



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP
(LAMP) PARA DETECÇÃO DE *BABESIA CANIS***

LIA SPINOZZI BICUDO

Foz do Iguaçu
2023

**PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP)
PARA DETECÇÃO DE *BABESIA CANIS***

LIA SPINOZZI BICUDO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Kelvinson Fernandes Viana

Foz do Iguaçu

2023



ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao dia 26 do mês de Outubro do ano de 2023, realizou-se a apresentação pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado **PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP) PARA DETECÇÃO DE BABESIA CANIS**, apresentado pela discente Lia Spinozzi Bicudo, do curso de Biotecnologia. Os trabalhos foram iniciados às 15:00 pelo docente orientador Kelvinson Fernandes Viana, presidente da banca examinadora, juntamente com os docentes Nathalia Correa Chagas e Weber Beringui Feitosa.

Observações da Banca Examinadora:

Acatar as sugestões da banca em relação ao texto.

A Banca Examinadora, ao término da apresentação oral e da arguição do acadêmico, encerrou os trabalhos às 17:00. Os examinadores atribuíram as seguintes notas:

orientador(a)	nota final: 10.0	Média final: 10.0
docente	nota final: 10.0	
docente	nota final: 10.0	

Proclamado o resultado pelo presidente da banca examinadora, encerraram-se os trabalhos e, para constar, eu Kelvinson Fernandes Viana lavrei a presente Ata que assino juntamente com os demais membros da banca.

Foz do Iguaçu, 26 de Outubro de 2023.

Assinaturas:

Nathalia Correa Chagas	UNILA	 Documento assinado digitalmente NATHALIA CORREA CHAGAS DE SOUZA Data: 26/10/2023 17:42:17-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
Weber Beringui Feitosa	UNILA	 Documento assinado digitalmente WEBER BERINGUI FEITOSA Data: 27/10/2023 10:07:58-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
Kelvinson Fernandes Viana	UNILA	

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Lia Spinozzi Bicudo

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento:

graduação

trabalho de conclusão de curso

Título do trabalho acadêmico: Padronização Da Amplificação Isotérmica Mediada Por Loop Para Detecção de *Babesia canis*

Nome do orientador(a): Kelvinson Fernandes Viana

Data da Defesa: 26/10/2023

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino- Americana – BIUNILA disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 26 de Outubro de 2023.

Lia Spinozzi Bicudo

Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha profunda gratidão aos meus pais. As bases sólidas sobre as quais construí minha trajetória acadêmica e pessoal foram moldadas pelo amor, apoio e sabedoria de vocês. Cada obstáculo que enfrentei, cada vitória que celebrei, tem o reflexo do suporte incondicional que vocês me ofereceram.

Quero expressar minha profunda gratidão ao Felipe, meu namorado, pelo seu constante apoio, paciência e amor durante a elaboração deste trabalho. Sua presença foi fundamental para me manter motivada e focada, mesmo nos momentos mais desafiadores. Obrigada por estar ao meu lado em cada etapa dessa jornada.

Ao meu orientador, Kelvinson Viana, agradeço imensamente. Suas orientações precisas, seu olhar crítico e, acima de tudo, sua paciência e dedicação foram cruciais para que este trabalho chegasse à sua conclusão. Aprendi mais do que técnicas e métodos sob sua orientação, aprendi sobre paixão pela pesquisa e dedicação à academia.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos mestrandos Angelo e Adrieli que, com sua expertise, dedicação e paciência, guiaram-me durante este projeto. Sem a sua orientação, apoio e generosidade na partilha de conhecimentos, este trabalho não teria a mesma profundidade e rigor.

RESUMO

Hemoparasitoses caninas, endêmicas no Brasil e emergentes globalmente, são de relevante preocupação na medicina veterinária devido à sua alta morbidade e mortalidade em cães. Transmitidas principalmente por carrapatos, especificamente *Rhipicephalus sanguineus*, essas doenças são potencialmente zoonóticas e podem manifestar-se em áreas urbanas e rurais. Dentre as principais hemoparasitoses no Brasil, pode-se citar a babesiose canina, causada pelo agente do gênero *Babesia*. Embora muitos cães manifestem sintomas clínicos evidentes, há casos de portadores assintomáticos. Assim, um obstáculo presente é a ausência de um método de diagnóstico ágil, preciso e econômico que permita o tratamento precoce apropriado para os cães, a fim de minimizar as complicações associadas. Portanto, é essencial criar uma técnica de detecção rápida, específica e de custo acessível para esse patógeno. Uma alternativa promissora é a técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), que apresenta uma combinação de eficiência, rapidez e custo mais baixo quando comparada à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplicando o DNA desejado em uma temperatura estável e gerando diversas réplicas. O objetivo deste estudo foi desenvolver e padronizar a técnica LAMP para detectar o protozoário *Babesia canis*, causador da babesiose canina. Esta doença, comum em muitas regiões do mundo, é caracterizada principalmente pela destruição dos glóbulos vermelhos do hospedeiro, resultando em sintomas como febre, icterícia, anemia e, em alguns casos, manifestações neurológicas. Para isso, amostras de sangue, tecido e cultura provenientes de cães positivados sorologicamente para babesiose tiveram seu DNA extraído e foram realizados testes de padronização, utilizando dois pares de *primers* (F3, B3, FIP e BIP), variando os parâmetros temperatura, tempo e concentração do reagente betaína. Testaram-se quatro temperaturas (60 °C, 61 °C, 62 °C e 63 °C), sete períodos de incubação (60, 55, 50, 45, 40, 35 e 30 minutos) e sete diferentes concentrações de betaína (0M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.2M, 1.4M e 1.6M), utilizando água como controle negativo. A detecção visual do resultado da técnica foi realizada através do uso de 1uL do corante intercalante SYBR Green I por amostra. Os resultados indicaram que a reação foi padronizada de maneira simplificada, na qual o produto foi amplificado a 62°C, com um tempo de incubação de 60 minutos e 1.2M de betaína. O mesmo protocolo foi utilizado no teste de especificidade dos *primers*, no qual a técnica LAMP mostrou amplificação específica para *Babesia canis*, sem ocorrência de amplificação cruzada. Assim, o método LAMP revelou-se ágil e descomplicado, sendo excelente para identificar patógenos, como *Babesia canis*. Sugere-se estudos subsequentes para analisar a sensibilidade do exame.

Palavras-chave: métodos de detecção; LAMP; hemoparasitoses caninas; *Babesia canis*.

RESUMEN

Las hemoparasitosis caninas, endémicas en Brasil y emergentes globalmente, son de gran preocupación en la medicina veterinaria debido a su alta morbilidad y mortalidad en perros. Transmitidas principalmente por garrapatas, específicamente *Rhipicephalus sanguineus*, estas enfermedades son potencialmente zoonóticas y pueden manifestarse en áreas urbanas y rurales. Entre las principales hemoparasitosis en Brasil, se puede mencionar la babesiosis canina, causada por el agente del género *Babesia*. Aunque muchos perros muestran síntomas clínicos evidentes, hay casos de portadores asintomáticos. Así, un obstáculo actual es la ausencia de un método de diagnóstico rápido, preciso y económico que permita un tratamiento temprano adecuado para los perros, con el fin de minimizar las complicaciones asociadas. Por lo tanto, es esencial desarrollar una técnica de detección rápida, específica y de bajo costo para este patógeno. Una alternativa prometedora es la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), que presenta una combinación de eficiencia, rapidez y menor costo en comparación con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), multiplicando el ADN deseado a una temperatura constante y generando múltiples réplicas. El objetivo de este estudio fue desarrollar y estandarizar la técnica LAMP para detectar el protozoo *Babesia canis*, causante de la babesiosis canina. Esta enfermedad, común en muchas regiones del mundo, se caracteriza principalmente por la destrucción de los glóbulos rojos del huésped, resultando en síntomas como fiebre, ictericia, anemia y, en algunos casos, manifestaciones neurológicas. Para ello, se extrajo el ADN de muestras de sangre y tejido de perros con resultados serológicos positivos para babesiosis y se realizaron pruebas de estandarización utilizando dos pares de cebadores (F3, B3, FIP y BIP), variando los parámetros de temperatura, tiempo y concentración del reactivo betaína. Se probaron cuatro temperaturas (60 °C, 61 °C, 62 °C y 63 °C), siete periodos de incubación (60, 55, 50, 45, 40, 35 y 30 minutos) y siete diferentes concentraciones de betaína (0M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.2M, 1.4M y 1.6M), utilizando agua como control negativo. La detección visual del resultado de la técnica se realizó mediante el uso de 1uL del tinte intercalante SYBR Green I por muestra. Los resultados indicaron que la reacción fue estandarizada de manera simplificada, amplificando el producto a 62°C, con un tiempo de incubación de 60 minutos y 1.2M de betaína. El mismo protocolo se utilizó en la prueba de especificidad de los cebadores, donde la técnica LAMP mostró una amplificación específica para *Babesia canis*, sin ocurrencia de amplificación cruzada. Así, el método LAMP resultó ser rápido y sencillo, siendo excelente para identificar patógenos como *Babesia canis*. Se sugiere realizar estudios posteriores para analizar la sensibilidad del examen.

Palabras clave: métodos de detección; LAMP; hemoparasitosis caninas; *Babesia canis*.

ABSTRACT

Canine hemoparasitoses, endemic in Brazil and emerging globally, are of significant concern in veterinary medicine due to their high morbidity and mortality in dogs. Transmitted mainly by ticks, specifically *Rhipicephalus sanguineus*, these diseases are potentially zoonotic and can manifest in both urban and rural areas. Among the main hemoparasitic diseases in Brazil is canine babesiosis, caused by agents of the genus *Babesia*. Although many dogs display evident clinical symptoms, there are cases of asymptomatic carriers. A present obstacle is the lack of a swift, precise, and economical diagnostic method that allows for early and appropriate treatment for dogs to minimize associated complications. Thus, it is vital to develop a rapid, specific, and cost-effective detection technique for this pathogen. A promising alternative is the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique, which offers a combination of efficiency, speed, and lower cost compared to Polymerase Chain Reaction (PCR), amplifying the desired DNA at a stable temperature and producing multiple copies. The aim of this study was to develop and standardize the LAMP technique to detect the protozoan *Babesia canis*, responsible for canine babesiosis. This disease, common in many regions worldwide, is primarily characterized by the destruction of the host's red blood cells, resulting in symptoms like fever, jaundice, anemia, and in some instances, neurological manifestations. For this, blood and tissue samples from dogs serologically positive for babesiosis had their DNA extracted, and standardization tests were conducted using two pairs of primers (F3, B3, FIP, and BIP), varying temperature parameters, duration, and betaine reagent concentration. Four temperatures (60°C, 61°C, 62°C, and 63°C), seven incubation periods (60, 55, 50, 45, 40, 35, and 30 minutes), and seven different betaine concentrations (0M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.2M, 1.4M, and 1.6M) were tested, using water as a negative control. The visual detection of the technique's result was performed using 1uL of the intercalating dye SYBR Green I per sample. The results indicated that the reaction was simplified, amplifying the product at 62°C, with an incubation time of 60 minutes and 1.2M of betaine. The same protocol was used in the primer specificity test, in which the LAMP technique showed specific amplification for *Babesia canis*, without cross-amplification occurrences. Therefore, the LAMP method proved swift and uncomplicated, excellent for identifying pathogens like *Babesia canis*. Further studies are suggested to analyze the test's sensitivity.

