

Maurício Durigan*, Nilson Branco, Romeu Cantúcio Neto, Jancarlo Ferreira Gomes, Anete Pereira de Sousa & Regina Maura Bueno Franco

*DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, IB - UNICAMP, CAMPINAS, SP, e-mail: mdurigan@gmail.com

Agência Financiadora: CNPQ
Giardia – Caracterização Molecular – Campinas

Introdução:

Giardia duodenalis é um protozoário parasita intestinal de humanos e outros animais, causador da giardiose, a mais comum doença de veiculação hídrica, que atinge milhões de pessoas em todo o mundo. A contaminação das principais bacias hidrográficas do estado de São Paulo constitui uma grande questão de saúde pública.

A espécie *Giardia duodenalis* possui enorme diversidade genética e foi subestruturada em sete assembléias genéticas. As linhagens “A” e “B” são as únicas isoladas de humanos e animais, e possui potencial zoonótico.

Os métodos tradicionais de pesquisa e identificação de cistos são capazes de identificar apenas a presença ou ausência do gênero *Giardia*. As metodologias moleculares exploram essa diversidade e têm vantagens como grande sensibilidade, especificidade e rapidez.

Objetivos:

Padronizar metodologias de preservação e extração de DNA dos cistos.

Caracterizar molecularmente cistos de *Giardia* isolados de amostras clínicas e ambientais obtidos na cidade de Campinas, São Paulo.

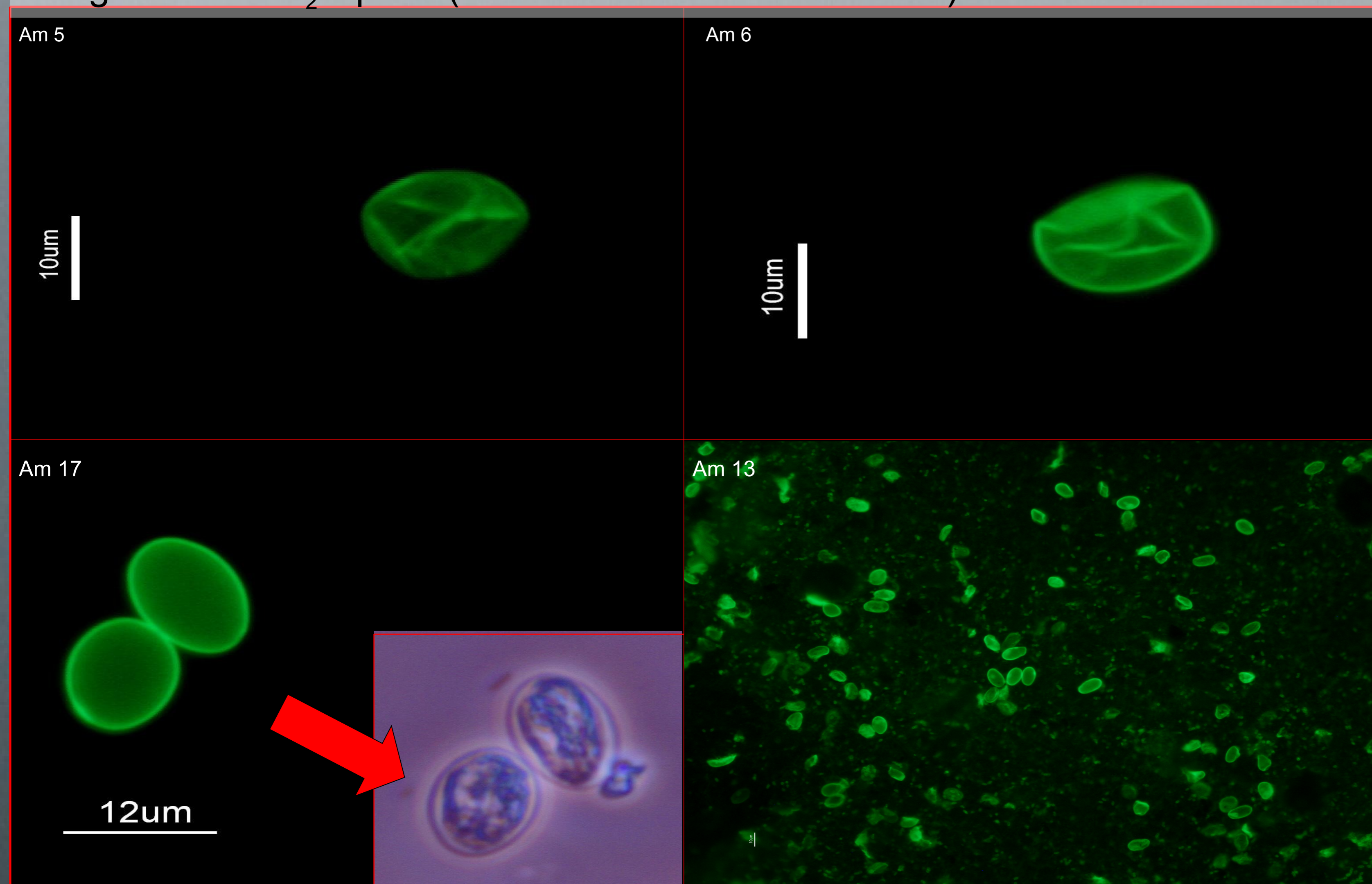
Material e Métodos:

