

DETECÇÃO MOLECULAR DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA POR AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA UTILIZANDO OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS

LUCAS PETITEMBERTE DE SOUZA¹; NYELSON DA SILVA NONATO²; LUANA FERREIRA VIANA DOS REIS²; MARIANA CAVALCANTI NASCIMENTO²; LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹ Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural – lucasouza.contato@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural – nyelsonnonato@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural – luanafvreis@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural – marianacbiotec@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural – laisdasantosg@gmail.com,

³ Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A atividade pecuária, sobretudo a criação de gado no Rio Grande do Sul e Uruguai é amplamente valorizada e atrativa, sendo as exportações de bovinos vivos, carnes e derivados no primeiro quadrimestre de 2021 serem responsáveis por US\$820 milhões, com um aumento de 35% quando comparado com o ano anterior (URUGUAY, 2021). Contudo, doenças manifestadas por micro-organismos patogênicos, como a Tristeza Parasitária Bovina (TPB), e que são transmitidas por carrapatos – *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – podem infectar o rebanho bovino, ocasionando perdas econômicas anuais em aproximadamente US\$32,8 milhões (URUGUAY, 2017). Frente a essa hemoparasitose, ressalta-se o possível impacto em comprometer a lucratividade ou ainda inviabilizar a atividade pecuária.

A TPB é tida como um complexo de doenças parasitárias causadas por distintos agentes etiológicos. Dessa forma, é uma síndrome clínica abrangendo dos patógenos: a) anaplasmosse, ocasionada pelas bactérias riquétsias *Anaplasma marginale* e *A. centrale*; e b) babesiose, cuja etiologia possui as espécies *Babesia bigemina* e *B. bovis*. Como manifestações clínicas da TPB, os animais podem apresentar: anemia, apatia, desidratação, anorexia, tremores musculares, e lactação reduzida. Atualmente há muitas formas de diagnóstico, sendo possível através de análise de histórico, interpretação de sinais clínicos, achados de necropsia e análises laboratoriais. O diagnóstico através de técnicas de biologia molecular possui alta sensibilidade e especificidade, permitindo inferir sobre as fases iniciais das doenças, bem como em animais assintomáticos, o que não é comumente alcançado com os métodos mais tradicionais. Contudo, diagnósticos moleculares podem dispor de custos elevados, com demanda por infraestrutura laboratorial e treinamento técnico especializado, inviabilizando a ação direta ao campo (SILVA et al. 2021).

Para mitigar tal problemática, existem métodos de diagnóstico molecular de patógenos visando maior facilidade e eficiência de custos. Ao seguir essa linha, a técnica de *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) visa amplificar cópias de DNA alvo presentes na amostra coletada à níveis detectáveis como a PCR, porém possuindo algumas importantes vantagens, tais como: 1) execução mais

simplificada, que não demanda de treinamento especializado para interpretação dos resultados, tendo em vista que a detecção pode ser analisada visualmente por mudanças na coloração e com tempo estimado de técnica em menos de 1h; 2) possibilidade de uma técnica mais robusta, sem necessidade de algumas etapas pré-amplificação como a extração do material genético, purificação e eluição, as quais demandam a utilização de kits comerciais caros; 3) baixo custo, pois a reação pode ser realizada sem a utilização de um equipamento termociclador – um equipamento caro e muitas vezes restrito a laboratórios mais especializados – e, dessa forma, longe da realidade do campo; 4) amplificação com menor sensibilidade à inibidores de reação, quando comparada a técnica de PCR e a maioria das suas variações (DHAMA, 2014; NOTOMI, 2000).

Moehling e colaboradores (2021) ressaltam para avante desses pontos e explanaram também sobre os reagentes utilizados estarem amplamente disponíveis em vários fornecedores. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu os critérios *ASSURED* que visam estimular o desenvolvimento de plataformas adequadas para uso em ambientes de poucos recursos e que podem ser usados como referência para inferir se os testes suprem as necessidades de controle patológico. Logo, *ASSURED* significa: acessível, sensível, específico, fácil de usar ou simples de executar, rápido e robusto, sem equipamento e com entrega para quem precisa. Ao considerar os benefícios da LAMP com os critérios da OMS, tem-se um método diagnóstico em potencial ascensão.

Levando em consideração os impactos causados pela infecção de bovinos pelos patógenos *A. marginale*, *A. centrale*, *B. bigemina* e *B. bovis*, junto da possibilidade do uso de uma técnica de biologia molecular para o diagnóstico rápido com alta sensibilidade e especificidade, e de fácil execução e interpretação, objetiva-se o desenvolvimento de um painel contendo oligonucleotídeos sintéticos LAMP para detecção molecular de patógenos em bovinos de importância agropecuária no sul do Brasil e Uruguai.

2. METODOLOGIA

Esta metodologia foi considerada um invento e foi depositada como patente de invenção no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

Primeiramente, realizou-se uma busca de anterioridade nos bancos de patente tais como, INPI, *Google Patents* (<https://patents.google.com/>), *USPTO* (<https://www.uspto.gov/>), *WIPO* (<https://www.wipo.int/portal/en/index.html>), *Espacenet* (<https://worldwide.espacenet.com/>) e Portal Capes (<http://www.periodicos.capes.gov.br>).

