

INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE OBTENÇÃO DE CISTOS DE *Giardia duodenalis* NA QUALIDADE DO DNA A SER AMPLIFICADO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Juliana Miki Nakanishi (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Liara Izabela Lopes Romera (Mestranda/PCS-Uem), Renata Coltro Bezagio (Doutoranda/PCS-Uem), Caroline Rodrigues de Almeida (Doutoranda/PCS-Uem), Cristiane Maria Colli (Docente/DBS-Uem), Mônica Lúcia Gomes (Orientadora), e-mail: monicaluciagomes@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

Ciências Biológicas / Parasitologia / Protozoologia Parasitária Humana

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*, Diagnóstico, Biologia Molecular

Resumo:

O diagnóstico laboratorial do protozoário *Giardia duodenalis* é realizado por meio de técnicas de concentração de cistos, como o método de Ritchie. Técnicas mais sensíveis como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) podem melhorar o diagnóstico, principalmente em amostras com baixa carga parasitária. Todavia, os reagentes utilizados nos métodos parasitológicos podem interferir no DNA e no processo de análise molecular. Assim, o objetivo desse estudo foi verificar a influência do método de obtenção de cistos de *G. duodenalis* na qualidade do DNA a ser amplificado pela PCR. Uma amostra positiva para *G. duodenalis* foi processada (duplicata) pelo método de Ritchie convencional e modificado (substituindo o formol pela água destilada). O sedimento resultante foi utilizado para contagem (triplicata) do número de cistos/ μL e para a extração do DNA. Este foi quantificado (triplicata) por espectrofotometria e amplificado em reação de semi-nested PCR com alvo no gene da Glutamato Desidrogenase (GDH). Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese. Na quantificação microscópica, o método convencional resultou em aproximadamente 112 cistos/ μL e o método modificado em 125 cistos/ μL , não havendo muita variação entre as técnicas. No entanto, o método modificado proporcionou quase três vezes mais quantidade de DNA (5,9 ng/ μL) em relação ao método convencional (2,3 ng/ μL). Somente as amostras processadas pelo método modificado amplificaram o gene de GDH. Conclui-se que o método modificado é melhor por recuperar mais cistos com melhor rendimento e recuperação de DNA, indicando que o formol pode interferir no processo extração/amplificação do DNA.

Introdução

Giardia duodenalis, agente etiológico da giardíase, é o protozoário mais comumente encontrado no intestino delgado do homem. Este parasito possui duas formas evolutivas: o cisto que é infectante e altamente resistente aos fatores ambientais e o trofozoíto que coloniza o epitélio intestinal causando a doença. A transmissão da *Giardia* ocorre pela ingestão acidental de cistos em água e alimentos contaminados. Prevalente em todo mundo, a giardíase pode variar da forma assintomática à diarreias crônicas com má absorção intestinal e influenciar no crescimento e desenvolvimento intelectual de crianças (Cotton *et al.*, 2011).

O diagnóstico laboratorial desse protozoário é realizado pela detecção de cistos nas fezes obtidos por métodos de concentração que auxiliam na remoção de detritos fecais e facilitam a identificação dos cistos. Dentre os métodos coproparasitológicos de concentração têm-se, principalmente, os de sedimentação por centrifugação como o método de Ritchie (Ritchie, 1948).

Outros métodos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), também são úteis na detecção do parasito, especialmente em amostras com baixa carga parasitária. Ainda permitem identificar diferenças genéticas entre as *assemblages* morfológicamente idênticas da espécie *G. duodenalis* (Colli *et al.*, 2015). Recentes estudos relataram que os métodos moleculares permitem uma maior precisão na obtenção de dados de prevalência quando comparados aos métodos convencionais de diagnóstico (Mejia *et al.*, 2013; Colli *et al.*, 2015).

Ainda não se tem clareza se os reagentes utilizados nos métodos convencionais de obtenção de cistos interferem na qualidade do DNA e do produto amplificado pela PCR. Por exemplo, o método de Ritchie utiliza reagentes como o éter etílico e o formol, mas devido a dificuldades para amplificação do DNA estudos recentes descreveram modificações nesta metodologia (Colli *et al.*, 2015). O objetivo desse estudo foi comparar o método de Ritchie convencional e modificado afim se obter um DNA de *G. duodenalis* de boa qualidade para a amplificação *in vitro* do gene da Glutamato Desidrogenase (GDH).