Key words: detection methods; LAMP; canine hemoparasitoses; *Babesia canis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquemática do ciclo de vida do protozoário <i>Babesia canis</i>	16
Figura 2 – Esquemática das seis regiões distintas designadas no DNA alvo, rotuladas como F3, F2, F1, B1c, B2c e B3 a partir da extremidade 5', juntamente com os primers (F3, B3, FIP e BIP).....	21
Figura 3 – Início da etapa não cíclica e formação dos loops.....	22
Figura 4 – Início da etapa cíclica e produção de diversas cópias do alvo.....	23
Figura 5 – Esquema de atuação dos Loop Primers.....	24
Figura 6 – Amostras de cultura, sangue e tecido utilizadas na padronização.....	29
Figura 7 – Primers utilizados na amplificação de <i>Babesia canis</i>	31
Figura 8 – Kit Bst 2.0 Polymerase e DNTPs utilizados.....	33
Figura 9 – Execução da padronização do ensaio LAMP seguindo os padrões do fabricante.....	34
Figura 10 - Gráfico de variação dos parâmetros do ensaio LAMP: temperatura, tempo e concentração de Betaína. Bolinhas vermelhas representam tentativas ineficazes, enquanto bolinhas verdes destacam os parâmetros otimizados para uma reação eficaz, reação padronizada.....	37
Figura 11 – Detecção visual da coloração das amostras testadas. Observa-se a duplicata de amostras controle positivo com a cor esverdeada, indicando amplificação, e a duplicata de controle negativo e <i>Leishmania infantum</i> com a cor alaranjada.....	37
Figura 12 – Análise do ensaio LAMP por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. Coluna 1, marcador de DNA de 100 pb; colunas 2 e 3, duplicata de controle negativo; colunas 4 e 5, duplicata de controle positivo para <i>Babesia canis</i> ; colunas 6 e 7, duplicata de amostras de <i>Leishmania infantum</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de primers utilizados na detecção de <i>Babesia canis</i>	31
Tabela 2 – Volumes e concentrações dos reagentes para cada reação.....	33
Tabela 3 – Resultado da extração e dosagem do DNA nas amostras utilizadas como controle positivo para <i>Babesia canis</i> e amostra de <i>Leishmania infantum</i> utilizada no teste de especificidade dos primers.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada Por Loop
B. canis	<i>Babesia canis</i>
B. gibsoni	<i>Babesia gibsoni</i>
RIFI	Teste de Imunofluorescência Indireta
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Mg/kg	Miligramas/Quilo
F3	<i>Foward Outer Primer</i>
B3	<i>Backward Outer Primer</i>
FIP	<i>Forward Inner Primer</i>
BIP	<i>Backward Inner Primer</i>
FLP	<i>Forward Loop Primer</i>
BLP	<i>Backward Loop Primer</i>
CG	Citosina/Guanina
AT	Adenina/Timina
Tm	Temperatura de Melting
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
BSA	Albumina Sérica Bovina
uL	Microlitro
RAP-1	Proteína <i>putative rhoptry</i>
uM	Micromolar
pb	Pares de Base
CP	Controle Positivo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Bst	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
M	Mol/L
mM	Milimolar
ng	Nanograma
rpm	Rotação por Minuto
°C	Graus Celsius
U	Unidade
V	Volts

CN	Controle Negativo
KDa	KiloDalton
MgSO4	Sulfato De Magnésio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 BABESIOSE CANINA.....	15
2.2 METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO.....	17
2.3 AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP).....	20
2.3.1 Métodos de detecção visual.....	25
2.3.2 Reagentes.....	26
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 AMOSTRAS.....	29
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	29
4.2.1 Protocolo de extração.....	30
4.3 PADRONIZAÇÃO DA LAMP.....	31
4.3.1 Primers.....	31
4.3.2 Amplificação Isotérmica Mediada Por Loop.....	32
4.3.3 Teste de especificidade dos Primers (Teste de Reação Cruzada).....	34
4.3.4 Utilização de SYBR Green I Para Visualização Dos Resultados.....	34
4.3.5 Eletroforese em Gel de Agarose.....	34
5.RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

Hemoparasitoses caninas são doenças caracterizadas endêmicas no Brasil e emergentes em diversos países do mundo, as quais apresentam grande importância na clínica médica veterinária de pequenos animais por representarem a principal causa de mortalidade e morbidade em cães domésticos (DANTAS-TORRES, 2010). Podem ser encontradas, e infectar os cães, tanto em área rural quanto em área urbana. São causadas por microrganismos que atuam parasitando células sanguíneas do seu hospedeiro, e transmitidas por artrópodes hematófagos, sendo seu principal vetor os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (VIEIRA, 2017).

Estas doenças representam um problema histórico devido a sua prevalência e relevância, podendo vir a ser consideradas como zoonoses (DANTAS-TORRES, 2008). Dentre as principais hemoparasitoses encontradas no Brasil, é cabível mencionar a Babesiose Canina, Anaplasmoze Canina, Eriquiose Monocítica Canina e Leishmaniose Visceral Canina, doenças causadas pelos agentes patogênicos dos gêneros *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Leishmania*, respectivamente (DE ARAÚJO *et al.*, 2022; VALENTE, 2014).

Apesar de muitos cães apresentarem sintomas clínicos como febre, letargia, anorexia, icterícia, distúrbios neurológicos e alterações hematológicas, em diversos casos esses sintomas podem ser inespecíficos, como também pode ocorrer casos em que os cães não apresentam nenhum sintoma clínico, desta forma, sendo considerados como portadores assintomáticos (HOLANDA *et al.*, 2019; LASTA, 2011).

Logo, a identificação direta destes patógenos no microscópio torna-se complexa ao apresentar baixa sensibilidade, a qual é decorrente da baixa carga parasitária presente no cão. Em vista disto, o diagnóstico de tais doenças é realizado pela observação de alterações clínicas e hematológicas, em associação à pesquisa direta do agente patogênico via microscopia (esfregaço sanguíneo), testes moleculares e/ou sorológicos (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)...) (DE ARAÚJO *et al.*, 2022; FERREIRA *et al.*, 2008).

Através do desenvolvimento da PCR para o uso no diagnóstico de hemoparasitoses, houve uma grande melhoria na detecção dessas doenças devido a uma maior sensibilidade e especificidade do exame (MYLONAKIS *et al.*, 2009). Contudo, a PCR é um exame molecular de alto custo, o qual apresenta a necessidade

de mão de obra especializada para sua execução e de equipamentos de custo elevado, além do tempo necessário para realizar as reações, o que impede a utilização da PCR em larga escala em laboratórios de rotina (PINHANELLI, 2014; FOO, 2020; CHIARI, 2010; VALENTE, 2014).

Dessarte, em busca de uma alternativa mais sensível, específica e que requer uma menor estrutura laboratorial em relação à PCR, pode-se citar a técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), a qual trabalha em um menor tempo de reação, com uma maior especificidade e que apresenta um menor custo (IQBAL, 1994; NOTOMI, 2000).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BABESIOSE CANINA

Babesiose canina é uma hemoparasitose de grande importância veterinária no Brasil, sendo endêmica em todo o país e com uma prevalência crescente em áreas específicas (BASTOS *et.al.*, 2004). Esta doença é causada por um protozoário parasita intraeritrocitário, pertencente à classe *Piroplasma*, família *Babesidae* e gênero *Babesia*, sendo *B. canis* e *B. gibsoni* as principais espécies responsáveis pela incidência da doença em cães (TAYYUB *et.al.*, 2019; DE ARAÚJO, 2022; VALENTE, 2014). A espécie *B. canis* é considerada uma *Babesia* grande em relação ao tamanho da *B. gibsoni*, com tamanho de aproximadamente 4 a 5 µm, sendo o dobro do tamanho da *B. gibsoni*, que é considerada uma *Babesia* pequena. Ademais, a *B. canis* é classificada em três subespécies: *B. canis vogeli*, *B. canis canis* e *B. canis rossi* (TAYLOR *et.al.*, 2010). Logo, o que difere as 3 subespécies é a especificidade do vetor, imunidade cruzada e patogenicidade (ZAHLER *et al.*, 1998). Entretanto, no Brasil, a babesiose canina é usualmente causada pela *B. canis vogeli* e *B. gibsoni*, as quais apresentam diferentes níveis de patogenicidade, sendo a *B. gibsoni* altamente patogênica e a *B. canis vogeli* de moderada a baixa patogenicidade (DANTAS-TORRES E FIGUEIREDO, 2006; ZAHLER *et al.*, 1998).

A babesiose está amplamente distribuída geograficamente no Brasil, estando essa diretamente ligada à epidemiologia do seu vetor (SOLANO-GALLEGO *et.al.*, 2008), ocorrendo principalmente em regiões de climas tropicais e subtropicais (VALENTE, 2014). Na região brasileira, a transmissão da *B. canis* ao animal é realizada, principalmente, pelo carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES E FIGUEIREDO, 2006; DANTAS-TORRES, 2008). Esta transmissão se dá através da picada do carrapato vetor, enquanto ele se alimenta do hospedeiro, momento em que ele injeta esporozoítos – protozoário em sua fase infectante (TAYLOR *et.al.*, 2010), presentes em suas glândulas salivares, e estes, nesta forma, penetram na corrente sanguínea do animal. Logo, como detalhado na figura 1, os esporozoítos, já presentes na corrente sanguínea do animal, fixam-se e sofrem endocitose nos eritrócitos, onde ocorre a sua reprodução assexuada por meio de brotamento/divisão binária e as células-filhas se tornam capazes de infectar novos

eritrócitos, ocasionando uma constante lise de hemácias (DE ARAÚJO, 2022; TAYLOR *et.al.*, 2010).

