

ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CARRAPATO (Arachnida; Acari) PARA ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

FIOCRUZ – IOC – LIRN/CAVAISC

Pamela Ferreira Braga da Silva (Colégio Pedro II – Campus Realengo II)
 Orientador: Alessandro Ponce de Leão Giupponi; Coorientadora: Ana Beatriz Pais Borsoi

Introdução

Dois métodos comumente usados para extração de DNA serão avaliados quanto eficiência e custos. Os grupos taxonômicos utilizados neste estudo, serão os carrapatos do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Ixodida; Ixodidae; Amblyomminae) e quando possível for, as bactérias do gênero *Rickettsia* da Rocha-Lima, 1916 (Rickettsiales; Rickettsiaceae) que podem infectar esses artrópodes alojando-se principalmente em suas glândulas salivares, ovários e intestino. Os métodos de extração utilizados no estudo serão: por NaCl e Coluna de Sílica (kits comerciais de extração).

Justificativa

Os carrapatos pertencem ao filo Arthropoda; possuindo pernas articuladas e um exoesqueleto duro (esqueleto externo). São organismos evolutivamente próximos de aranhas, ácaros e escorpiões, pois assim como estes, pertencem à classe Arachnida. Possuem um par de quelíceras, um par de pedipalpos e quatro pares de pernas (seis apêndices prossomais). São ectoparasitos (parasitas externos) e hematófagos, alimentando-se do sangue (Ruppert, Fox & Barnes, 2005).

Os carrapatos podem transmitir diversos agentes patogênicos (ex: bactérias, protozoários, vírus) através de sua saliva, injetada por meio de uma picada (Krantz & Walter, 2009). Dentre as principais doenças transmitidas ao homem, podemos citar: febre maculosa brasileira (causada por bactérias do gênero *Rickettsia*) e borreliose de Lyme (causada por bactérias do gênero *Borrelia Swellengrebel*, 1907).

