

IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO HAPLÓTIPO DE *Fasciola hepatica*

Roque, C.¹, Beato, S.^{1,2}, Maurício, I.² & Belo, S.²

¹Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco

²Unidade de Microbiologia e Parasitologia Médica (UPMM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa

INTRODUÇÃO



A *F. hepatica* é o agente etiológico da Fasciolose humana e animal, e tem a capacidade de parasitar diversas espécies animais, principalmente herbívoros e omnívoros (ovinos, bovinos, caprinos, etc.) onde pode ser encontrado no fígado e canais biliares, tendo também a capacidade, de acidentalmente infectar o Homem. Em humanos esta patologia deve ser sempre tida em conta em zonas

endémicas, sendo que, o principal grupo de risco são crianças que vivem em zonas rurais e pantanosas (Soliman, 2008). Em animais é um dos principais responsáveis por perdas económicas de explorações pecuárias (Costa, 2010). Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita sendo mais frequente em regiões pantanosas sujeitas a inundações periódicas (Rey, 2002 e Neves, et al., 2007).

METODOLOGIA

Exemplar de *F. hepatica* encontrado no fígado de um bovino no matadouro de Pedrogão Grande e conservado em etanol a 70%.



Extração de DNA efetuada através do método manual de fenol-clorofórmio (Sambrook, 1989).



Amplificação das regiões ITS1 e ITS2 com os primers BD1/4S (Bowles & McManus, 1993) e Dd58SF1/Dd28SR1 (Sharroks, 1994), respetivamente.



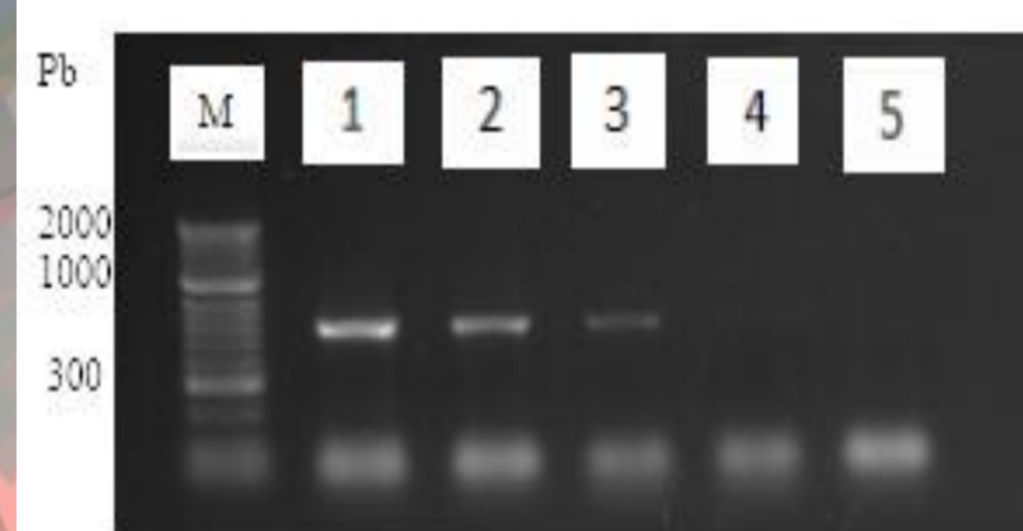
Purificação “QIAquick PCR purification kit” (Qiagen) e sequenciação (método de Sanger) dos produtos amplificados.



Análise filogenética das sequências obtidas através de software apropriado, culminando com a criação de redes filogenéticas pelo programa SplitsTree4, usando distâncias calculadas através do parâmetro Kimura-2 no algoritmo Neighbor-Net.

