



## **PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM MORANGOS (*Fragaria vesca*)**

Bruna Tiaki Tiyo (PIBIC/CNPq/UEM), Carla Zangari Souza (Mestre), Ana Lúcia Falavigna Guilherme (Orientador), e-mail: bruna.tiaki@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá/Centro Ciências da Saúde/Maringá, PR.  
Área: Parasitologia. Subárea: Protozoologia de interesse humano.

**Palavras-chave:** Hortifruticulturas, Diagnóstico laboratorial, Toxoplasmose

### **Resumo:**

O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de extração de DNA de oocistos de *T. gondii* em morangos (*Fragaria vesca*). Foram utilizados oocistos esporulados, cepa ME-49, diluídos nas concentrações  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  e  $10^1$ . Para cada concentração foram utilizadas amostras de 50g de morangos, em triplicata. A solução resultante da lavagem foi filtrada a vácuo com auxílio de kit de filtração (membrana de acetato de celulose,  $1,2\mu\text{m}$  de porosidade/47mm de diâmetro e bomba a vácuo). Após, submetidas à técnica de rompimento de membrana: congelamento-descongelamento ou ultrassom, e extraídas pelos kits Purelink Genomic DNA e AxyPrep™ Blood Genomic DNA. Fez-se também a extração direta das amostras, sem processo de rompimento. Para amplificação do DNA foi utilizado o primer B1(B22/B23), 115pb, com iniciadores oligonucleotídeos 694-715, 5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3' e 887-868, 5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3', reveladas em gel de poliacrilamida 4,5% e coloração com nitrato de prata. Os procedimentos físicos, congelamento-descongelamento ou ultrassom, mostraram igualmente recuperar DNA de oocisto de *T. gondii*, desde que utilizado o kit de extração AxyPrep™ Blood Genomic DNA. Este resultado foi observado em todas as concentrações de oocistos testadas. Considerando a impossibilidade do diagnóstico de amostras ambientais por exames rotineiros de laboratório, estes resultados apontam a possibilidade de realizar o controle desta zoonose em amostras de hortifruticulturas, como em ações voltadas à vigilância sanitária.

### **Introdução**

O morango (*Fragaria vesca*), com sabor atrativo e de alta produtividade, está entre os frutos de maior consumo *in natura*, nos principais centros urbanos do Brasil. A produção de morangos no país tem crescido nos últimos anos, com estimativa anual de 105.000 toneladas, com área aproximada de 3.500 ha. Entretanto, o volume de exportação desta rosácea é extremamente baixo e cada vez mais o Brasil enfrenta pressões por parte do mercado externo, em relação à qualidade e segurança dos



produtos agrícolas. Dentre as propriedades medicinais do morango destacam-se a ação antioxidante, diurética e anti-inflamatória.

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório, com elevada dispersão no meio ambiente. Acomete um terço da população mundial, sendo adquirida de diferentes maneiras e com infecções normalmente assintomáticas. A transmissão pode se dar pela ingestão de oocistos presentes em água, frutas e verduras (estruturas eliminadas nas fezes de felídeos, hospedeiros definitivos), pela ingestão de cistos presentes em produtos de origem animal, tais como, carnes, vísceras e subprodutos de suínos, ovinos, bovinos, aves, entre outros, e por taquizoítas via transmissão congênita.

Os oocistos são eliminados não esporulados no meio ambiente, e entre um a cinco dias, dependendo das condições de temperatura e umidade, ocorre à esporulação (Dubey et al., 2010). Experimentalmente, a maioria dos gatos sofre soroconversão durante a segunda e terceira semana após infecção pela via oral de cistos teciduais e geralmente após terem eliminado oocistos (Dubey et al., 2010). Portanto, quando os gatos são soropositivos, normalmente já eliminaram milhões de oocistos pelas fezes, contaminando o meio ambiente (Dubey et al., 2010).

Os oocistos são muito resistentes às adversidades do meio ambiente (Dubey et al., 2010), mas não sobrevivem às temperaturas acima de 60°C. Todavia, são resistentes a alguns desinfetantes normalmente empregados (Dubey et al., 2010). O diagnóstico laboratorial em frutas, hortaliças e ambientes aquáticos tem sido um grande desafio, com escassos trabalhos na literatura (Dubey et al., 2010). Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de extração de DNA de oocistos de *T. gondii* em morangos (*Fragaria vesca*).