Por sua vez, o carrapato vetor quando se alimenta do animal infectado (cão), ingere o protozoário presente na corrente sanguínea deste, cujo microorganismo sofre uma transformação, na qual tornam-se vermes e, com isso, penetram no intestino do vetor, onde iniciam sua fase sexuada, gerando esporocinetos. Em seguida, os esporocinetos atravessam a parede intestinal e seguem para os ovários e ovos, onde se unem e se fragmentam para se tornar microrganismos redondos, os quais serão transmitidos à próxima geração de carrapatos por transmissão ovariana. Durante a transição dos carrapatos do estágio larval para o estágio de ninfa, o parasita atinge a glândula salivar, onde se reproduz assexuadamente. Este já penetrado nas células da glândula salivar do carrapato, se multiplica intensamente. Esses parasitas adquirem uma forma vermiforme causando danos à célula hospedeira, estabelecendo-se no lúmen da glândula e, assim, como pode-se observar na figura 1, são inoculados no animal hospedeiro durante a alimentação do carrapato, reiniciando o ciclo. (DE ARAÚJO, 2022; TAYLOR *et.al.*, 2010). O período de incubação da doença pode levar de 10 a 21 dias e esta pode se manifestar como hiperaguda, aguda ou crônica, dependendo da patogenicidade da espécie infectante, imunidade, idade do animal e intensidade da parasitemia (VALENTE, 2014). Além disso, é possível que o animal não apresente sintomas visíveis, ou seja, portador assintomático (SALGADO, 2006).

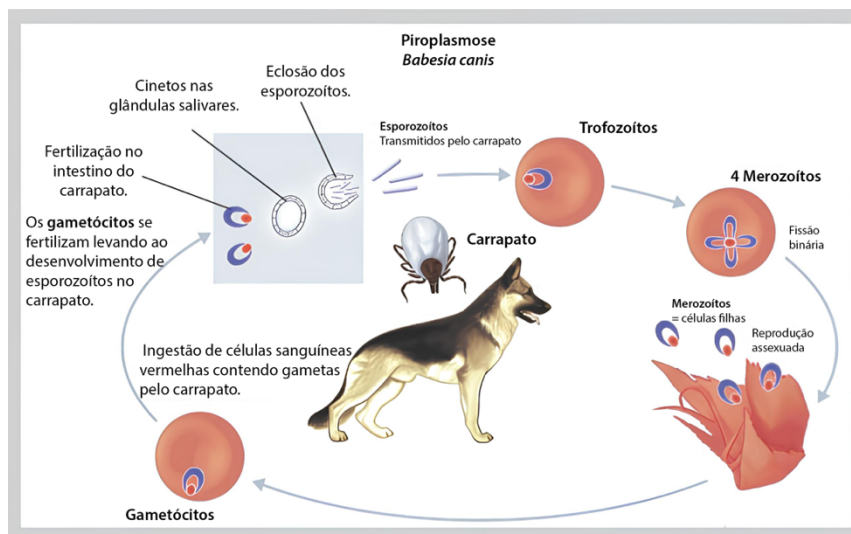


Figura 1 – Esquematização do ciclo de vida do protozoário *Babesia canis*. Fonte: baseada em <https://www.pathvets.in/whats-new>.

A manifestação da babesiose em cães brasileiros revela uma ampla variedade de sintomas clínicos, a depender do estágio da doença, podendo variar da fase subclínica à fase crônica. A forma mais frequente da babesiose é a aguda, na qual são observados sinais como mucosas pálidas, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço), febre, perda de apetite, icterícia, hemoglobinúria (presença de sangue na urina), taquicardia, taquipneia (respiração acelerada), êmese e depressão. Alguns animais podem desenvolver complicações como hepatopatia (doença do fígado), insuficiência renal aguda, coagulação intravascular disseminada (CID) e síndromes respiratórias (DE ARAÚJO, 2022; MATHE *et al.*, 2006; VALENTE, 2014).

Na fase hiperaguda, pode ocorrer acidose metabólica, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e estase vascular (DE ARAÚJO, 2022). Pode-se citar também a forma subclínica da doença, a qual é comumente observada em cães que conseguiram superar a fase aguda da infecção, porém continuam abrigando o hemoparasita em seus órgãos, como o baço e o fígado. Nessa fase, os cães não apresentam sintomas evidentes, mas podem progredir para a forma crônica da doença (O' DWYER E MASSARD, 2002).

Já na fase crônica, os animais podem vir a apresentar febre intermitente, hiporexia ou anorexia, perda de peso, linfadenopatia e esplenomegalia. Nesta fase, os parasitas são sequestrados na rede de capilares do baço, do fígado e de outros órgãos, a partir de onde são liberados periodicamente na circulação (TAYLOR *et.al.*, 2010; VALENTE, 2014). Quando há infecção concomitante com outros hemoparasitas, o quadro clínico do animal pode se agravar (DE ARAÚJO, 2022).

2.2 METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO

A babesiose pode ser identificada por uma variedade de técnicas e procedimentos médicos, embora a análise microscópica do esfregaço sanguíneo de um indivíduo infectado seja o método mais comumente realizado na prática rotineira por sua simplicidade, rapidez e baixo custo (SOLANO-GALLEGO E BANETH, 2011).

O diagnóstico parasitológico direto, como é chamado, é obtido pela visualização dos merozoítos intraeritrocitários em esfregaços de sangue periférico e na camada leucocitária de animais suspeitos de terem babesiose como indicado por

O'Dwyer & Massard (2002). Este método, que utiliza amostras de sangue obtidas da ponta da orelha dos cães e coloridas com Giemsa, aumenta a probabilidade de detectar eritrócitos infectados, de acordo com Brandão & Hagiwara (2002). Tal procedimento é particularmente eficaz em estágios agudos da doença, no qual há alta parasitemia, no entanto, sua sensibilidade é limitada, mas possui alta especificidade, especialmente no diagnóstico de infecções agudas durante períodos febris.

Porém, o exame direto não permite a distinção de espécies e subespécies do parasita, além de não ser adequado para o diagnóstico em situações de baixa parasitemia, como em casos crônicos da doença, tornando necessária a complementação do diagnóstico por técnicas mais sensíveis como testes imunológicos (YAMANE *et al.*, 1993; TAYYUB *et al.*, 2019; DANTAS-TORRES E FIGUEIREDO, 2006). Dentre os testes sorológicos utilizados para diagnosticar anticorpos contra *Babesia canis*, o teste de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) se destacam. (RIBEIRO *et al.*, 1990; SALGADO, 2006; DANTAS-TORRES E FIGUEIREDO, 2006).

Estes exames sorológicos permitem a identificação de pacientes assintomáticos e o diagnóstico de infecções crônicas, especialmente quando o nível de parasitemia é baixo ou indetectável no esfregaço de sangue periférico. A RIFI é considerada um teste com moderada especificidade, o que pode levar a falsos positivos (VALENTE, 2014). Vários outros métodos, incluindo o ensaio ELISA, foram descritos para a detecção da doença (SOLANO-GALLEGO E BANETH, 2011). O ELISA é uma ferramenta confiável e valiosa para a detecção da babesiose, apesar de algumas limitações. No entanto, o diagnóstico via testes sorológicos é limitado na ausência de sinais clínicos e informações sobre o paciente (O'DWYER E MASSARD, 2002).

Recentemente, métodos moleculares, como a PCR, ganharam destaque devido à sua precisão e sensibilidade na detecção da infecção por *Babesia* no sangue do hospedeiro. A reação PCR possibilita a distinção entre várias espécies, o que não é possível com o método do esfregaço sanguíneo (TAYYUB *et al.*, 2019). Este exame é altamente específico e sensível na pesquisa molecular de *Babesia sp.*, alcançando até 100% de precisão em alguns casos (DANTAS-TORRES E FIGUEIREDO, 2006; VALENTE, 2014). Esta técnica pode detectar o agente em infecções agudas, subclínicas ou crônicas, mesmo em casos de baixa parasitemia.

Contudo, o sucesso e a qualidade da amplificação do alvo por PCR dependem fortemente da pureza dos ácidos nucleicos extraídos. A presença de inibidores, como a Imunoglobina G, ureia, proteinase K e altos níveis de sais, compromete a sensibilidade da técnica, podendo gerar resultados imprecisos na detecção e amplificação do ácido nucleico.

Apesar de a PCR ser específica, sua eficácia pode ser comprometida se os inibidores não forem adequadamente removidos. Além disso, os ciclos de aquecimento necessários para a técnica tornam-na desafiadores em locais com recursos escassos. Devido a tais limitações, vários métodos de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos foram introduzidos, buscando excluir a necessidade de termocicladores (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Todavia, seu alto custo e a necessidade de pessoal treinado para sua execução são algumas de suas desvantagens, limitando a aplicação da PCR ao diagnóstico da doença em larga escala no Brasil (DANTAS-TORRES E FIGUEIREDO, 2006; PINHANELLI *et al.*, 2014).

A verificação da babesiose canina também pode ser feita através da análise do histórico médico e do exame físico do cão em conjunto com exames laboratoriais que possibilitam identificar diferentes espécies de *Babesia* spp. O prognóstico da babesiose é determinado pelo momento do diagnóstico, pelo estado de saúde geral do animal e pela presença de outras infecções simultâneas (DE ARAÚJO, 2022). Esta avaliação clínica, frequentemente, se baseia na combinação de sintomas e mudanças hematológicas.

Contudo, devido à similaridade dos sintomas com outras doenças, apenas estes indicadores podem não ser determinantes para um veredicto preciso. Para consolidar e confirmar a identificação dos microrganismos que compõem essas enfermidades, várias abordagens são empregadas, incluindo exames parasitológicos diretos, análises sorológicas e procedimentos moleculares.

Uma abordagem que merece destaque, é a técnica Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), que utiliza o deslocamento da fita para amplificar o DNA (NOTOMI *et al.*, 2000; MORI *et al.*, 2001; NAGAMINE *et al.*, 2002). Ao contrário da PCR, a técnica LAMP reconhece seis regiões específicas do gene, não se limitando a uma única área específica (OLIVEIRA *et al.*, 2016). A eficiência desta técnica é destacada pela sua capacidade de operar isotermicamente, permitindo uma amplificação eficaz sem a necessidade de mudanças térmicas (MORI *et al.*, 2001).

Assim, a LAMP oferece um diagnóstico preciso com estrutura laboratorial simplificada, ideal para laboratórios, instituições educacionais e clínicas veterinárias (CHIARI, 2010).