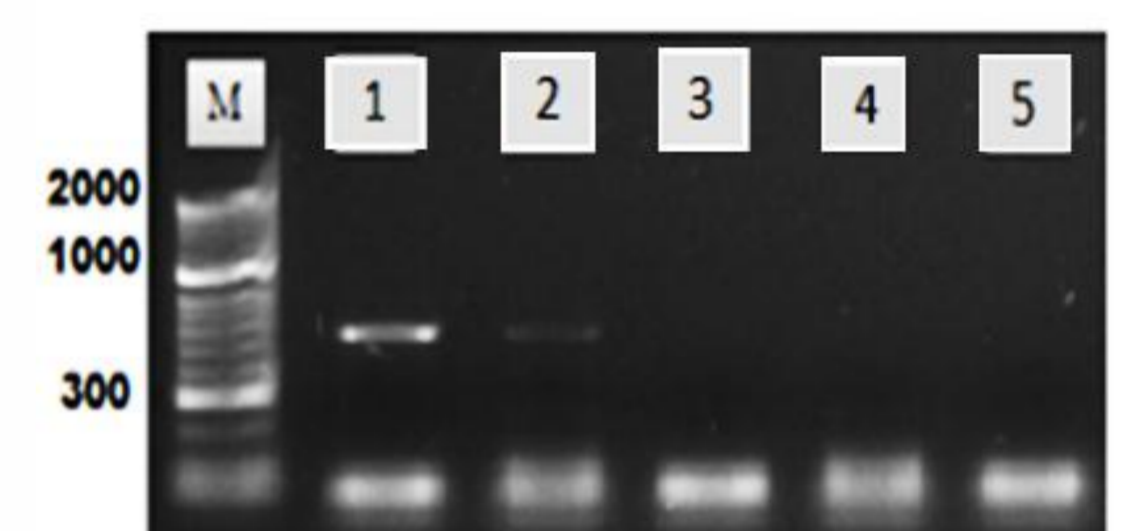
RESULTADOS

Região ITS1 *F. hepatica*

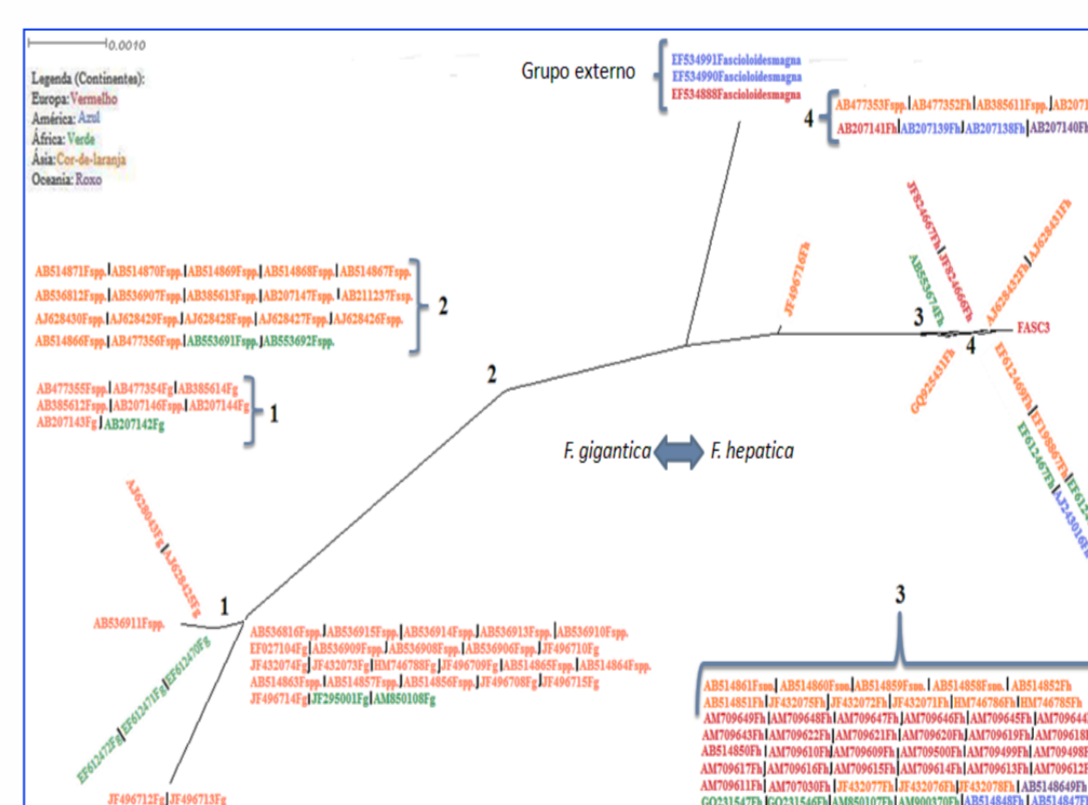


Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb da região ITS1. Amostras: 1- *F. hepatica*; 2- *F. hepatica* (1:10); 3- *F. hepatica* (1:100); 4- *F. hepatica* (1:1000) e 5- Controlo negativo. M: marcador.