Materiais e métodos

1. *Concentração dos cistos de Giardia duodenalis e Aspectos Éticos.* Os cistos de *G. duodenalis* que foram utilizados neste estudo foram isolados de amostras fecais humanas com consentimento livre e esclarecido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP/UEM-439/2009). As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia Ambiental e de Alimentos (LPAA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e encontravam-se preservadas a - 20°C.

2. *Métodos Parasitológicos e Análise Microscópica.* Os cistos provenientes da mesma amostra fecal humana e contendo o mesmo número de cistos por

grama de fezes, foram processados pelo método de Ritchie convencional e modificado, neste caso substituindo o formol pela água destilada (Colli *et al.*, 2015). A partir de cada método foram retirados 130 μ l, sendo 30 μ l utilizados para a contagem do número de cistos/ μ l em Câmara de Neubauer, em triplicata, e 100 μ l para a extração do DNA.

3. *Extração e quantificação do DNA.* O DNA foi extraído utilizando o Kit comercial *PureLink PCR Purification*[®], conforme as recomendações do fabricante e quantificado, em triplicata, por espectrofotometria no *Termo Scientific Nano Drop 200*.

4. *Amplificação do gene GDH.* O fragmento de aproximadamente 432pb do gene de GDH foi amplificado em reação de semi-nested PCR. Foram utilizados os iniciadores GDHeF e GDHiR na primeira reação e GDHiF e GDHiR na segunda reação de acordo com as modificações realizadas por Colli e colaboradores (2015). As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos: 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, 72°C por 5 minutos.

5. *Detecção dos produtos amplificados.* Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados pela eletroforese em gel de poliacrilamida a 4,5% revelados com sais de prata, fotografados e documentados digitalmente.

Resultados e Discussão

A média da contagem em número de cistos pela microscopia foi de aproximadamente 112 cistos/ μ L para o método de Ritchie convencional e 125 cistos/ μ L para o método modificado havendo uma pequena variação na recuperação de cistos entre os dois métodos avaliados. O resultado da média da quantidade de DNA recuperado foi de 2,3 ng/ μ L e 5,9 ng/ μ L para o Ritchie convencional e modificado respectivamente. A quantidade de DNA recuperada pelo método modificado foi 2,5 vezes maior em relação ao método convencional. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que o formol na concentração de 10% pode degradar total ou parcialmente o DNA. Um fragmento de aproximadamente 432 pb foi observado pela eletroforese somente para as amostras processadas pelo método modificado. As amostras processadas pelo método convencional foram todas negativas, indicando uma falha no processo de amplificação do gene alvo. Um estudo realizado por Srinivasan e colaboradores (2002), mostrou que o formol pode interagir de quatro formas distintas com a molécula de DNA, podendo causar sua fragmentação e inibir o processo de amplificação *in vitro* do DNA.

Conclusões

O método de Ritchie modificado proporcionou maior quantidade de cistos recuperados e maior quantidade de DNA extraído. Além disso, foi o único método capaz de recuperar cistos para extração do DNA que pudesse ser

amplificado pela PCR tendo como molécula alvo o gene GDH. Conclui-se também que o formol interfere na amplificação do DNA, sendo o método modificado recomendado quando abordagens moleculares estão envolvidas.

Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq - FA – UEM

Referências

COLLI, C.M.; BEZAGIO, R.C.; NISHI, L.; BIGNOTTO, T.S.; FERREIRA, É.C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L.; GOMES, M.L. Identical Assemblage of *Giardia duodenalis* in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern Brazil Indicates a Relationship among Them. **Plos One**, v. 10, n. 3, e0118065, 2015.

COTTON, J.A.; BEATTY, J.K.; BURET, A.G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 925-933, 2011.

MEJIA, R.; VICUÑA, Y.; BRONCANO, N.; SANDOVAL, C.; VACA, M.; CHICO, M.; COOPER, P.J.; NUTMAN, T.B. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities store source limited at-risk populations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 1041-1047, 2013.

RITHCIE, L.S. **An ether sedimentation technique for routine stool examination**. Bulletin of the United States Army Medical Department, v.8, p.326, 1948.

SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D.; JEWELL, S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 1961-71, 2002.