Para o desenvolvimento de um painel para detecção molecular de identificação da TPB por LAMP, realizou-se uma busca na literatura em bancos de dados como *NCBI*, *PubMed*, *Scopus* e *Web of Science* visando identificar alvos promissores no genoma dos patógenos de interesse (*A. centrale*, *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*) para desenho dos primers LAMP. O desenho dos primers foi feito com auxílio da ferramenta online *NEB LAMP Primer Design Tool*, e a confirmação *in silico* de anelamento dos primers à sequências alvos foi feita utilizando as ferramentas e banco de dados *Vector NTI* e *GenBank*.

A notificação de invenção e o documento da patente de invenção foram submetidas ao Escritório de Propriedade Intelectual, Transferência de Tecnologia e Empreendedorismo da UFPel, a qual posteriormente realizou a confirmação do depósito sob o número de protocolo BR1020220133379, junto ao INPI.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a elaboração, a etapa de busca nos bancos de patentes, diversas patentes foram encontradas com termos de buscas distintos utilizados (Quadro 1). Entretanto, constatou-se que os resultados encontrados se diferem da presente invenção, pois apresentam outras formas de diagnosticar os agentes, como o sorológico de anticorpos, ou um diagnóstico molecular com distinção de sangue como material biológico utilizado ou ainda a sequência genética base para projetar o conjunto *primers* ser diferente da proposta na presente invenção. Foi possível levantar um painel com 24 sequências de oligonucleotídeos sintéticos LAMP responsáveis por detectar molecularmente os patógenos da TPB. Logo, o conjunto de sequências iniciadoras para localizar a presença de patógenos, possibilitou o depósito de uma patente de invenção baseada em um protocolo de extração rápida de DNA total a partir da amostra de sangue coletada do animal, preparo do ensaio LAMP utilizando o painel de primers desenhados, e a forma de análise dos dados de amplificação, resultando no método de detecção molecular de TPB através de painel LAMP. O resultado da produção da patente BR 1020220133379 teve o intuito de proteger os métodos propostos e a possibilidade de transferência da tecnologia a empresas no ramo de biotecnologia e veterinária e até instituições internacionais, como o Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) do Uruguai, o qual é parceiro de execução do projeto de pesquisa.

Termos de Busca	Resultado da Busca					
	INPI	WIPO	USPTO	Google Patents	Espacenet	Portal Capes
Amplificação isotérmica	18	3.643	10.512	121.705	23.416	12
Tristeza parasitária	2	0	25	78.555	175	135
LAMP; bovino	1	49	9.727	120.676	24.336	106
LAMP; bovino; tristeza parasitária	0	0	0	18.739	1	0
Amplificação isotérmica; bovino	0	25	3.750	34.642	6.254	0
Amplificação isotérmica; tristeza parasitária	0	0	0	151	0	0
Diagnóstico; anaplasma	3	70	547	4.893	704	293
Diagnóstico; amplificação; anaplasma	0	0	36	94	90	0
Diagnóstico; babesia	2	63	1.187	15.419	1.952	306
Diagnóstico; amplificação; babesia	0	0	152	190	177	6
Diagnóstico; amplificação; tristeza parasitária	0	0	0	193	1	0

Quadro 1: Número de documentos encontrados na busca de anterioridade.

4. CONCLUSÕES

A patente de invenção propõe uma solução baseada em uma biotecnologia otimizada para diagnósticos rápidos e simplificados, visando a mitigação de insumos, tempo e recursos investidos em testagens da TPB. Dessa forma, aponta-se para o painel como um processo de caráter inovativo com potencial de transferência de tecnologia para agências, órgãos, entidades e empresas que realizam diagnóstico de doenças de importância agropecuária.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DHAMA, K.; KARTIHK, K.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; KAPOOR, S.; KUMAR, A.; THOMAS, P. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 17, n. 2, p. 151-66, 2014.
- KOSACK, C. S.; PAGE, A.L.; KLATSER P.R. A guide to aid the selection of diagnostic tests. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 95, n. 9, p. 639-45, 2017.
- NOTOMI, T.; OKAYAMA H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. e63, 2000.
- MOEHLING, T. J.; CHOI, G.; DUGAN, L.C.; SALIT, M.; MEAGHER R. LAMP Diagnostics at the Point-of-Care: Emerging Trends and Perspectives for the Developer Community. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 21, n. 1, p. 43-61, 2021.
- SILVA, T.H.; ALVES-SOBRINHO, A.V.; LIMA L.F.S.; ZIEMNICZAK, H.M.; FERRAZ, H.T.; LOPES, D.T.; SILVA, V.L.D.; BRAGA, I.A.; SATURNINO, K.C.; RAMOS, D.G.S. Bovine parasite sadness: Review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e15410111631, 2021.
- URUGUAY. **Dados e estatísticas**. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay, 19 mai. 2021. Dados. Acessado em 15 ago. 2021. Online. Disponível em: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/exportaciones-agroindustriales-del-1er-cuatrimestre>
- URUGUAY. **¿Por qué es importante controlar la garrapata?**. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay, 20 mar. 2017. Publicações. Acessado em 15 ago. 2021. Online. Disponível em: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/es-importante-controlar-garrapata>