No Brasil, o tratamento preferido para a babesiose canina envolve o uso de dois fármacos: - O *Diminazene Diaceturate* (Diaceturato de Diminazeno), o qual é administrado em apenas uma dose entre 2.5-3.5 mg/kg via subcutânea ou intramuscular; - e o *Imidocarb Dipropionate* (Dipropionato de Imidocarb), em casos de infecções por babesias maiores, como a *B.canis*. Este é administrado em duas doses entre 5-7 mg/kg, com um intervalo de 2 semanas entre elas, via subcutânea ou intramuscular (MILLER *et al.*; BRANDAO E HAGIWARA, 2002).

2.3 AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP)

A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é focada na amplificação do DNA de patógenos e baseia-se no princípio de deslocamento de fitas através da Bst DNA polimerase. Esta utiliza-se da enzima DNA polimerase encontrada no *Bacillus stearothermophilus* (Bst DNA Polimerase) para a amplificação do DNA alvo (NZELU *et al.*, 2019; GONCALVES *et al.*, 2014). Um dos diferenciais desta enzima utilizada pela LAMP é a capacidade da mesma de desdobrar as fitas de DNA, permitindo a amplificação em um aquecimento padrão ou em banho de água a uma temperatura específica, dispensando termocicladores caros (NZELU *et al.*, 2019).

Além disso, a LAMP apresenta inúmeras vantagens, como operação a temperatura constante, tempo de reação entre 15 e 60 minutos, detecção visual através do uso de corantes fluorescentes, alta sensibilidade e especificidade, ausência de substâncias inibidoras e utilização de equipamentos acessíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2016; TOMITA *et al.*, 2008).

E, além da utilização da técnica LAMP para a amplificação de DNA, é possível empregá-la na amplificação de RNA através da adição da enzima transcriptase reversa em conjunto com a Bst DNA polimerase, em uma variação denominada RT-LAMP (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Esta técnica molecular de amplificação destaca-se por sua alta especificidade, reconhecendo seis sequências distintas do DNA alvo através de um

conjunto de quatro *primers* (NZELU, *et al.*, 2019; GONCALVES *et al.*, 2014; CHIARI, 2010). Este, por sua vez, consiste em dois primers internos de aproximadamente 40-42 pb denominados FIP (*forward inner primer*) e BIP (*backward inner primer*), e dois externos de cerca de 17-20 pb, denominados de F3 e B3 (CHIARI, 2010; NZELU, *et al.*, 2019). E é projetado com base em seis áreas específicas da sequência alvo, sendo F3c, F2c e F1c na extremidade 3', e B1, B2 e B3 na extremidade 5' (figura 2) (CHIARI, 2010). Os iniciadores FIP e BIP, conhecidos como pares internos, e F3 e B3, como pares externos, são responsáveis pela amplificação da sequência-alvo, a qual ocorre em duas etapas, a fase cíclica e a não-cíclica (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Enquanto os iniciadores externos desempenham papel apenas na fase não-cíclica, deslocando a fita complementar formada pelos primers FIP e BIP, os internos são essenciais na formação de *loops* nessa mesma fase e na subsequente amplificação alternada na fase cíclica (OLIVEIRA *et al.*, 2016; NZELU *et al.*, 2019)

a

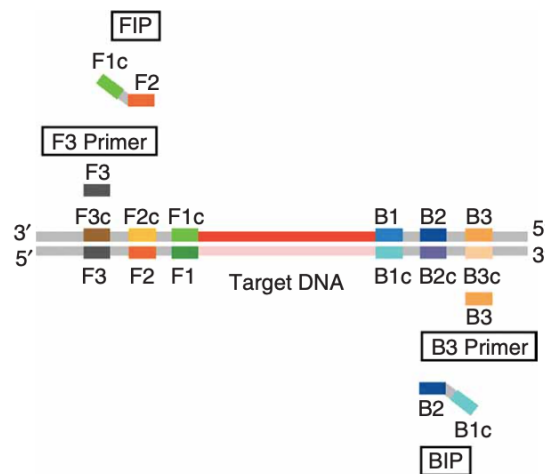


Figura 2 – Esquematização das seis regiões distintas designadas no DNA alvo, rotuladas como F3, F2, F1, B1c, B2c e B3 a partir da extremidade 5', juntamente com os primers (F3, B3, FIP e BIP).
Fonte: Tomita, 2008.

A fase não-cíclica (figura 3) inicia-se quando a enzima Bst torna-se ativa em uma temperatura específica e desloca uma fita do DNA de dupla hélice, gerando fitas simples, sem a necessidade de temperaturas elevadas para essa separação (GONCALVES *et al.*, 2014). Este processo envolve a participação dos iniciadores internos, os quais criam loops nas pontas do DNA e fornecem uma base para a subsequente amplificação da sequência alvo. Especificamente, FIP e F3 atuam

no modo *sense*, enquanto BIP e B3 no modo anti-sense (NOTOMI *et al.*, 2000; CHIARI, 2010). Nesta etapa ocorre a síntese de uma fita de DNA complementar a partir da extremidade 3' da zona F2 do iniciador FIP. O iniciador interno FIP se liga à área F2c da sequência desejada, orientando a enzima Bst polimerase a começar a produção de uma fita complementar. À vista disto, quando o iniciador externo F3 é acoplado à zona F3c, o iniciador FIP se desprende do DNA alvo, dando continuação a formação do DNA complementar. Uma fita dupla é formada a partir da fita de DNA que foi sintetizada pelo iniciador F3, usando o DNA molde como referência. O iniciador FIP ligado a cadeia complementar é liberado como fita simples e, em seguida, essa fita simples é responsável por formar um laço (loop) em sua extremidade 5', devido ao alinhamento da zona F1c com a F1. Os iniciadores externos, em contrapartida, são os responsáveis por mover a fita complementar formada pelos primers FIP e BIP (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Assim sendo, o DNA complementar de fita simples deslocado, serve como molde para o acoplamento do iniciador BIP e, posteriormente, o iniciador B3 se liga à extremidade 3' do DNA original, liberando o DNA complementar gerado pelo BIP, criando loops nas estruturas terminais (CHIARI, 2010).

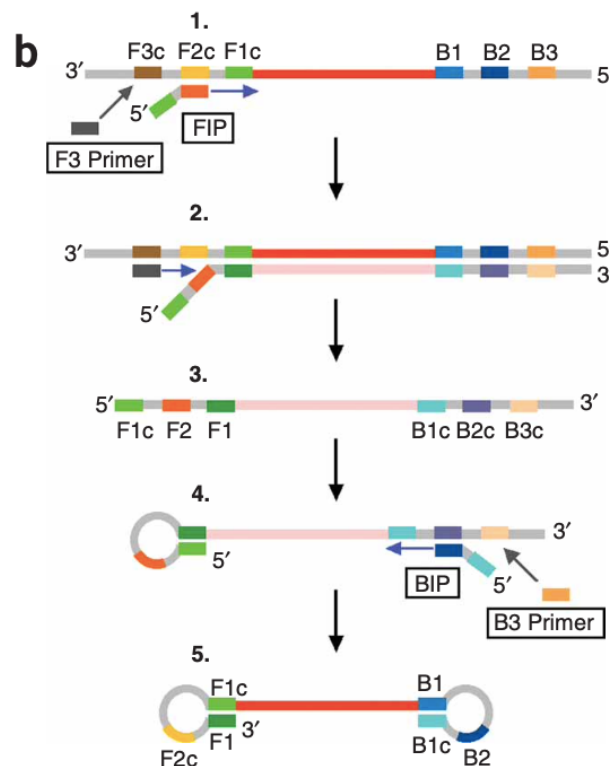


Figura 3 – Início da etapa não cíclica e formação dos loops. Fonte: Tomita, 2008.

A fase subsequente à fase não cíclica, ou seja, a fase cíclica (figura 4), inicia-se com a atuação da enzima em uma extremidade do loop, o qual atua como molde para a síntese. Notavelmente, nesta etapa, os locais de ligação dos primers externos estão ausentes, fazendo com que a fita gerada pelo primer interno não seja deslocada pelo externo, mas sim pelos loops formados. Desta forma, na fase cíclica, os primers internos têm papel no anelamento e na síntese das regiões alvo F2c, F1c, B1 e B2 (NOTOMI *et al.*, 2000).

Em suma, o iniciador FIP se conecta à estrutura simples em formato de halteres (loop), impulsionando a síntese do DNA. O DNA resultante forma laços na extremidade 3', dada a compatibilidade entre B1 e B1c. Assim, a síntese inicia-se a partir da região B1, usando sua própria configuração como base, liberando o FIP e sua contraparte. Esta formação única origina uma estrutura anelar, devido à complementaridade das regiões F1 - F1c e B1 - B1c. Paralelamente, o iniciador BIP se conecta na área B2c, levando à criação de padrões que alternam, lembrando um laço duplo inicial (CHIARI, 2010). Esta etapa cíclica prossegue até que todos os primers internos se esgotem, e ao finalizar o ciclo, fragmentos diversos e de múltiplos tamanhos são produzidos, podendo alcançar cerca de 10^9 cópias do alvo em menos de uma hora (CHIARI, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

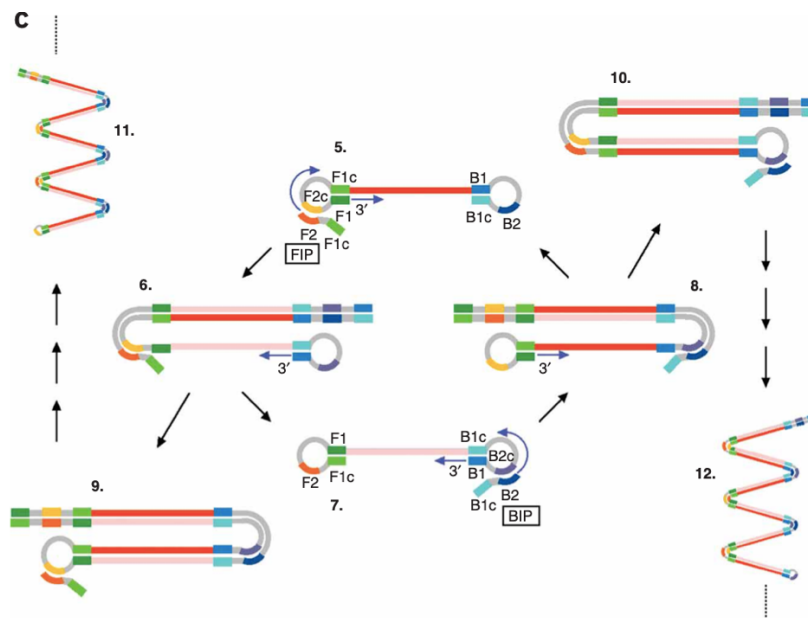


Figura 4 – Início da etapa cíclica e produção de diversas cópias do alvo. Fonte: Tomita, 2008.