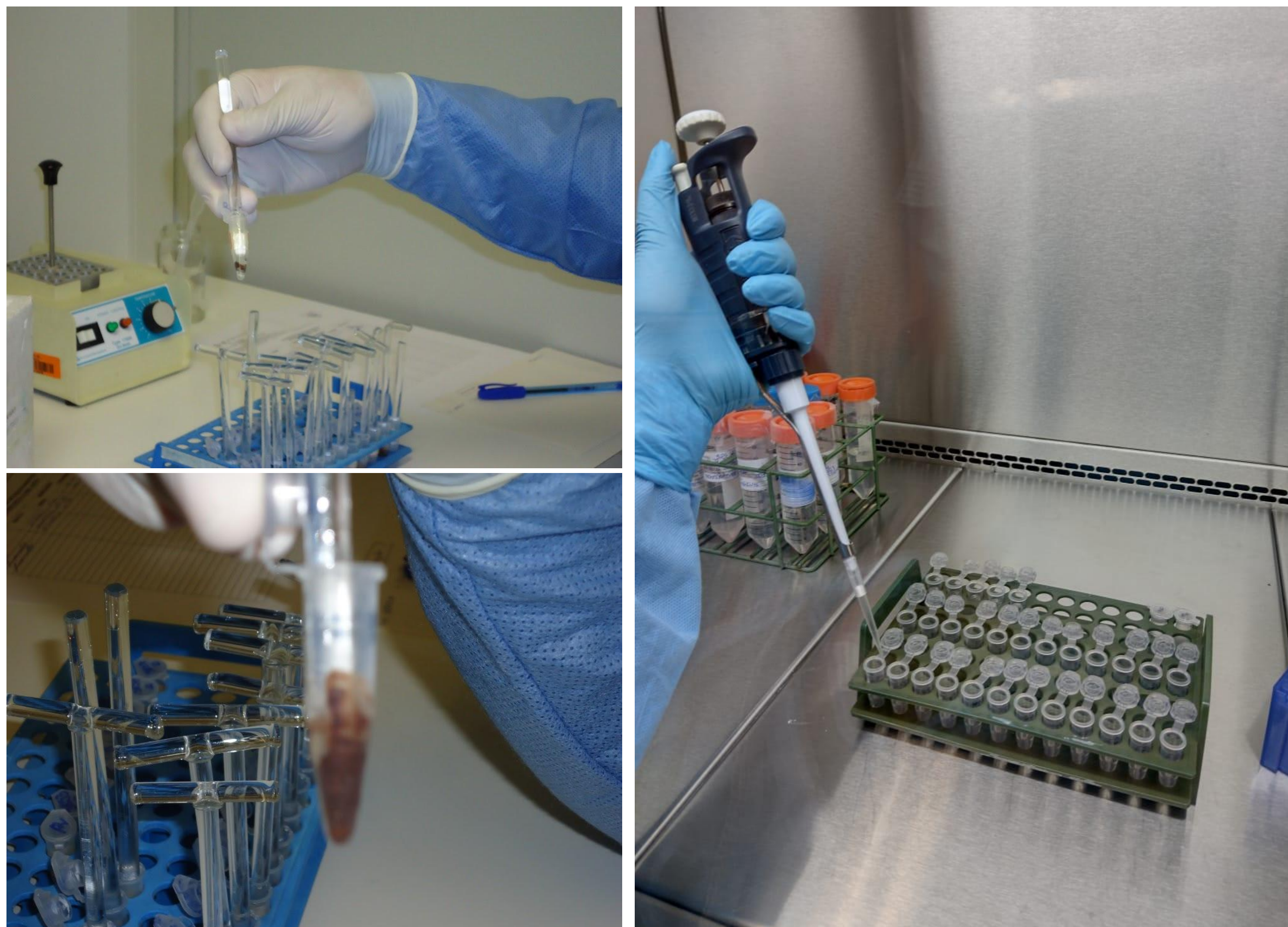


Figura 1- Etapas iniciais da Extração por NaCl. Maceração dos carrapatos e aplicação de NaCl 5M. Fonte: Arquivo do Laboratório Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses – LIRN/IOC.

No final do século 20, o advento das técnicas moleculares possibilitou a investigação do DNA em nível de pares de bases individuais e tem revolucionado os estudos de sistemática e epidemiologia com ácaros e carrapatos de importância econômica e médico-veterinária (Navajas & Fenton, 2000). Dentre os métodos comumente usados, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); (Hills, 1996).

Para a realização da PCR, é necessário primeiro extrair os ácidos nucléicos presentes no interior das células e, como os carrapatos são artrópodes com um rígido exoesqueleto de quitina, a extração de DNA pode necessitar de várias etapas. Historicamente, várias técnicas foram desenvolvidas para extração de DNA de carrapatos.

Embora poucos estudos tenham investigado diferentes métodos de isolamento de DNA de carrapatos, eles são limitados a alguns tipos de extração de DNA e carecem de quantificação espécie-específica do rendimento de DNA (Ammazzalorso et al., 2015; Surzycki 2000). Desta forma, a utilização de métodos de extração de ácidos nucléicos adequados para cada tipo de amostra, torna-se essencial para obtenção de produtos de alta qualidade e resultados confiáveis.

Objetivos

- Testar dois distintos métodos de extração de DNA de carrapatos (Acari) para avaliar a eficiência dos mesmos;
- Avaliar se existe diferença na eficiência da extração de DNA relacionada aos custos dos distintos métodos;
- Avaliar a eficiência da detecção de DNA de microrganismos (*Rickettsia* da Rocha Lima, 1916) infectando os carrapatos;
- Avaliar se existe diferença na eficiência de detecção de DNA de *Rickettsia* relacionada aos custos de cada método testado.

Material e Métodos

Procedência dos Carrapatos: Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde (Ministério da Saúde do Brasil), em parceria com o Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN - Fundação Oswaldo Cruz) durante Investigação de Foco ou Vigilância de Ambiente para Febre Maculosa.

Coleta: Foram coletados livres no ambiente seguindo a técnica de arrasto de flanela e busca ativa, e em hospedeiros vertebrados presentes no provável local de infecção, através de torção em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma.

Acondicionamento: Em microtubos estéreis contendo isopropanol P.A. e encaminhados para identificação taxonômica.

Identificação Taxonômica: Todos os espécimes foram identificados morfológicamente, utilizando chaves dicotômicas apropriadas para cada grupo, seguindo o Procedimento Operacional Padrão estabelecidos no LIRN (POP 017) e encaminhados para as análises moleculares.

A extração de DNA dos carrapatos será realizada seguindo os protocolos:

- Solução saturada de NaCl (protocolo modificado de Aljanabi e Martinez, 1997);
- Coluna de sílica (*Blood and Tissue – Qiagen e/ou Purelink - Invitrogen e/ou NucleoSpin Tissue - Macherey Nagel*).

Análise da quantidade e pureza dos ácidos nucléicos obtidos em cada técnica: As amostras serão quantificadas em espectrofotômetro (*NanoDrop™ 2000*, Thermo Scientific) e armazenadas a -20°C até a realização das ampliações.

As amostras serão submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de sequências parciais de genes constitutivos de carrapatos (Beati e Keirans, 2001) para confirmar a integridade do DNA extraído por cada técnica.

