

# Comparação de diferentes métodos de extracção de DNA em amostras de *Echinococcus granulosus*

Roque, C.<sup>1</sup>, Beato, S.<sup>1,2</sup>, Parreira, R.<sup>2</sup> & Grácio, Maria A. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco

<sup>2</sup>Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa



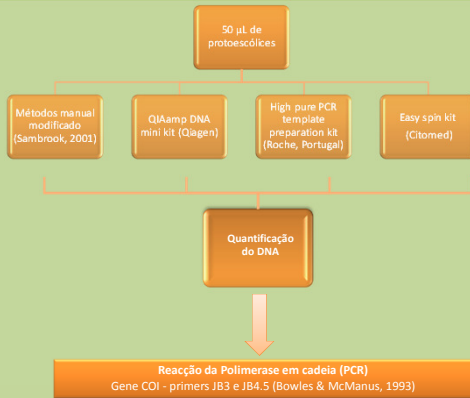
## INTRODUÇÃO:

O *Echinococcus granulosus* é considerado a mais pequena ténia 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 extracção e amplificação de DNA.

No presente trabalho pretendeu-se testar quatro diferentes formas de extracção 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 concentração, quantidade de sais e pureza do DNA e, posteriormente, foi feita a amplificação do gene *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* (Bowles & McManus, 1993).

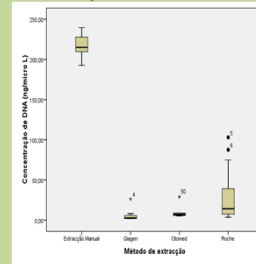
## METODOLOGIA:

As vísceras parasitadas foram obtidas em matadouros da região centro de Portugal, sendo as protoscólices obtidas nas condições de assepsia. Foram utilizadas 20 amostras para proceder à extracção de DNA com os diversos métodos em estudo.

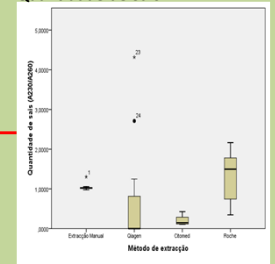


## RESULTADOS:

### Concentração de DNA



### Quantidade de Sais



	Quantificação 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 Citimed	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)

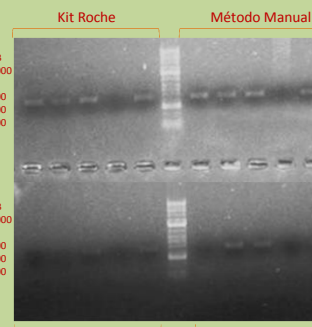
## DISCUSSÃO:

O método mais eficaz na extracção de DNA deste parasita é o método de extracção manual fenol-clorofórmio (modificado), com uma concentração média de DNA obtido de 218,04ng/µl, por outro lado aquele que se revela menos eficaz na extracção de DNA é o “QIAamp DNA mini kit” com uma concentração média de 4,78 ng/µl.

Em relação à quantidade de sais, segundo o manual do equipamento esta deverá registar 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.

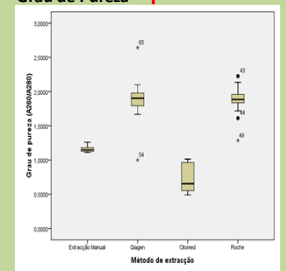
Outro parâmetro importante a ter em conta é o grau de pureza das amostras, segundo bibliografia consultada este terá que registar uma razão média entre 1,67 e 1,91 (Hansen *et al.*, 2007), assim sendo apenas o “QIAamp DNA mini kit” e o “High pure PCR template preparation kit” registam um valor médio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

Após a PCR verificou-se a amplificação de forma mais ou menos igual em todos os métodos usados para a extracção.



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

### Grau de Pureza



## CONCLUSÃO:

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