Todavia, em algumas situações, há a incorporação de dois primers adicionais à técnica LAMP, denominados de Loop Primers (FLP e BLP) que são complementares às áreas entre F1-F2 e B1-B2 (figura 5), responsáveis por acelerar a reação ao oferecer pontos adicionais de início de amplificação e garantir maior especificidade (RIBEIRO *et al.*, 2021; NAGAGIME *et al.*, 2002; GONCALVES *et al.*, 2014). Estas áreas, por não serem habitualmente acessadas pelos primers internos, quando abordadas com o auxílio dos Loop Primers, potencializam a rapidez da reação e sua eficácia. Com a ação destes, as alças de fita simples tornam-se pontos de partida para a síntese de DNA, acelerando o tempo de amplificação para cerca de 30 minutos (RIBEIRO *et al.*, 2021). De acordo com Nagamine *et al.* (2002), ao utilizar os Loop Primers, observou-se uma redução de 33% a 50% no tempo de amplificação, permitindo a amplificação em apenas 30 minutos.

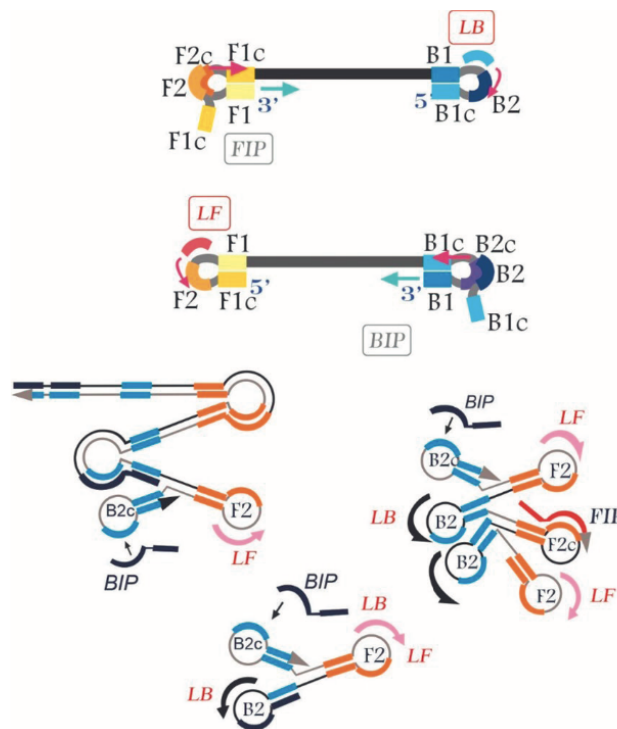


Figura 5 – Esquema de atuação dos Loop Primers. Fonte: Ribeiro, 2021.

À vista disso, a fim de sintetizar um conjunto ideal de primers que alie sensibilidade e especificidade, é importante considerar diversos fatores. A distância entre as extremidades 5' de F2 e B2 deve variar de 120-180pb, enquanto entre F2-F3 e B2-B3 deve ser de 0-20pb. A formação de loops, por sua vez, precisa ter distâncias entre 40-60pb. É essencial também que os primers tenham em sua composição

aproximadamente 50-60% de CG e 40-50% de AT, evitando-se estruturas secundárias e regiões ricas em AT nas extremidades 3', além de possuir temperaturas de *melting* (T_m) semelhantes e não excessivamente baixas para prevenir o pareamento inadequado. Ademais, a complementaridade com outros primers deve ser evitada, bem como a presença de sequências palindrômicas (GONCALVES *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2021).

Não obstante, obstáculos persistem na execução da técnica LAMP. Um dos mais preocupantes é a propensão à contaminação das reações, levando a resultados falso-positivos. A ampla geração de produtos amplificados pode causar contaminações cruzadas (PARIDA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2016) e contaminação por aerossóis (TAO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2021). Portanto, é vital manusear e realizar a técnica com rigor e sempre incluir controles negativos para identificar contaminações (GONCALVES *et al.*, 2014; TOMITA *et al.*, 2012). O elevado número de primers usados na LAMP pode também propiciar interações indesejadas entre os primers, principalmente na formação de dímeros, resultando em amplificações atípicas (RIBEIRO *et al.*, 2021).

Dessarte, quando o controle negativo mostra resultado positivo pode ser devido à contaminação ou amplificação imprecisa causada pela dimerização do primer. Para uma análise mais aprofundada, o controle negativo deve ser examinado através de eletroforese em gel de agarose: um padrão de bandas similar à reação positiva indica contaminação, enquanto uma aparência difusa sugere uma reação atípica, geralmente causada pela dimerização dos primers (RIBEIRO *et al.*, 2021).

2.3.1 Métodos de detecção visual

A técnica LAMP é notória não apenas por sua capacidade de manipulação isotérmica, mas também pelo método de detecção visual que oferece. Durante o processo de amplificação do DNA pela LAMP, ocorre a liberação de íons pirofosfato provenientes da ligação de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs). Estes íons, quando entram em contato com os íons de magnésio do tampão da LAMP, formam o pirofosfato de magnésio, um subproduto insolúvel da reação (GONCALVES *et al.*, 2014). Esta formação é possível devido à grande afinidade dos íons por metais

divalentes como o magnésio, culminando na criação de um precipitado que torna a reação turva (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Diferentemente da PCR convencional, essa formação de precipitado permite uma verificação visual direta dos resultados da reação LAMP, eliminando a necessidade de eletroforese. No entanto, se o precipitado não for claramente visível, ainda é possível confirmar a amplificação do DNA pela LAMP através da eletroforese em gel de agarose ou sistemas colorimétricos (RIBEIRO *et al.*, 2021).

Uma técnica adicional para a detecção visual do resultado envolve o uso de corantes fluorescentes, como o SYBR Green I, que têm uma propensão para se ligar ao DNA (GONCALVES *et al.*, 2014). Estes corantes, ao interagirem com as fitas de DNA, produzem fluorescência, a qual é proporcional ao número de fitas de DNA, permitindo uma rápida e fácil interpretação dos resultados (OLIVEIRA *et al.*, 2016). No entanto, para utilizar o SYBR Green I, é essencial adicionar 1µL do mesmo após a reação, já que este pode inibir a amplificação (TAO *et al.*, 2011). O seu uso resulta em uma mudança de cor nos tubos positivos para verde fluorescente, enquanto os tubos negativos mantêm sua cor laranja original (GOLCALVES *et al.*, 2014).

Apesar das vantagens da detecção visual da LAMP a partir da formação de precipitado, em certos casos, sua sensibilidade pode ser considerada inferior quando comparada com métodos que usam SYBR Green I e eletroforese, pois poderia exigir um maior número de cópias de DNA para evidenciar um resultado positivo (RIBEIRO *et al.*, 2021).

Diferentemente da PCR, após a reação, os resultados da LAMP visualizados em gel de agarose apresentam um padrão distinto, caracterizado por diversas bandas, que representam fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (NOTOMI *et al.*, 2000; GONCALVES *et al.*, 2014).

2.3.2 Reagentes

Reagentes essenciais para a realização da técnica LAMP incluem a enzima Bst Polimerase, Isothermal Buffer, MgSO₄, Primers e dNTPs. Como reagente adicional de suma importância à amplificação, pode-se citar a betaína, responsável por atuar na desestabilização da hélice do DNA, tendo papel essencial na

potencialização da eficiência da amplificação de sequências alvo de DNA, minimizando a amplificação de sequências indesejadas. Além disso, ela possui a capacidade de reduzir a formação de estruturas secundárias em regiões de DNA com alta presença de guanina e citosina, otimizando a amplificação (RIBEIRO *et al.*, 2021; ABDULLAHI *et al.*, 2015; HENGGEN, 2017). Dada sua natureza como análogo de aminoácido, carregada positivamente e negativamente perto de pH neutro, esta também harmoniza a temperatura de Melting (T_m) entre os pares de bases AT e GC, ajudando na separação das hélices de DNA (RIBEIRO *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2017). Outra vantagem do uso da betaína é que ela atua como um osmoprotetor e, assim como a albumina sérica bovina (BSA), aumenta a resistência da polimerase à desnaturação (HENGGEN, 2017).

Além da betaína, um fator de grande importância à realização da técnica é a proporção dos primers internos em relação aos externos, onde a concentração dos internos deve ser superior (RIBEIRO *et al.*, 2021). Ademais, a quantidade do reagente magnésio, um coadjuvante essencial na LAMP, também pode alterar significativamente o resultado da técnica. O $MgSO_4$ age como um impulsionador da Bst DNA polimerase e o controle da sua concentração é crucial, pois, em excesso, pode estabilizar o DNA e promover ligações impróprias de primers, levando à amplificação inadequada. Em contraste, baixos níveis de magnésio comprometem a eficiência da polimerase, pois este age como seu cofator (RIBEIRO *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Desenvolver e padronizar a técnica LAMP qualitativa para detecção do hemoparasita zoonótico *Babesia canis*, responsável por causar a doença conhecida como babesiose canina, a qual acomete cães no Brasil e no mundo.

- Objetivo Específico

Padronizar a técnica LAMP qualitativa para a detecção eficiente do hemoparasita zoonótico *Babesia canis*. O foco será otimizar a técnica LAMP para identificar a presença do hemoparasita em diversos tipos de amostras, como sangue, cultura e tecido criopreservado. Este estudo tem o propósito de desenvolver um protocolo confiável e replicável, através da definição de parâmetros críticos da reação, como determinar o tempo de incubação e a temperatura ideal para a amplificação do DNA, bem como estipular as concentrações apropriadas dos reagentes, para que este possa ser empregado em laboratórios de diagnóstico para a detecção rápida e precisa de *Babesia canis*, contribuindo assim para o controle e prevenção da babesiose canina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram selecionadas amostras de cães positivados sorologicamente e com quadro clínico condizente para babesiose, sendo elas 01 amostra de sangue e uma amostra de tecido (baço), provenientes do Laboratório Devax Biotecnologia. Além disso, para a padronização, utilizou-se cultura verdadeira positiva para *Babesia canis*. Ademais, foi selecionada uma amostra de cultura de *Leishmania infantum*, utilizada para teste de reação cruzada, seguindo o protocolo padronizado. As amostras citadas foram armazenadas sob temperatura de -80°C até a extração do DNA.



Figura 6 – Amostras de cultura, sangue e tecido utilizadas na padronização. Fonte: autoria própria, 2023.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA de *Babesia canis*, a partir das amostras de cultura, sangue e tecido utilizadas, foi realizada através do protocolo do Kit de Extração Miniprep Plus Quick-DNA (Zymo Research). Em seguida, foi aferida a concentração de DNA de cada amostra extraída através do equipamento NanoDrop. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento de realização das reações LAMP.