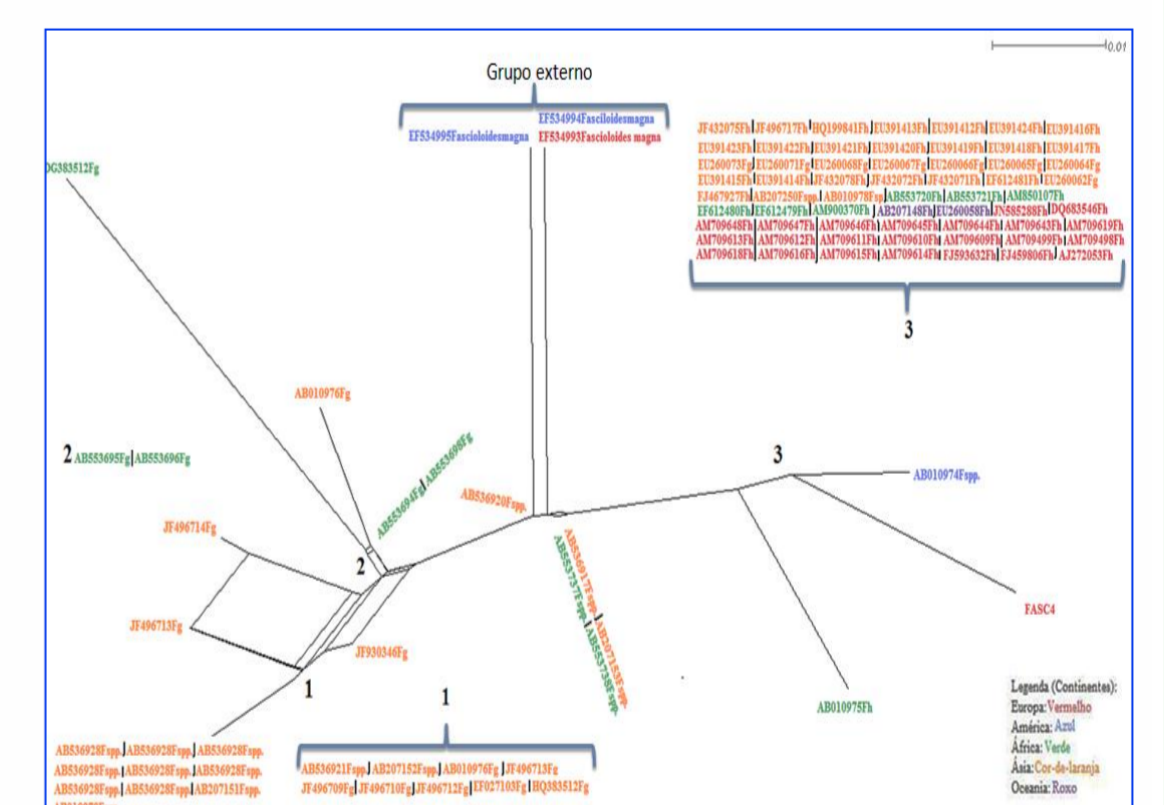
Região ITS2 *F. hepatica*



Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pb da região ITS2. Amostras: 1- *F. hepatica*; 2- *F. hepatica* (1:10); 3- *F. hepatica* (1:100); 4- *F. hepatica* (1:1000) e 5- Controlo negativo. M: marcador.



Rede filogenética da região ITS1 do exemplar de *F. hepatica*, gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net.



Rede filogenética da região ITS2 do exemplar de *F. hepatica*, gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net.

DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

Com os primers utilizados conseguiu-se efetuar a amplificação das regiões alvo (ITS1 e ITS2), sendo que, a respetiva análise filogenética revelou que estas eram diferentes de todas as que estavam descritas na base de dados do GenBank.

A região ITS1 do exemplar estudado está mais próxima filogeneticamente de amostras do continente asiático (AJ628432, AJ628431, EF612469 e EF612468), do continente africano (EF612467 e EF198867) e do continente

americano (AJ243016), com um único local polimórfico de diferença entre as sequências referidas e a sequência estudada. A região ITS2 estava próxima filogeneticamente de sequências descritas um pouco por todo o mundo, apresentando 2 locais polimórficos em relação às sequências descritas na base de dados.

Este será portanto um novo haplótipo de ITS1 e ITS2 para *F. hepatica* e a primeira sequência obtida desta região para esta espécie em Portugal.

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.

 Costa, A. 2010. *Fasciolose bovina: Aspetos clínicos e epidemiológicos no Alentejo*. Lisboa: Tese de Mestrado - Universidade técnica de Lisboa/Faculdade de Medicina Veterinária.

 Neves, D., Melo, A., Linardi, P., & Vitor, R. 2007. *Parasitologia Humana*. São Paulo, Editora Atheneu.

 Rey, L. 2002. *Bases da Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989 *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), 2nd ed.

 Sharroks, A.D., 1994. *The Design of Primers for PCR Technology:Current Innovations*. Boca Raton, CRC Press, London.

 Soliman, M.F.M. 2008. Epidemiological review of human and animal fascioliasis in Egypt. *J. Infect Developing Countries*. 2(3): 182-189.