Foram padronizados métodos de conservação de cistos por processos de congelamento de 18 amostras de *Giardia*. Os cistos foram quantificados e avaliados quanto à integridade da célula através de reação de imunofluorescência direta (RID).

O DNA dos cistos foi extraído com diferentes kits de extração. O DNA, após ser amplificado com um par de iniciadores específicos para *Giardia*, foi seqüenciado após amplificação de fragmento do gene GDH (Glutamato Desidrogenase).

As seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências de referência e submetidas a consultas em bancos de dados genômicos.

Fig 1. Cistos após RID. Am 5 e 6: Cistos pós congelamento em freezer. Am 17: Congelada em N₂ líquido (seta indica contraste de fase). Am 13: Rica em cistos



Resultados:

Algumas amostras congeladas no freezer apresentaram danos na estrutura celular. As amostras congeladas em nitrogênio apresentaram-se mais íntegras (fig 1).

Mesmo após a purificação, as amostras apresentaram grande quantidade de cistos (tabela 1).

O DNA extraído foi quantificado. O kit da Zymo Research foi o que apresentou maior rendimento (fig 2).

Após o alinhamento, a amostra 13 foi caracterizada como pertencente à assembléia A e a amostra 16 à assembléia B (Fig 4).

Tabela 1. Quantificação de cistos de 5 amostras após purificação.

Amostra	Am 13	Am 14	Am 15	Am 16	Am 17
Nº de Cistos:	5,13x10 ⁵	3,08x10 ⁴	1,18x10 ⁵	1,63x10 ⁵	6,3x10 ³