4.2.1 Protocolo de extração

No desenvolvimento de um protocolo de extração de DNA unificado, com base nos procedimentos para cultura, sangue e tecido, o processo iniciou com a preparação da amostra. No caso de culturas, a amostra foi centrifugada a 6.000 rpm durante 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspensando os pellets em 500 µl de PBS 1X estéril. Em seguida, ocorreu a desagregação por vórtex e nova centrifugação nas mesmas condições.

Para as amostras sanguíneas, o processo começou diretamente com a adição de reagentes, sem centrifugação prévia. Já para as amostras teciduais, até 25 mg de tecido foram adicionados em 95 µl de água milliQ, 95 µl de Solid Tissue Buffer (Blue) e 10 µl de Proteinase K, sendo a mistura agitada e incubada a 55 °C por 3 horas. Após a incubação, as amostras teciduais foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto para remover detritos insolúveis, transferindo o sobrenadante para um novo tubo.

Em todas as amostras, independentemente da origem, foram adicionados 200 µl de BioFluid & Cell Buffer e 20µl de proteinase K, misturando bem e incubando a 55°C por 10 minutos. Seguiu-se a adição de 420 µl de Genomic Binding Buffer, homogeneizando as amostras. A mistura foi então transferida para uma coluna Zymo-Spin™, sobre um tubo de coleta, e centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto, descartando-se o fluxo.

Posteriormente, em um novo tubo de coleta, adicionou-se 400 µl de DNA Pre-Wash Buffer à coluna, centrifugando por 1 minuto e esvaziando o tubo. Após isso, foram adicionados 700 µl de g-DNA Wash Buffer, seguidos de centrifugação e esvaziamento do tubo. Uma nova adição de 200 µl de g-DNA Wash Buffer foi feita, seguida de centrifugação e descarte do fluxo.

Para finalizar a extração do DNA, a coluna foi transferida para um eppendorf limpo, onde 50 µl de DNA Elution Buffer foram adicionados. Após uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 1 minuto para obter o DNA eluído. Este protocolo unificado assegurou a consistência e eficácia na extração de DNA a partir de diferentes tipos de amostras, respeitando as especificidades de cada uma delas.

4.3 PADRONIZAÇÃO DA LAMP

As reações do ensaio LAMP foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). Em todas as reações, controles positivos e negativos foram empregados para verificar a especificidade da reação e a possível ocorrência de contaminação. O controle positivo utilizado foi obtido através de amostras de cultura verdadeira positiva para *Babesia canis*, além de amostras (sangue e tecido) de cães positivados sorologicamente e com quadro clínico condizente para babesiose. Ao controle negativo foi adicionado água MilliQ no lugar da amostra. As reações foram incubadas em termobloco.

4.3.1 Primers

As sequências do par de primers dessalinizados utilizados na detecção de *Babesia canis* através do ensaio LAMP se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 – Lista de primers utilizados na detecção de *Babesia canis*.

Primer	Sequência (5' → 3')
F3	TTCATTATGCTTTTGGCACA
B3	GCAAGAATCACGTTAATAAGGTA
FIP	CCATCCATCTTTTAGACAGCATCTATCGCAATAGTAATGGAAGATGAG
BIP	TCATAACTTCGCTTGTGGAGGGCAATGCTTTTCACCCGCT

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.



Figura 7 – Primers utilizados na amplificação de *Babesia canis*. Fonte: autoria própria, 2023.

Os dois conjuntos de primers empregados foram extraídos do estudo de MÜLLER, H. et al. 2010, projetados com base no gene da proteína *putative rhoptry* (RAP-1) de *Babesia canis* (número de acesso ao GenBank M91168), usando o programa Primer Explorer. Durante a invasão de células vermelhas do sangue (eritrócitos), a proteína RAP-1 é secretada por organelas apicais e é crítica em todas as espécies de *Babesia* estudadas. Essa proteína, que tem cerca de 40-60 kDa de tamanho, está presente em múltiplas cópias de genes e é altamente conservada entre as espécies (30-45% de identidade). Sua estrutura, particularmente na região N-terminal, é notavelmente constante, o que sugere um papel funcional importante. RAP-1 tem sido amplamente explorada como um candidato a vacina e para diagnóstico da doença (NIU *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2007).

4.3.2 Amplificação Isotérmica Mediada Por Loop

Para a padronização, foram realizadas as reações utilizando dois pares de primers (F3, B3, FIP e BIP), variando os parâmetros temperatura, tempo e concentração do reagente betaína. Testaram-se a amplificação de *Babesia canis* em quatro diferentes temperaturas (60 °C, 61 °C, 62 °C e 63 °C), sete períodos de incubação (60, 55, 50, 45, 40, 35 e 30 minutos) e sete diferentes concentrações de betaína (0M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.2M, 1.4M e 1.6M) (figura 9). A parada da reação após o período de incubação foi realizada a 90°C por 2 minutos. As reações incluíram uma duplicata de controle positivo (24uL de Mix e 1 uL de amostra) e uma duplicata de controle negativo (24uL de Mix e 1uL de água).

A padronização foi feita utilizando o Kit Bst 2.0 Polymerase (Cellco) seguindo os parâmetros do fabricante (Figura 8). Assim, na mistura (Mix) da LAMP para cada reação, foi estabelecido um volume total de 25 µl, o qual continha os reagentes do Kit Bst 2.0 Polymerase (Cellco), como tampão Isothermal Buffer 10x concentrado (200 mM Tris-HCl pH 8.8, KCl, (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄ e detergentes) com concentração final desejada de 1x; solução estoque de MgSO₄ (25mM MgSO₄), com concentração final desejada de 6mM e 8U da enzima Bst 2.0 Polymerase. Além disso, foi incluído 1,4 mM de cada dNTPs (Figura 8), diferentes concentrações de betaína, 0,2 µM de cada primer F3 e B3, e 1,6 µM para FIP e BIP.

As concentrações e volumes utilizados dos reagentes para cada reação se encontram na Tabela 2.

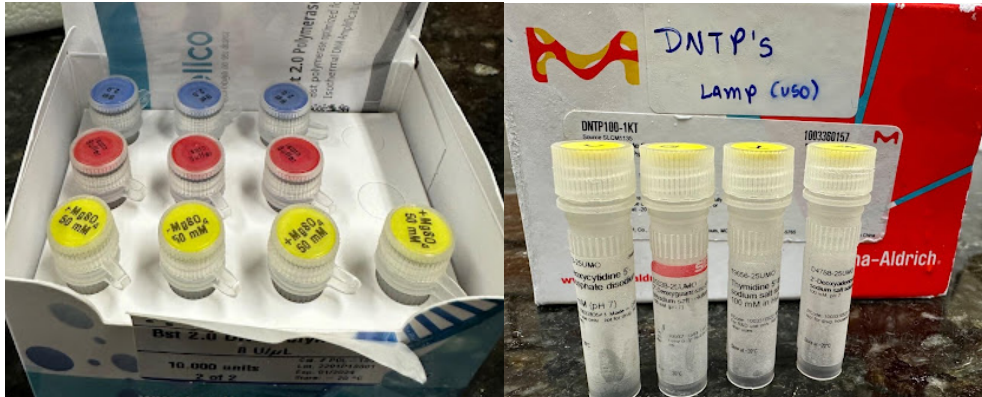


Figura 8 – Kit Bst 2.0 Polymerase e DNTPs utilizados. Fonte: autoria própria, 2023.

Tabela 2 – Volumes e concentrações dos reagentes para cada reação.

REAGENTES	Concentração do reagente	Concentração desejada	Volume Final (de uso por amostra)
H ₂ O	-	-	7 µL
Tampão Ishotermico termophol 10X	10x	1x	2,5 µL
Betaína	10M	1,2 M	3 µL
MgSO ₄ (100mM)	50 mM	6 mM (8 mM total)	3 µL
dNTPs	10 mM	1,4 mM	3,5 µL de cada
F3 e B3	100 mM	0,2 µM	1µL de cada
FIP e BIP	100 mM	1,6 µM	1µL de cada
Bst Polimerase	8000 U	8 U	1µL
DNA	-	-	1 µL
TOTAL			25 µL

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

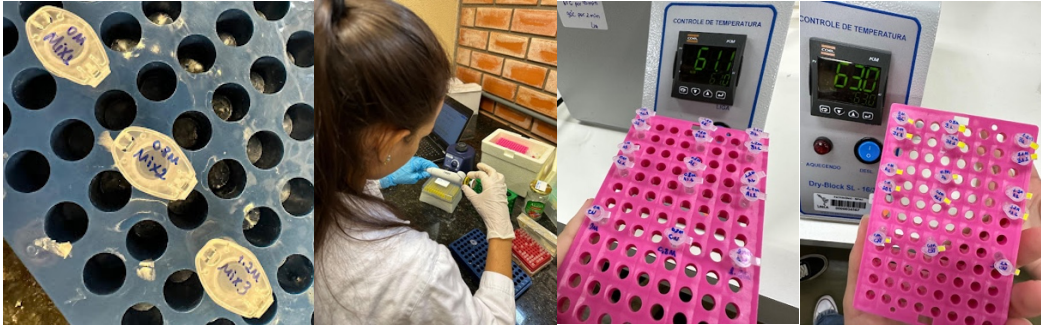


Figura 9 – Execução da padronização do ensaio LAMP seguindo os padrões do fabricante.
Fonte: autoria própria, 2023.

4.3.3 Teste de especificidade dos Primers (Teste de Reação Cruzada)

Após a padronização do ensaio LAMP, a fim de avaliar a especificidade dos primers (F3, B3, FIP e BIP), foram realizadas reações LAMP do patógeno de interesse (*Babesia canis*) com outro agente patogênico, *Leishmania infantum*, patógeno responsável por causar a doença Leishmaniose Visceral Canina. Para isso, realizou-se o ensaio LAMP cinco vezes, seguindo o mesmo protocolo citado no tópico “4.3.2” e concentração/volume dos reagentes apresentados na Tabela 2. Foram utilizadas como amostras uma duplicata de controle positivo (*Babesia canis*), duplicata de controle negativo e duplicata de amostra de cultura de *Leishmania infantum*.

4.3.4 Utilização de SYBR Green I Para Visualização Dos Resultados

A detecção visual do resultado da técnica foi realizada através do uso de 1 μ L por amostra do corante intercalante SYBR Green I (Sigma Aldrich) diluído em 1:10 (10000x concentrado em DMSO).