### **Materiais e métodos**

Foram utilizados oocistos esporulados, cepa ME-49, diluídos em triplicata e nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  e  $10^1$ . Amostras de 50g de morangos, em triplicata, para cada concentração de oocistos testada, foram previamente lavados com 250 mL de água destilada, sob agitação manual por 1 minuto, em sacos plásticos estéreis. A seguir, removido o excesso de água dos morangos (Viol, 2013). Cada amostra foi colocada em becker de vidro, estéril, seguida pela contaminação por gotejamento (100mL de água destilada contendo as diferentes concentrações), para simular o processo de irrigação. Foi gotejada uma gota/segundo em temperatura ambiente (25°C), com auxílio de uma pipeta Pasteur (Viol, 2013). A seguir, cada amostra foi transferida para um saco plástico sem uso, e lavada com 100mL de solução Tween 80 (1%) por agitação manual durante 1 minuto. A solução resultante da lavagem foi filtrada à vácuo com auxílio de um kit de filtração contendo membrana de acetato de celulose, 1,2  $\mu$ m de porosidade e 47 mm de



diâmetro e bomba a vácuo (Nishi et al, 2009). As membranas foram raspadas com solução Tween 80 a 0,1% e hastes específicas por 20 minutos. As soluções foram concentradas por centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos. A suspensão final foi concentrada em 1mL (tubo Eppendorf 1,5ml) e armazenada a 4°C. A água filtrada também foi analisada para garantir que não houve passagem de oocistos pela membrana. A seguir, foram testados alguns processos para rompimento dos oocistos: técnica de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C)/5 minutos e descongelamento em banho seco (65°C)/5 minutos, repetido por 5 vezes. As amostras também passaram por um Sonicador Ultrassônico, com frequência de 20 kHz/45 segundos, repousando por dois minutos, repetido cinco vezes. Em seguida, as amostras foram extraídas pelos kits Purelink Genomic DNA e AxyPrep™ Blood Genomic DNA, e os resultados foram comparados quanto a melhor recuperação. Também foi realizada a extração direta das amostras, sem o processo de rompimento. Na PCR foi utilizado o primer B1 (B22/B23), com iniciadores oligonucleotídeos 694–715, 5-GGAACTGCATCCGTTTCATGAG-3 e 887–868, 5- TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3, que amplificam os fragmentos do gene B1 (115pb) (Burg et al, 1989). A revelação foi em gel de poliacrilamida 4,5%, e a coloração, com solução de nitrato de prata.

## Resultados e Discussão

Com os processos adotados foi possível detectar a presença de oocistos de *T. gondii* em todas as concentrações testadas. Cabe destacar que, no meio ambiente, a dispersão geralmente proporciona baixas concentrações de formas evolutivas, sendo grande desafio para seu diagnóstico (Lass et al., 2012). A utilização da técnica de filtração a vácuo para concentrar as formas parasitárias mostrou ser procedimento importante, seguido por processos físicos, congelamento-descongelamento ou ultrassom. Também, de acordo com os resultados, para o diagnóstico laboratorial de oocistos de *T. gondii* em todas as concentrações testadas, é necessário para a extração do DNA a utilização do kit comercial AxyPrep™ BloodGenomic DNA (Tabela 1). Baixas concentrações simulam o que normalmente ocorre no meio ambiente, em amostras de água, solo e vegetais (Lass et al, 2012).

A utilização da técnica de filtração e de processos físicos acima mencionados, com a utilização do kit AxyPrep™ BloodGenomic DNA, é possível realizar o diagnóstico de amostras de morango, inclusive quando em baixas concentrações de estruturas parasitárias\amostra. Por ser uma técnica de custo relativo, prática e de fácil manuseio, pode ser introduzida em serviços voltados a ações de vigilância sanitária, contribuindo no controle desta zoonose em amostras de hortifruticulturas.

**Tabela 1** - Resultado da PCR com marcador molecular B1 a partir da contaminação por gotejamento em amostras de morango, seguido da



extração de DNA com os kits AxyPrep™BloodGenomic DNA e Purelink Genomic DNA, diretamente ou após os processos físicos.

Concentração (ocistos de <i>T.gondii</i> /100ml)	Congelamento-Descongelamento		Ultrassom		Extração Direta (sem processos físicos)	
	AxyPrep™ BloodGenomic DNA	Purelink Genomic DNA	AxyPrep™ BloodGenomic DNA	Purelink Genomic DNA	AxyPrep™ BloodGenomic DNA	Purelink Genomic DNA
10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+	+
10 <sup>3</sup>	+	+	+	+	+	-
10 <sup>2</sup>	+	+	+	+	-	-
10 <sup>1</sup>	+	-	+	-	-	-

### Conclusões

Pela escassez de dados na literatura, nossos resultados apontam alternativa em subsidiar medidas de vigilância sanitária e epidemiológica, em todos os elos da cadeia de produção e de distribuição de hortifruticulturas.

### Agradecimentos

Agradeço à UEM, pela infraestrutura disponibilizada para a pesquisa, à equipe técnica do Lab. Parasitologia\DBS\UEM. Ao CNPq, pelo investimento e por acreditar na importância da pesquisa científica.

### Referências

Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., Boothroyd, J.C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.1787-1792, 1989.

Dubey JP. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2<sup>a</sup> Ed. Taylor & Francis Group, Beltsville, U.S.A., p.305, 2010.

Lass A., Pietkiewicz H., Szostakowska B., Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.31, p.1101-08, 2012.

Nishi L, Baesso ML, Santana RG, Fregadolli P, Falavigna DL, Falavigna-Guilherme AL. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. **Zoonoses Public Health**, v.56, p.221-8, 2009.

Viol B. **Contaminação experimental de morangos (*Fragaria vesca*) por *Giardia duodenalis***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, p.52, 2013.