

Utilização de técnicas de biologia molecular para a detecção de *Giardia lamblia*

Juliana S. V. da Fonseca; Tatiana da S. Ramos, Andréa da S. R. Rocha, Alceu G. dos Santos Jr, Pedro E. A. da Silva, Fabrício R. Conceição, Carlos J. Scaini

Introdução:

O protozoário *Giardia lamblia* é considerado um dos mais importantes agentes etiológicos de diarreia nos seres humanos e nos animais em todo o mundo (ADAM, 2001). No Brasil, a giardíase está entre as três principais causas de morbidade em crianças de zero a cinco anos de idade. A comunidade científica acreditava, até meados da década de 90, que a infecção por *G. lamblia* ocorria somente pela ingestão de cistos presentes na água e alimentos, e pelo contato direto com pessoas parasitadas. Entretanto, os estudos de biologia molecular e de filogenética possibilitaram a identificação de dois genótipos zoonóticos de *G. lamblia*. A utilização de ferramentas moleculares, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o gene glutamato desidrogenase (*gdh*), tem permitido observar a diversidade genética das populações de *G. lamblia*, bem como caracterizar genótipos desta espécie em diferentes hospedeiros (THOMPSON, 2004). Atualmente, são reconhecidos sete genótipos de *G. lamblia* (A, B, C, D, E, F e G). Os genótipos A e B parasitam o homem e outros mamíferos (zoonóticos), enquanto que os demais genótipos são específicos para animais (READ *et al.*, 2004).

Nos bovinos, a infecção por genótipo E (não zoonótico) de *G. lamblia* é mais frequente, porém foi demonstrado em estudos realizados no Canadá e Austrália que 20% do rebanho pode albergar genótipo A, considerado o mais frequente em humanos.

Diante da diversidade genética deste parasito os métodos baseados na detecção de DNA, especialmente a PCR, têm sido cada vez mais utilizados e descritos como uma metodologia de alta sensibilidade para detecção desse parasito em amostras de fezes tanto de humanos como de animais. Este estudo teve como objetivo a aplicação da técnica de PCR para diagnóstico molecular de *G. lamblia* em fezes de bovinos, para posteriormente ser utilizada na genotipagem do protozoário.

Metodologia

A partir de quatro amostras de fezes bovinas positivas para cistos de *G. lamblia*, obtidas de propriedades rurais do Rio Grande, pelo método de centrifugo flutuação em solução de sulfato de zinco (Técnica de Faust) realizou-se a extração de DNA, utilizando o QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante, com o acréscimo de três ciclos de choque térmico em nitrogênio líquido seguido de aquecimento a 60°C por cinco minutos. Após o término da extração o DNA foi eluído em 100µL de tampão de eluição e armazenado a -20°C.

Amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR): O DNA extraído foi amplificado utilizando *primers* específicos para o gene *gdh* de *G. lamblia*, tendo como produto um fragmento de 1190 pb. Os *primers* utilizados

foram GDH-F0 e #579II. Foi utilizada uma reação de 50 µL contendo: 20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl, 2,5 % de DMSO, 200 µM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada primer, 1U de Taq DNA polimerase e 6µL do DNA extraído. As condições de ciclagem foram: 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 30s e 72°C por 120s com uma extensão final de 72°C por 5 min.

Eletroforese em gel de agarose: após amplificação os produtos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio como revelador.

Resultados e discussão

Das quatro amostras positivas para *G. lamblia* foi possível extrair DNA de todas, enquanto a amplificação do fragmento de interesse foi possível em três das quatro amostras submetidas à técnica de PCR (Figura 1).

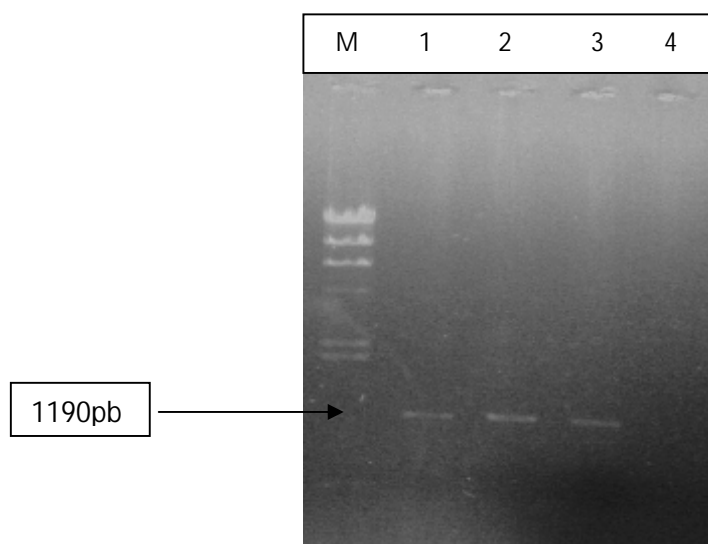


Figura1: Análise de PCR baseado na amplificação do gene *gdh* de *G.lamblia*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de peso molecular *Hind* III; 1, 2, 3 e 4: amostras.

Após o processamento inicial por PCR utilizando o protocolo para amplificação de um fragmento de DNA de *G. lamblia* tendo como alvo o gene *gdh*, foi observado que em uma das amostras testadas não houve amplificação. Tal fato pode estar relacionado com a baixa quantidade de cistos presente na amostra comprometendo a eficiência da extração de DNA e também a presença de componentes que podem degradar o DNA e prejudicar as reações de PCR, através da inibição da atividade da enzima DNA polimerase.

Apesar de serem resultados preliminares, já se pode observar a importância da utilização de técnicas de biologia molecular para o diagnóstico de *G. lamblia* em amostras de fezes. Neste estudo, foi possível padronizar a metodologia para extração do DNA genômico, bem como a amplificação do

gene *gdh* do parasito, que são ferramentas necessárias para posterior genotipagem do protozoário.

Referências Bibliográficas

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.447-475, 2001.

MOTA, J.A.C.; PENNA, F.J.; MELO, M.C.B. Parasitoses intestinais. In: Leão E., Corrêa E.J., Vianna m.b., Motta J.A.C. eds. In: **Pediatria Ambulatorial**, 5º ed. Belo Horizonte: Coopmed; 2004.

CACCIÓ, S.M; DE GIACOMO, M.; AULICINO, F. A.; POZIO, E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.6, p.3391-3398, 2003.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.1135-1144, 1999.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v.16, n.5, p.210-213, 2000.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.15-35, 2004.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, p. 125-130, 2004.

O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M. E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R.C. *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Veterinary Parasitology**, v.90, n.3, p.193-200, 2000.

SOUZA, S.L.P., GENNARI, S.M., RICHTZENHAIN, L.J., PENA, H.F.J., FUNADA, M.R., CORTEZ, A., GREGORI, F., SOARES, R.M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.258–264, 2007.