4.3.5 Eletroforese em Gel de Agarose

A separação dos produtos do ensaio LAMP foi revelada através de eletroforese em gel de agarose a 2% (dois por cento), corado com SYBR Green I. A

identificação dos diferentes tamanhos de fragmentos amplificados foi avaliada com base no tamanho molecular do DNA Ladder de 100pb (padrão molecular), adicionado ao gel para servir de padrão afim de determinar o peso molecular dos produtos. A corrida foi realizada em tampão TAE 1X nas condições de 80 V, por 90 minutos. Após o tempo de corrida, as bandas de DNA foram visualizadas através de um transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação (L-PIX Chemi Molecular Imaging – Loccus Biotec).

5. RESULTADOS

Realizou-se a padronização do ensaio LAMP para detecção de *Babesia canis* e, para isso, primeiramente, amostras de sangue e tecido provenientes de cães positivados sorologicamente para babesiose tiveram seu DNA extraído. As informações sobre a quantidade e pureza do DNA nas amostras de controle positivo e na amostra de cultura de *Leishmania infantum*, utilizada para o teste de especificidade dos primers (reação cruzada), se encontram apresentadas na Tabela 3 e foram obtidas usando o equipamento NanoDrop.

Tabela 3 - Resultado da extração e dosagem do DNA nas amostras utilizadas como controle positivo para *Babesia canis* e amostra de *Leishmania infantum* utilizada no teste de especificidade dos primers.

Amostras	ng/ μ L	A260/A280	A260/A230
Amostra sanguínea (Alerquina)	79.1	1.51	1.08
Amostra de tecido (baço)	107.5	1.78	1.84
Amostra de cultura	87.5	1.72	0.48
Amostra <i>Leishmania infantum</i>	15.7	1.82	1.50

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Logo, com as amostras extraídas, foram realizados testes de padronização (figura 10). Desta forma, os resultados indicaram que a reação foi padronizada de maneira simplificada, amplificando o produto a 62°C, com um tempo de incubação de 60 minutos, com uma concentração de 1.2M de betaína e parada da reação após o período de incubação realizada a 90°C por 2 minutos.

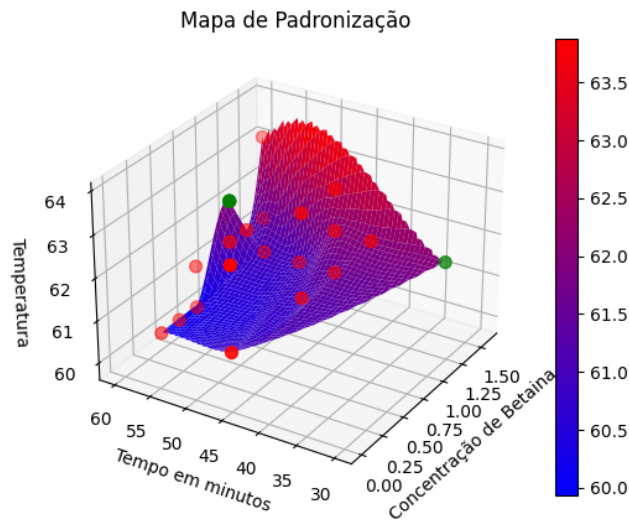


Figura 10 – Gráfico de variação dos parâmetros do ensaio LAMP: temperatura, tempo e concentração de Betaína. Bolinhas vermelhas representam tentativas ineficazes, enquanto bolinhas verdes destacam os parâmetros otimizados para uma reação eficaz, reação padronizada. Fonte: autoria própria, 2023.

A detecção visual do resultado da técnica foi realizada através do uso de 1uL por amostra do corante intercalante SYBR Green I. Como é possível observar na Figura 11, o teste colorimétrico utilizando SYBR Green I mostra a coloração esverdeada na duplicata de controle positivo (CP), correspondente as amostras extraídas de *Babesia canis*, indicando a ocorrência de amplificação. Os controles negativos (CN) e a duplicata de amostra de *Leishmania infantum*, aparecem com a cor alaranjada, indicando a não ocorrência de amplificação e/ou contaminação.

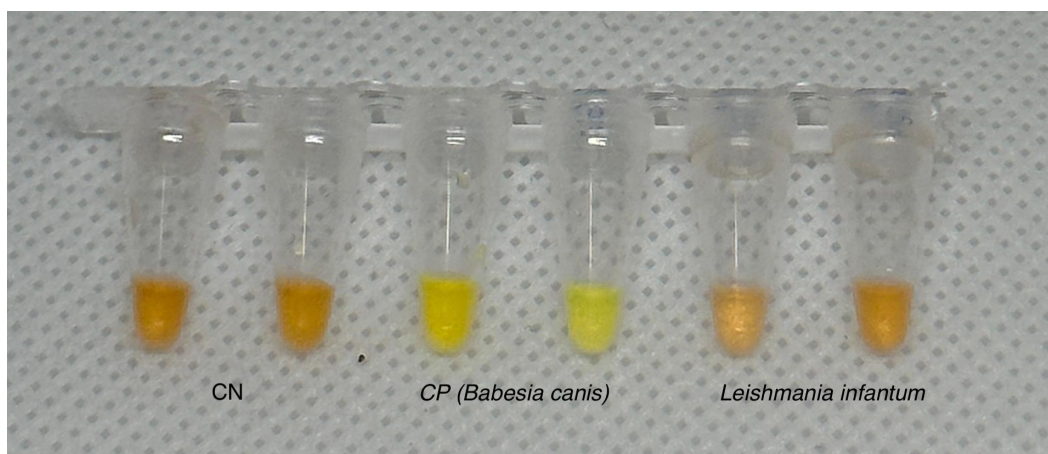


Figura 11 – Detecção visual da coloração das amostras testadas. Observa-se a duplicata de amostras controle positivo (CN) com a cor esverdeada, indicando amplificação, e a duplicata de controle negativo (CN) e *Leishmania infantum* com a cor alaranjada. Fonte: autoria própria, 2023.

No processo de avaliação do sucesso da amplificação do protozoário *Babesia canis* via LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), realizou-se a separação eletroforética em gel de agarose. Duas amostras de controle positivo foram incluídas no gel e ambas apresentaram bandas claramente visíveis após a eletroforese, confirmando a eficácia do protocolo LAMP em amplificar o DNA de *Babesia canis*, validando a metodologia empregada. Ademais, uma duplicata de controle negativo foi analisada para garantir a ausência de contaminação e a especificidade do ensaio. Conforme esperado, nenhuma banda foi observada em ambas as amostras de controle negativo, indicando que não houve amplificação inespecífica ou contaminação no ensaio.

Além disso, uma duplicata de amostra de *Leishmania infantum* foi incluída para avaliar a especificidade do ensaio para *Babesia canis*. Nenhuma banda foi visualizada na duplicata de *Leishmania infantum*, confirmando a alta especificidade do ensaio LAMP para *Babesia canis*. Como observa-se na Figura 12, no poço número 1, visualiza-se o padrão de peso molecular usado para calibrar o tamanho dos fragmentos. Seguindo à direita, nos poços 2 e 3, duas réplicas de controles negativos são mostradas, com nenhuma banda visível. Nos poços 4 e 5, duas réplicas de controles positivos exibem bandas claramente visíveis, validando a eficácia do ensaio LAMP. Logo, os últimos dois poços, 6 e 7, representam amostras de *Leishmania infantum*, nas quais nenhuma banda foi observada.



Figura 12 – Análise do ensaio LAMP por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. Poço 1, marcador de DNA de 100 pb; poços 2 e 3, duplicata de controle negativo; poços 4 e 5, duplicata de controle positivo para *Babesia canis*; poços 6 e 7, duplicata de amostras de *Leishmania infantum*. Fonte: autoria própria, 2023.

6. DISCUSSÃO

Hemoparasitoses caninas são endêmicas no Brasil e emergentes globalmente, com implicações significativas na saúde de cães domésticos, sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade nessa população (DANTAS-TORRES, 2010; VIEIRA, 2017). Essas doenças, na qual a babesiose canina está inclusa, podem ser de difícil diagnóstico devido à variabilidade e inespecificidade dos sintomas clínicos apresentados pelos animais (DE ARAÚJO et al., 2022; HOLANDA et.al., 2019; LASTA, 2011).

Atualmente, métodos diagnósticos como a PCR oferecem maior sensibilidade, mas são limitados por seu alto custo e necessidade de infraestrutura especializada (MYLONAKIS et al., 2009; PINHANELLI, 2014; FOO, 2020; CHIARI, 2010; VALENTE, 2014). Alternativas mais acessíveis e eficazes, como a técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), estão emergindo como potenciais soluções para esses desafios (IQBAL, 1994; NOTOMI, 2000). Desta forma, o foco deste estudo consistiu em elaborar e estabelecer padrões para a técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) a fim de identificar o protozoário *Babesia canis*, responsável pela babesiose canina.

A padronização da técnica foi realizada de maneira simplificada através da consulta da literatura e seguindo os parâmetros indicados pelo fabricante do kit da enzima Bst, como a concentração de tampão, MgSO₄, DNTPs, primers e enzima, completando o volume de 25uL de Mix com água.

Em uma padronização de LAMP, normalmente variam-se alguns parâmetros como tempo e temperatura, desta forma, foram escolhidas diferentes temperaturas, tempo e concentração de betaína para a padronização. A variação de tempo e temperatura foi baseada nas recomendações do fabricante (Kit Bst 2.0 Polymerase - Cellco) em relação as condições ótimas da enzima, a qual atua entre 30 e 60 minutos e entre 60 graus e 65 graus.

Além disso, a temperatura de melting (temperatura ideal para o primer se ligar corretamente ao DNA que se deseja amplificar) dos primers, previamente analisada através do software "OligoAnalyzer", foi levada em consideração para a escolha do tempo e temperatura na padronização. As concentrações das análises de bioinformática dos primers seguiram os parâmetros recomendados pelo fabricante do Kit Bst 2.0 DNA Polimerase (CellCo).

Assim sendo, durante a padronização, avaliou-se que a amplificação ocorre com apenas 30 minutos de reação a 62 graus, com 02 minutos a 90 graus de parada de reação. Contudo, o resultado sofria muita variação em relação a cada amostra (controle positivo) utilizada, a depender da quantidade de DNA mensurado (carga parasitária).

Diferentemente do apresentado no estudo de MÜLLER, H. et al. 2010, onde a reação ocorreu a uma temperatura de 64 °C por 45 minutos, o tempo de reação que se mostrou ideal para todos os tipos e dosagem de amostras nesta padronização foi de 60 minutos, a uma temperatura de 62 °C. A variação de temperatura e tempo de incubação das amostras utilizadas pelo artigo de referência e essa padronização, pode estar associada ao uso de diferentes Kits da enzima Bst Polimerase.

