

# PCR-RFLP e genotipagem de *Echinococcus granulosus*

Sílvia Beato<sup>1,2</sup>, Maria Manuela Calado<sup>1</sup>, Isabel Clemente<sup>1</sup> & Maria Amélia Afonso Grácio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas (UHMM)/ Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM), Universidade Nova de Lisboa (UNL) - Rua da Junqueira 96, 1349-008 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco

## INTRODUÇÃO

A hidatidose, causada pelo helminta *Echinococcus granulosus*, é uma zoonose presente, de um modo geral, em todo o globo terrestre (Jenkins *et al.*, 2005), tendo na região mediterrânica elevada importância em saúde pública (Varcasia *et al.*, 2007). Tem sido reconhecido, na espécie *E. granulosus*, um elevado grau de divergência genética, estando descritos dez genótipos (G1 a G10), associados a diferentes hospedeiros intermediários (Villalobos *et al.*, 2007). Alguns destes genótipos já obtiveram o estatuto de nova espécie dentro do género *Echinococcus* (Thompson, 2008). A genotipagem da espécie *E. granulosus* é baseada em diversas técnicas de biologia molecular, tais como RAPD, PCR, SSCP, AFLP, microssatélites e sequenciação, sendo umas mais específicas e sensíveis que outras (Manterola *et al.*, 2008). Este trabalho tem como principal objectivo avaliar a especificidade da técnica PCR-RFLP na genotipagem de amostras de *E. granulosus* provenientes de Portugal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidos 30 quistos hidáticos, de localização pulmonar e hepática, de ovinos e bovinos parasitados com *E. granulosus* e procedeu-se à extração da areia hidática contida nos quistos. Foi extraído o DNA do parasita a partir da areia hidática e amplificada a região ITS-1 com três pares de "primers" diferentes (Eg16-PCR, Eg9-PCR e ITS-1-PCR). A estes produtos de amplificação foram aplicadas endonucleases de restrição (*Alu I*, *Cfo I*, *Msp I* e *Rsa I*) e foram visualizados em electroforese em gel de agarose a 2,5%. Foi ainda amplificado o gene *citocromo oxidase sub-unidade I* (COI) e sequenciado. As sequências obtidas foram comparadas com algumas existentes no GenBank.

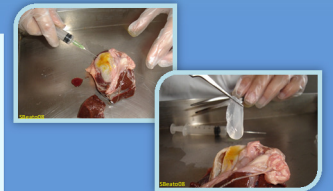


Figura 1 - Abertura de um quisto hidático em fígado de ovino e extração do líquido hidático

## RESULTADOS

A amplificação para as três diferentes PCR revelou bandas diferentes em tamanho e em número. Após a aplicação das enzimas de restrição foram obtidos diferentes padrões de corte para a mesma enzima.

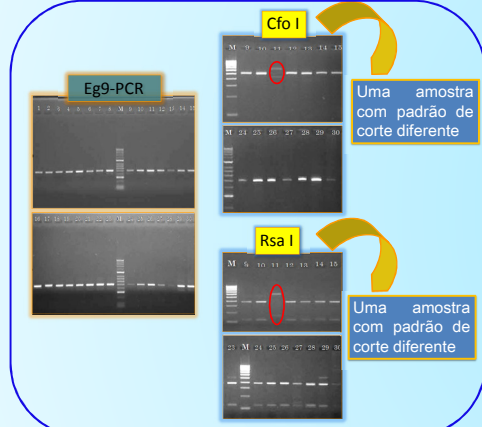


Figura 2 - Eg9-PCR com aplicação das enzimas *Cfo I* e *Rsa I*

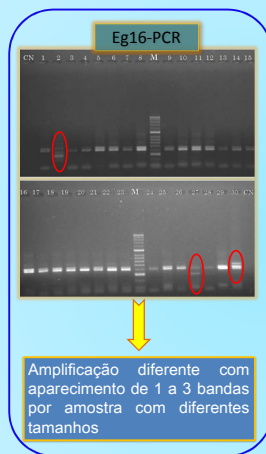


Figura 3 - Eg16-PCR

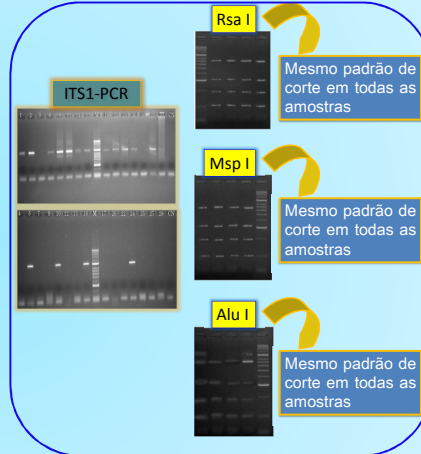


Figura 4 - ITS1-PCR com aplicação das enzimas *Rsa I*, *Msp I* e *Alu I*

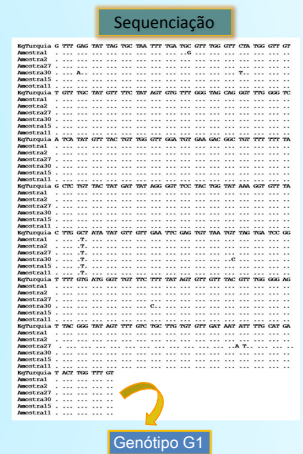


Figura 5 - Sequenciação do gene COI e confirmação do genótipo

## CONCLUSÕES

Após análise dos padrões de clivagem enzimática obtidos, para cada endonucleasa de restrição, amostras com um padrão de clivagem diferente para a mesma enzima foram amplificadas para o gene COI, sequenciadas e comparadas com outras sequências existentes no GenBank, confirmando a presença do genótipo G1 (genótipo da ovelha). Todas as outras amostras já mostravam um padrão de corte compatível com o genótipo G1. Com estes dados podemos concluir que para uma correcta genotipagem de amostras de *E. granulosus* é necessário associar à PCR-RFLP uma técnica mais específica, como a sequenciação (Manterola *et al.*, 2008).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jenkins, D.J., Romig, T. & Thompson, R.C. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus spp.*—a global update. *Int J Parasitol*, **35**(11-12): 1205-1219.
- Manterola, C., Benavente, F., Melo, A., Vial, M. & Roa, J.C., Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of southern Chile. *Parasitology international*, 2008;57(3):342-6.
- Thompson, R.C. 2008. The Taxonomy, Phylogeny and Transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*, **119**(4): 439-446.
- Varcasia, A., Canu, S., Kogkos, A., Pipia, A.P., Scala, A., Garippa, G. & Seimenis, A., Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitology Research*, 2007; 101(4):1135-9.
- Villalobos, N., González, L.M., Morales, J., de Aluja, A.S., Jiménez, M.I., Blanco, M.A., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E. & Gárate, T., Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Veterinary parasitology* 2007;147(1-2):185-9.