativo (branco) manteve-se inalterado (cor rosa), indicando que não houve contaminação cruzada ou amplificação não específica.

A mudança de cor na amostra positiva ocorreu devido à produção de ácido durante a amplificação do DNA, resultando em uma alteração no pH do meio de reação. O indicador de pH incorporado no mix de reação proporcionou uma visualização clara e direta dos resultados. O branco se manteve incolor garantindo que o resultado positivo observado na amostra não fosse devido a contaminação ou erro técnico. Outro resultado interessante é de que a positividade da reação aparentou ser inversamente proporcional à quantidade de DNA total (*Bos taurus* + *B. bigemina*), ficando as reações com menos DNA mais amareladas. Tal resultado pode indicar tanto a presença de inibidores de amplificação nas amostras, que pode ser até mesmo o DNA genômico bovino, quanto levantar questões quanto à sensibilidade da técnica, sendo necessárias mais padronizações quanto ao input inicial de DNA na reação.

Estudos anteriores sobre a aplicação da LAMP em outras doenças infecciosas, como a COVID-19, também demonstraram resultados promissores. Por exemplo, Huang et al. (2020) desenvolveram um teste de LAMP para SARS-CoV-2, o vírus responsável pela COVID-19, que mostrou alta sensibilidade e especificidade, similar aos métodos tradicionais de PCR em tempo real, mas com a vantagem de ser mais rápido e não requerer equipamentos complexos. Da mesma forma, Yamazaki et al. (2021) demonstraram a eficácia da LAMP na detecção de *Trypanosoma evansi*, um patógeno relevante na medicina veterinária, confirmando a versatilidade e aplicabilidade desta técnica em diferentes contextos.

A perspectiva é continuar com mais testes, a fim de desenvolver um método de LAMP PCR para o diagnóstico da Tristeza Parasitária Bovina. Os próximos passos incluem o desenho de novos primers para aumentar a especificidade e sensibilidade da técnica, a realização de testes em PCR em tempo real para comparação dos resultados, e a validação do método em amostras de soro e sangue, além de DNA extraído. Também será fundamental testar a técnica com primers para *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*, visando desenvolver uma abordagem robusta e eficiente para o diagnóstico de TPB. A continuidade deste trabalho contribuirá para a sustentabilidade da pecuária em regiões endêmicas, fornecendo uma ferramenta diagnóstica rápida, precisa e de baixo custo, essencial para o controle eficaz da Tristeza Parasitária Bovina.

Conclusões

A partir dos primers escolhidos, foi possível identificar a presença de *Babesia bigemina* DNA extraído de sangue bovino infectado com *Babesia bigemina* por meio da técnica de LAMP PCR, confirmado pela mudança de cor nas amostras positivas.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da bolsa recebida do Programa Pibic, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; à pesquisadora Marta Martins pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e treinamento.

Referências

- CADIOLI, F. A.; FIDELIS JÚNIOR, O. L.; SAMPAIO, P. H.; SANTOS, G. N.; ANDRÉ, M. R.; CASTILHO, K. J. G. de A.; MACHADO, R. Z. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology**, v. 214, n. 1/2, p. 174-177, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.001>.
- COSTA, M. O.; CARVALHO, M. R.; GOMES, L. G.; STOCCO, M. B.; SPILLER, P. R.; FARIA, E. F.; NOGUEIRA, E. N. N. C.; DALL'ACQUA, P. C.; PAULA, E. M. N.; MENDES, A. C. M. Os desafios do complexo da tristeza parasitária bovina TPB. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, e58010616148, 2021. DOI: <http://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.16148>.
- FERREIRA, T. A. A. **Diagnóstico molecular e taxas de infecção de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em rebanhos bovídeos e artrópodes parasitas na Amazônia**. 2019. 45 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada a Agropecuária) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/883>. Acesso em: 13 jun. 2024.
- HUANG, W. E.; LIM, B.; HILLIER, A.; YE, L.; TANG, T.; WU, N.; LI, Y.; COOMBS, N. J. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 950-961, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>.
- ISEKI, H.; ALHASSAN, A.; OHTA, N.; THEKISOE, O.; YOKOYAMA, N.; INOUE, N.; NAMBOTA, A.; YASUDA, J.; IGARASHI, I. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 3, p. 281-287, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.09.019>.
- KUMAR, B.; MAHARANA, B. R.; BRAHMBHATT, N. N.; THAKRE, B. J.; PARMAR, V. L. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay based on RoTat1.2 gene for detection of *Trypanosoma evansi* in domesticated animals. **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1873-1882, 2021. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00436-021-07118-7>.

NUNES, M. de L. **Aplicação da técnica Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/31939>. Acesso em: 13 jun. 2024.

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P. K.; RAO, P. V.; MORITA, K. Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP): uma nova geração de técnica inovadora de amplificação genética; perspectivas no diagnóstico clínico de doenças infecciosas. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, n. 6, p. 407-421, 2008. DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.593>.

SANTOS, G. B.; GOMES, I. M. M.; SILVEIRA, J. A. G.; PIRES, L. C. S. R.; AZEVEDO, S. S.; ANTONELLI, A. C.; RIBEIRO, M. F. B.; HORTA, M. C. Tristeza Parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 1-7, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000100001>.

SILVA, T. F.; ALVES-SOBRINHO, A. V.; LIMA, L. F. S.; ZIEMNICZAK, H. M.; FERRAZ, H. T.; LOPES, D. T.; SILVA, V. L. D.; BRAGA, Í. A.; SATURNINO, K. C.; RAMOS, D. G. S. Tristeza parasitária bovina: revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, e15410111631, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11631>.