Ademais, no desenvolvimento de ensaios de amplificação LAMP, a otimização da concentração de betaína é um passo fundamental. Este reagente é essencial para incrementar a especificidade da amplificação. Conforme destaca o estudo de otimização realizado por FOO et al. (2020), o uso de concentrações mais baixas desse componente (0,4 M) pode levar a resultados falsos negativos.

Por outro lado, uma concentração excessivamente alta de betaína (1,6 M) tem o potencial de comprometer a eficiência da amplificação e diminuir a sensibilidade do teste. Dessa forma, a calibração precisa da betaína é indispensável em cada implementação de ensaio LAMP, com o objetivo de evitar amplificação inespecífica e, ao mesmo tempo, manter sua eficiência de amplificação. Tanto que, nesta padronização, observou-se que o controle negativo se mostrava reagente a uma concentração de betaína menor que 1.2M e, a uma concentração de betaína maior que 1.2M, o controle positivo se mostrava não reagente, desta forma, a altas concentrações, a betaína inibia a reação. Dessarte, a concentração de 1.2M de betaína revelou ser ideal para esta padronização.

Além do teste de tempo, temperatura e betaína, testou-se aumentar/reduzir a concentração dos primers na tentativa de alcançar um melhor resultado. Contudo, constatou-se que, nesta padronização, não houve diferença na reação com esta mudança.

Já a respeito do método de detecção visual utilizado (SYBR Green I), apesar de se apresentar como um método de simples uso, uma vez adicionado ao final da reação, obrigou o pesquisador a realizar a abertura dos tubos, pelo que se pode verificar que apresentavam milhares de *amplicons*, evidenciando que o ato de

abertura dos tubos eleva demasiadamente o risco de ocorrência de contaminação do ambiente e, conseqüentemente, de ocorrer contaminação nas futuras reações a serem realizadas.

Devido à abertura dos tubos ao final das reações, ao decorrer da padronização, houve alguns problemas relacionados a contaminação do ambiente e das próprias reações. Em vista disto, o corante intercalante passou a ser utilizado na tampa do tubo, sendo este colocado durante a pipetagem das amostras. Ao final da reação, para que o corante entrasse em contato com o volume presente, o tubo era agitado, colocando o SYBR presente na tampa em contato com a reação, evitando desta forma a contaminação.

7. CONCLUSÕES

Em suma, o estudo conseguiu estabelecer o ensaio LAMP como uma abordagem eficaz e ágil para identificar a presença de *Babesia canis*, um parasita sanguíneo que afeta caninos tanto no Brasil quanto globalmente. A padronização da técnica permitiu a otimização das condições de reação, tornando o método ainda mais confiável. Os primers utilizados, nomeadamente F3, B3, FIP e BIP, provaram ser específicos na detecção deste hemoparasita, diferenciando-o de outros agentes patogênicos sanguíneos.

Aliás, a padronização do método LAMP para detecção deste patógeno ofereceu uma alternativa rápida, precisa e de custo acessível, especialmente crucial em regiões onde recursos laboratoriais são limitados. O impacto epidemiológico esperado deste avanço é multifacetado. Primeiramente, a implementação da técnica LAMP aumenta significativamente a capacidade de diagnóstico precoce da infecção por *Babesia canis*, isso possibilita intervenções terapêuticas mais rápidas e eficazes, reduzindo a morbidade e mortalidade em cães afetados.

Além disso, ao facilitar o diagnóstico em larga escala, este método auxilia na vigilância epidemiológica da doença, permitindo a identificação de áreas endêmicas e a implementação de medidas preventivas mais direcionadas.

Outro impacto relevante é a redução do uso indiscriminado de antimicrobianos. Com um diagnóstico preciso, há menos probabilidade de tratamentos desnecessários ou inadequados, contribuindo para o combate à resistência antimicrobiana.

Ademais, a padronização do ensaio LAMP para *Babesia canis* serve de modelo para o desenvolvimento de técnicas similares para outros hemoparasitas, incluindo *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Isso tem o potencial de transformar o cenário epidemiológico de diversas doenças infecciosas, especialmente em regiões onde a infraestrutura laboratorial é um desafio.

Em suma, este estudo não apenas fornece uma ferramenta valiosa para o diagnóstico da babesiose canina, mas também estabelece um precedente para avanços futuros na epidemiologia de doenças infecciosas.

Para futuras investigações do ensaio LAMP para detecção de *Babesia canis*, sugere-se a avaliação de outras variáveis, como a sensibilidade do ensaio e a sua especificidade em relação a outros hemoparasitas, incluindo *Ehrlichia* e *Anaplasma*.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, Umar Faruk et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), an innovation in gene amplification: bridging the gap in molecular diagnostics; a review. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 8, n. 17, p. 1, 2015.
- BRANDÃO, Leonardo Pinto; HAGIWARA, Mitika Kuribayashi. Babesiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v. 7, n. 41, p. 50-59, 2002.
- CHIARI, Maria Fernanda. Nova metodologia de diagnóstico para Ehrlichia canis: PCR X LAMP. 2010.
- DANTAS-TORRES, Filipe; FIGUEREDO, Luciana Aguiar. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 197-203, 2006.
- DANTAS-TORRES, Filipe. Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2010.
- DANTAS-TORRES, Filipe. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, p. 1-17, 2008.
- DANTAS-TORRES, Filipe. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, p. 1-17, 2008.
- DE ARAÚJO, Roniuzza et al. Avaliação diagnóstica das hemoparasitoses em cães: Revisão. **Pubvet**, v. 16, n. 10, 2022.
- DE VALGAS E BASTOS, CAMILA; MOREIRA, Simone Magela; PASSOS, Lygia Maria Friche. Retrospective Study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 158-160, 2004.
- FERREIRA, RENATA F. et al. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para Anaplasma platys testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de Anaplasma phagocytophilum. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 5-8, 2008.
- FOO, Phiaw Chong et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: a comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on Entamoeba histolytica DNA derived from faecal sample. **BMC biotechnology**, v. 20, p. 1-15, 2020.
- GONÇALVES, Daniela da Silva et al. **Detecção da bactéria Wolbachia em insetos através da técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop)**. 2014. Tese de Doutorado.

HENGGEN, Paul N. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 6, p. 225-226, 1997.

HOLANDA, Lidiana Carvalho de et al. Achados hematológicos em sangue e medula óssea de cães naturalmente infectados por Ehrlichia spp. e Anaplasma spp. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. e-47686, 2019.

IQBAL, Zafar; CHAICHANASIRIWITHAYA, Wiwat; RIKIHISA, Yasuko. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.

LASTA, Camila Serina. Fatores de risco, parâmetros hematológicos, detecção molecular e sorológica de Ehrlichia canis e Anaplasma plantys em cães de porto Alegre/RS-Brasil. 2011.

MA, Cuiping et al. Accelerated isothermal nucleic acid amplification in betaine-free reaction. **Analytical biochemistry**, v. 530, p. 1-4, 2017.

MÁTHÉ, A. et al. Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 54, n. 3, p. 367-385, 2006.

MILLER, D. M. et al. The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 76, n. 3, p. 146-150, 2005.

MORI, Yasuyoshi et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 1, p. 150-154, 2001.

MÜLLER, H. et al. Development of a Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Diagnosis of Babesia canis infections. **Transboundary and emerging diseases**, v. 57, n. 1-2, p. 63-65, 2010.

MYLONAKIS, Mathios E. et al. Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 3-4, p. 390-393, 2009.

NAGAMINE, Kentaro; HASE, T.; NOTOMI, TJMCP. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular and cellular probes**, v. 16, n. 3, p. 223-229, 2002.

NIU, Qingli et al. Expression analysis and biological characterization of Babesia sp. BQ1 (Lintan)(Babesia motasi-like) rhoptry-associated protein 1 and its potential use in serodiagnosis via ELISA. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2016.

NOTOMI, Tsugunori et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000.

NZELU, Chukwunonso O.; KATO, Hirotomo; PETERS, Nathan C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for

the detection of Leishmania infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007698, 2019.

O'DWYER, L. H. O; MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. L.F. Livros de Veterinária. Rio de Janeiro, p.57-67, 2002.

OLIVEIRA, Kezia Gomes de et al. Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) em microchip de poliéster-toner. 2016.

PARIDA, Manmohan et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in medical virology**, v. 18, n. 6, p. 407-421, 2008.

PINHANELLI, Vitor et al. Evaluation and comparison of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP), PCR and nested PCR for detection of Ehrlichia canis in naturally infected dogs. In: **BMC Proceedings**. BioMed Central, 2014. p. 1-1.

RIBEIRO, Sarah Amado; DA CRUZ, Alex Silva; DA CRUZ, Aparecido Divino. LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY (LAMP): UMA REVISÃO DETALHADA SOBRE A TÉCNICA. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 48, n. 1, p. 8809-8809, 2021

SALGADO, Fabiana Pessoa. Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. 2006.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. **Veterinary parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 211-221, 2008.

SOLANO-GALLEGO, Laia; BANETH, Gad. Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra. **Veterinary parasitology**, v. 181, n. 1, p. 48-60, 2011.

TAO, Zhi-Yong et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of Plasmodium vivax infection. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 1-8, 2011.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

TAYYUB, Muhammad et al. Genetic diversity of canine Babesia species prevalent in pet dogs of Punjab, Pakistan. **Animals**, v. 9, n. 7, p. 439, 2019.

TOMITA, Norihiro et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature protocols**, v. 3, n. 5, p. 877-882, 2008.

VALENTE, Pâmela Cristina Lopes Gurgel. Avaliação dos métodos diagnósticos e dos parâmetros hematológicos nas hemoparasitoses caninas no estado de Minas Gerais. 2014.

VIEIRA, FERNANDA DE TOLEDO. Ocorrência de Ehrlichia spp., Anaplasma spp., Babesia spp., Hepatozoon spp. e Rickettsia spp. Em cães domiciliados em seis municípios do Estado do Espírito Santo, Brasil. 2017.

YAMANE, I. et al. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of Babesia gibsoni infections in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 54, n. 10, p. 1579-1584, 1993

ZAHLER, Monika et al. Characteristic genotypes discriminate between Babesia canis isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, v. 84, p. 544-548, 1998.

ZHOU, Jinlin et al. Babesia gibsoni rhoptry-associated protein 1 and its potential use as a diagnostic antigen. **Veterinary parasitology**, v. 145, n. 1-2, p. 16-20, 2007.