De forma adicional, será realizada pesquisa molecular de microrganismos do gênero *Rickettsia* da Rocha Lima, 1916 (Labruna et al., 2004; Regnery et al., 1991) nas amostras que apresentarem resultado satisfatório nos ensaios com marcadores endógenos de carrapatos.

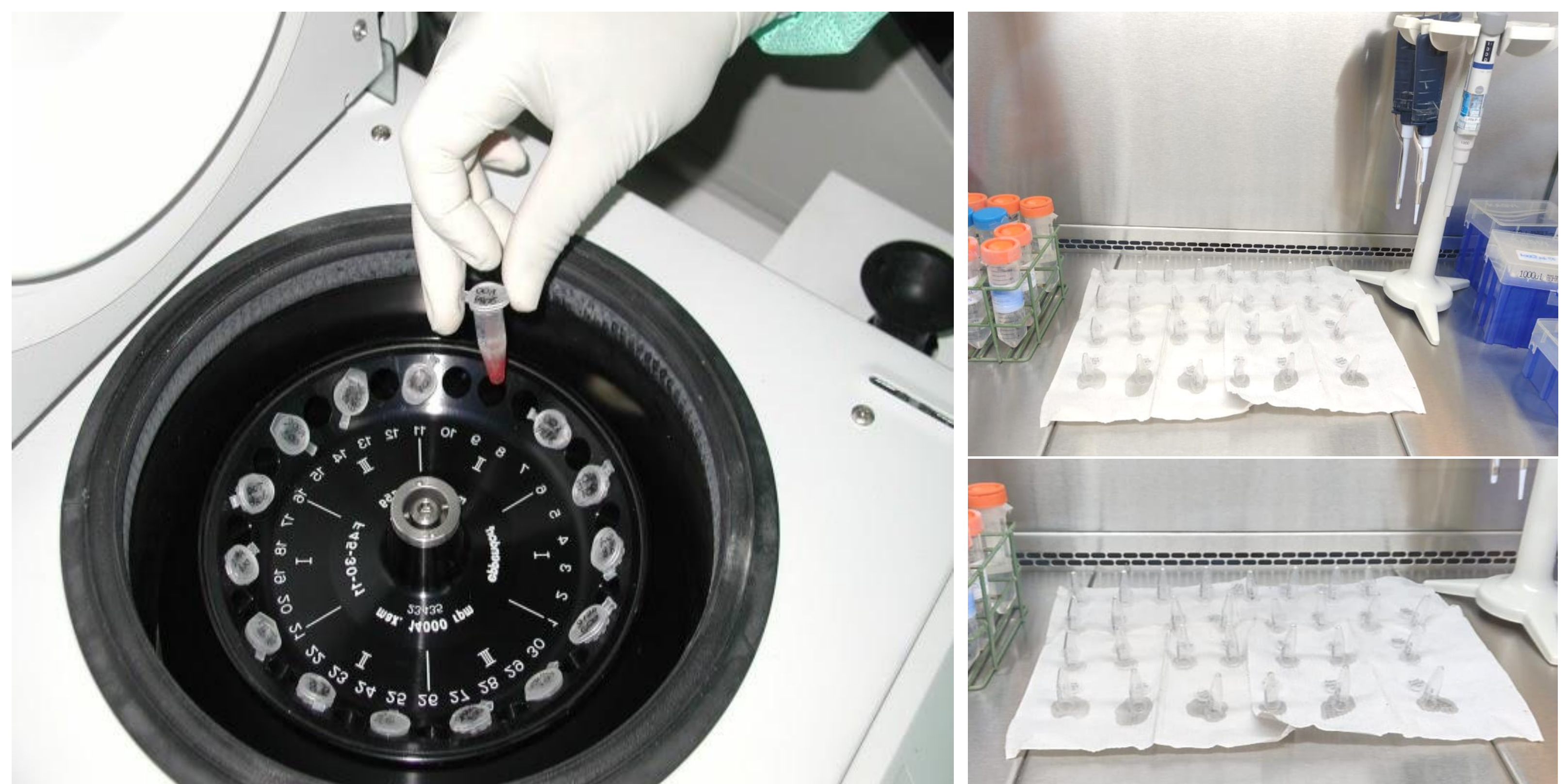


Figura 2 – Etapas Finais da Extração por NaCl. Rotação em centrífuga refrigerada para precipitação de proteínas e demais impurezas e suspensão do DNA. Concentração do DNA no fundo do tubo tipo eppendorf para ressuspensão final com água ultrapura. Fonte: Arquivo do Laboratório Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses – LIRN/IOC.