

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA BABESIOSE CANINA EM MONTES CLAROS PELA TÉCNICA DE PCR

**Autores:** JULIA RODRIGUES ORTEGA, ELOAN MENDES VIEIRA, ELYTANIA VEIGA MENEZES, VANESSA DE ANDRADE ROYO, AFRANIO FARIAS DE MELO JUNIOR, DARIO ALVES DE OLIVEIRA

### Introdução

A Babesiose Canina é uma hemoparasitose com ampla distribuição geográfica, residindo no Brasil nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro [UNGAR DE SÁ et al.,2007]. É causada por parasitas intraeritrocitários do gênero *Babesia*, *B. canis* e *B. gibsoni*, que apresentam diferentes características e formas de atuação no decorrer da infecção. Entretanto, ambos podem levar a quadros de anemia hemolítica severa, febre, letargia e até a morte, sem haver distinção de sexo entre os cachorros infectados [DUARTE et al.,2008]. No Brasil, a Babesiose é transmitida pelos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis leachi*. [UNGAR DE SÁ et al.,2007].

O diagnóstico utilizado com maior frequência ultimamente no país é o esfregaço sanguíneo da amostra do cão com suspeita da hemoparasitose. Todavia, é um método que apresenta pouca sensibilidade as diferentes concentrações de parasitas circulantes no sangue. E devido ao grau de agressividade da doença, é necessária a introdução de novas técnicas no mercado que visem um diagnóstico mais objetivo e eficiente, que propiciem a cura do cão infectado [GUIMARÃES et al., 2004].

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma metodologia utilizada pela Biologia Molecular, cujo princípio é a amplificação exponencial de um fragmento do material genético selecionado. É utilizada como método de diagnóstico para outras doenças e sua aplicação pode propiciar a visualização da presença ou ausência do fragmento do material genético do patógeno da amostra suspeita. Permitindo maior exatidão e confiabilidade como exame diagnóstico [NUNES et al.,2007].

### Objetivo

O presente trabalho visa padronizar a metodologia de PCR para diagnóstico de *Babesia canis* de cães com suspeita de hemoparasitose.

### Materiais e Métodos

Os procedimentos apresentados a seguir com exceção da coleta, foram realizados no Laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos da Universidade Estadual de Montes Claros.

#### A. Coleta

Foram coletadas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em Montes Claros, 80 amostras com volume de 3 ml retiradas por via braquial dos cachorros que chegavam ao centro, sem distinção de idade e sexo. As amostras foram conservadas em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA, para evitar a coagulação do sangue e preservar a morfologia das células. O volume destas foi dividido e parte dele foi enviado para uma clínica particular para diagnóstico através do esfregaço sanguíneo e a outra parte foi utilizada para diagnóstico através da técnica de PCR.

#### B. Extração do DNA

A extração foi realizada em todos *Eppendorf* de 1,5ml seguindo o Protocolo de Extração de Amostras de Sangue Congeladas [OLIVEIRA et al.,2007] pelo método Fenol-Clorofórmio com modificações na concentração de alguns reagentes químicos. Após a extração o DNA foi conservado a -20°C.

#### C. Reação em Cadeia da Polimerase.

A PCR foi realizada utilizando o termociclador TC-Plus Techne Analítica. O DNA foi amplificado em 40 ciclos com temperaturas de 94°C, 50°C e 72°C.

Os primers utilizados na amplificação do material genético de *Babesia canis* foram BAB-F com sequência (5' a 3') AAG TAC AAG CTT TTT ACG GTG e BABESIA COMMON de sequência (5' a 3') CCT GTA TTG TTA TTT CTT GTC ACT ACC TC, em concentração de 5pM. O mix dos reagentes continha MgCl<sub>2</sub> a 25mM, tampão com MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM, a enzima Taq-DNA polimerase, DNTP'S a 1,25mM, H<sub>2</sub>O, DNA extraído no laboratório totalizando uma solução com 25 µL.

#### *D. Eletroforese.*

A eletroforese do produto de PCR foi realizada em agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio por 50 min, para visualização e registro da imagem foi utilizado o Foto documentador GelLogic (Nova Analítica).

#### *E. Esfregaço Sanguíneo*

As oitenta amostras foram enviadas para um laboratório particular na Cidade de Montes Claros a fim de que fossem identificados os parasitas intacelulares.

### **Resultados e Discussão**

Do total de oitenta amostras coletadas, trinta e sete destas foram PCR positivas para *Babesia canis* (Fig.1). Ao passo que as mesmas também foram submetidas ao diagnóstico em esfregaço sanguíneo para visualização intraeritrocitária do parasita por uma clínica particular. Contudo, em nenhuma amostra coletada foi possível evidenciar a presença de hemoparasitas intracelulares. Demonstrando assim, a maior sensibilidade da técnica de PCR para o diagnóstico.

No Brasil, poucos estudos foram realizados e pouco se sabe sobre os aspectos epidemiológicos da Babesiose (PASSOS et al., 2005). O'Dwyer et al. (2001) observou 5,2% de cães infectados por exame de esfregaço numa área rural. No presente estudo, nenhum dos cães foi diagnosticado por exame microscópico, porém dessas mesmas amostras, 46,25 % foram positivas utilizando a PCR. Como até o momento nenhum outro estudo foi feito com cães da cidade de Montes Claros, nossos resultados são comparados.

### **Conclusão**

A realização do presente trabalho permitiu a padronização de uma metodologia mais eficiente, sensível e rápida com poucas concentrações de parasitas. Facilitando assim o tratamento precoce dos cães infectados. Além de poder auxiliar no desenvolvimento de estudos que envolvam a epidemiologia da babesiose canina na cidade de Montes Claros.

### **Agradecimentos**

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de Iniciação Científica para realização deste trabalho.

### **Referências Bibliográficas**

- DUARTE, Sabrina Castilho et al. Diagnóstico parasitológico e molecular da Babesiose canina na cidade de Goiânia-GO. 2008.
- GUIMARÃES, J. C. et al. 089-ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS DA BABESIOSE CANINA NA CIDADE DE CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ. 2004.
- NUNES, Caris Maroni et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, p. 5-9, 2007.
- O'DWYER, L. H.; Massard, C. L.; SOUZA, J. C. P. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.
- OLIVEIRA, M. C. S.; [et al.] . **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de Reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.
- PASSOS, L. M. F. et al. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.
- UNGAR DE SÁ, M. F. M. et al. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. 2007.