



Comparação de diferentes métodos de extrac o de DNA em amostras de *Echinococcus granulosus*

Roque, C.¹, Beato, S.^{1,2}, Parreira, R.² & Gr cio, Maria A. A.²

¹Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Pol t cnico de Castelo Branco

²Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa



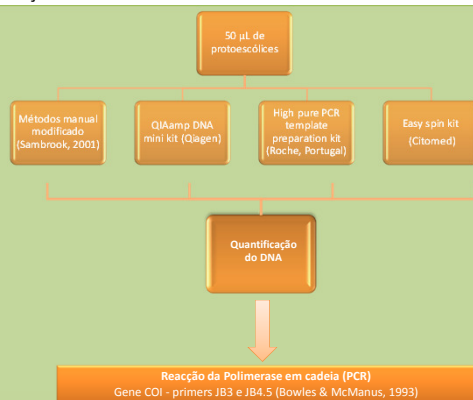
INTRODU O:

O *Echinococcus granulosus*   considerado a mais pequena t nia de interesse médico, sendo o agente causal de hidatidose. Actualmente a OMS reconhece a existência de variantes intra-específicas dentro desta espécie, tendo cada variante o nome de estirpe. Estão descritas 10 estirpes diferentes deste parasita (G1 – G10) (Varcasia *et al.*, 2008 e Vural *et al.*, 2008), apresentando entre si diferenças a nível morfológico, bioquímico, biológico, epidemiológico e genético (Eckert & Thompson, 1997). Para diferenciar estas estirpes tornou-se necessário desenvolver novos métodos. O conhecimento dos diversos genes do parasita implica o uso de técnicas de Biologia molecular e para tal torna-se necessário conhecer quais os melhores métodos para extrac o e amplifica o de DNA.

No presente trabalho pretendeu-se testar quatro diferentes formas de extrac o de DNA de *E. granulosus* recorrendo a três diferentes kits comerciais e ao método fenol-clorofórmio (Sambrook, 2001) modificado pela equipa. Foi ainda quantificado o DNA, avaliando os parâmetros concentra o, quantidade de sais e pureza do DNA e, posteriormente, foi feita a amplifica o do gene *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* (Bowles & McManus, 1993).

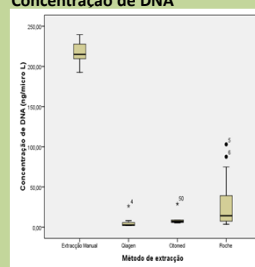
METODOLOGIA:

As vísceras parasitadas foram obtidas em matadouros da região centro de Portugal, sendo as protoscolecidas obtidas nas condi es de assepsia. Foram utilizadas 20 amostras para proceder   extrac o de DNA com os diversos métodos em estudo.

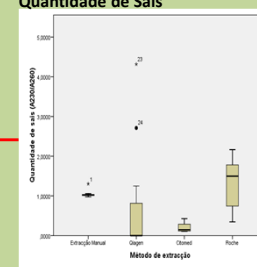


RESULTADOS:

Concentra o de DNA



Quantidade de Sais



	Quantifica�o do DNA*	Quantidade de sais*	Grau pureza*
Kit Roche	30,6 ± 29,9	1,4 ± 0,6	1,9 ± 0,2
Kit Qiagen	5,4 ± 4,8	2,1 ± 1,9	1,9 ± 0,3
Kit Citomed	11,2 ± 10	0,22 ± 0,14	0,7 ± 0,2
Método fenol-clorofórmio	218 ± 12,2	1,3 ± 0,07	1,2 ± 0,04

* (média ± desvio padrão)

DISCUSSÃO:

O método mais eficaz na extrac o de DNA deste parasita   o método de extrac o manual fenol-clorofórmio (modificado), com uma concentra o média de DNA obtido de 218,04ng/ l, por outro lado aquele que se revela menos eficaz na extrac o de DNA   o "QIAamp DNA mini kit" com uma concentra o média de 4,78 ng/ l.

Em rela o   quantidade de sais, segundo o manual do equipamento esta deverá registrar uma razão superior a 2, segundo isto apenas o "QIAamp DNA mini kit" apresenta uma média superior a esse valor, tendo todos os outros kits registado um valor médio abaixo deste, isto indica-nos que as amostras se encontram contaminadas com sais.

Outro parâmetro importante a ter em conta   o grau de pureza das amostras, segundo bibliografia consultada este terá que registrar uma razão média entre 1,67 e 1,91 (Hansen *et al.*, 2007), assim sendo apenas o "QIAamp DNA mini kit" e o "High pure PCR template preparation kit" registam um valor médio que se situa dentro deste intervalo de aceitabilidade, permitindo-nos assim suspeitar da presença de impurezas (proteínas) nas amostras extraídas com o método de extrac o manual e com o kit "Easy spin kit".

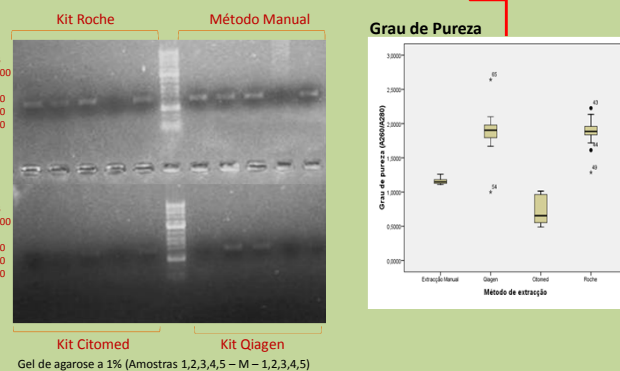
Após a PCR verificou-se a amplifica o de forma mais ou menos igual em todos os métodos usados para a extrac o.

CONCLUSÃO:

Podemos concluir que o método de extrac o que apresenta maior eficácia   o método manual fenol-clorofórmio (modificado), tendo no entanto a desvantagem de ser muito moroso. Assim, o ideal seria ter um método de extrac o que conseguisse associar os três factores (concentra o, grau de pureza e concentra o de sais) de forma viável. Nos kits testados aquele que poderá ter um melhor rendimento, para o caso do *E. granulosus*,   o "High pure PCR template preparation kit".

BIBLIOGRAFIA:

BOWLES, J. & MCMANUS, D.P. 1993. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol*, 57(2): 231-239. ECKERT, J. & THOMPSON, R.C. 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop*, 64(1-2): 19-3. Hansen HM, Wiemels JL, Wrensch M, Wiencke JK. DNA quantification of whole genome amplified samples for genotyping on a multiplexed bead array platform. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 2007. p. 1686-90. Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. VARCASIA, A., GARIPPA, G., PIPIA, A.P., SCALA, A., BRIANTI, E., GIANNETTO, S., BATELLI, G., POGLAYEN, G. & MICAGNI, G. 2008. Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitol Res*, 102(4): 815-818. VURAL, G., BACA, A.U., GAUCI, C.G., BAGCI, O., GICIK, Y. & LIGHTOWLERS, M.W. 2008. Variability in the *Echinococcus granulosus* Cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol*, 154(3-4): 347-350.



Kit Citomed Kit Qiagen
Gel de agarose a 1% (Amostras 1,2,3,4,5 – M – 1,2,3,4,5)

Grau de Pureza