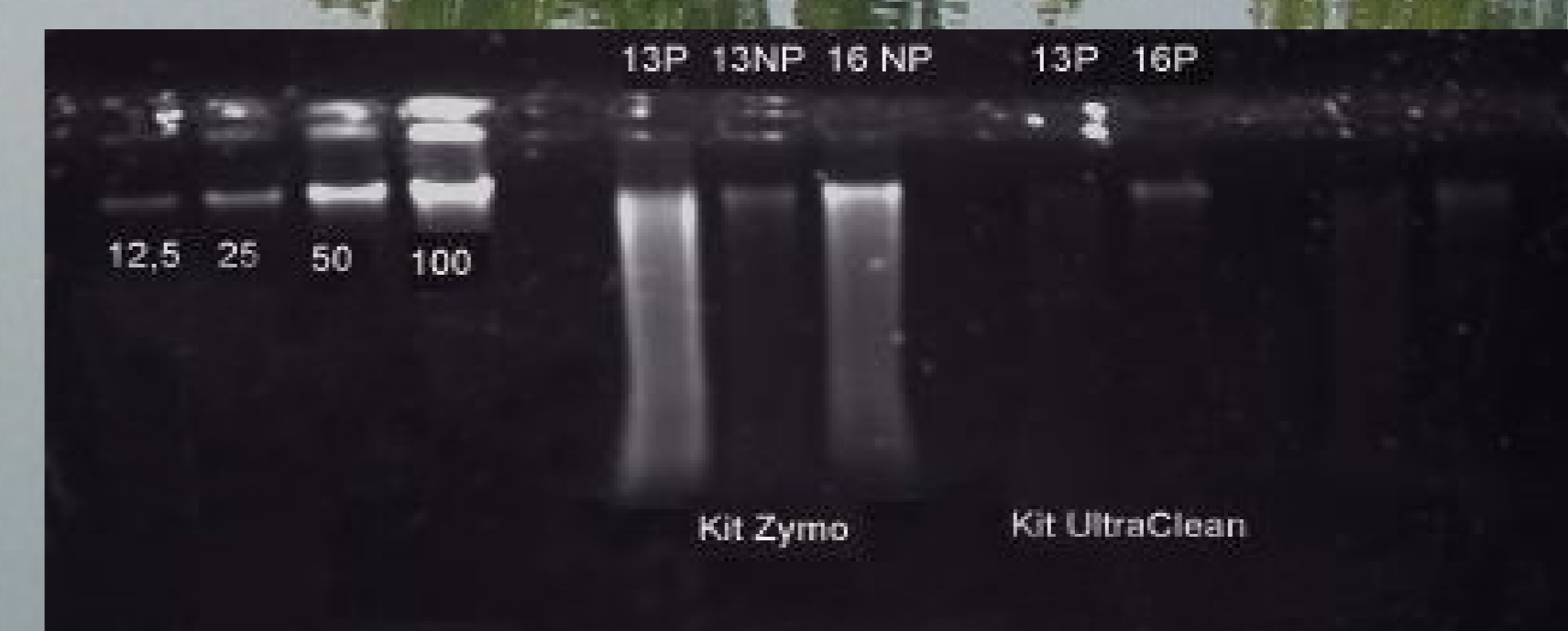


Fig 2. Gel de quantificação comparando kits diferentes de extração de DNA

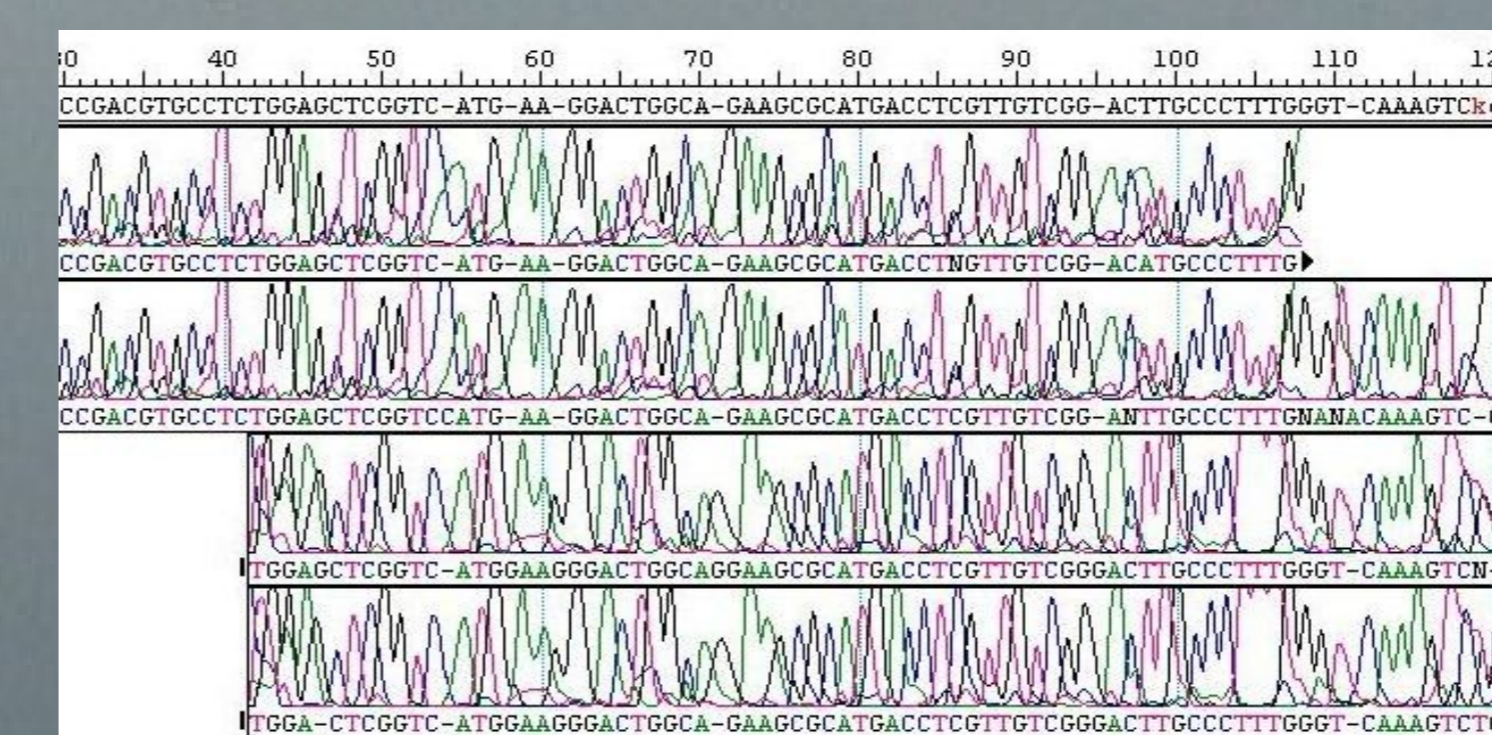


Fig 3. Eletroferograma da amostra 13 evidenciando alinhamento das 4 reações

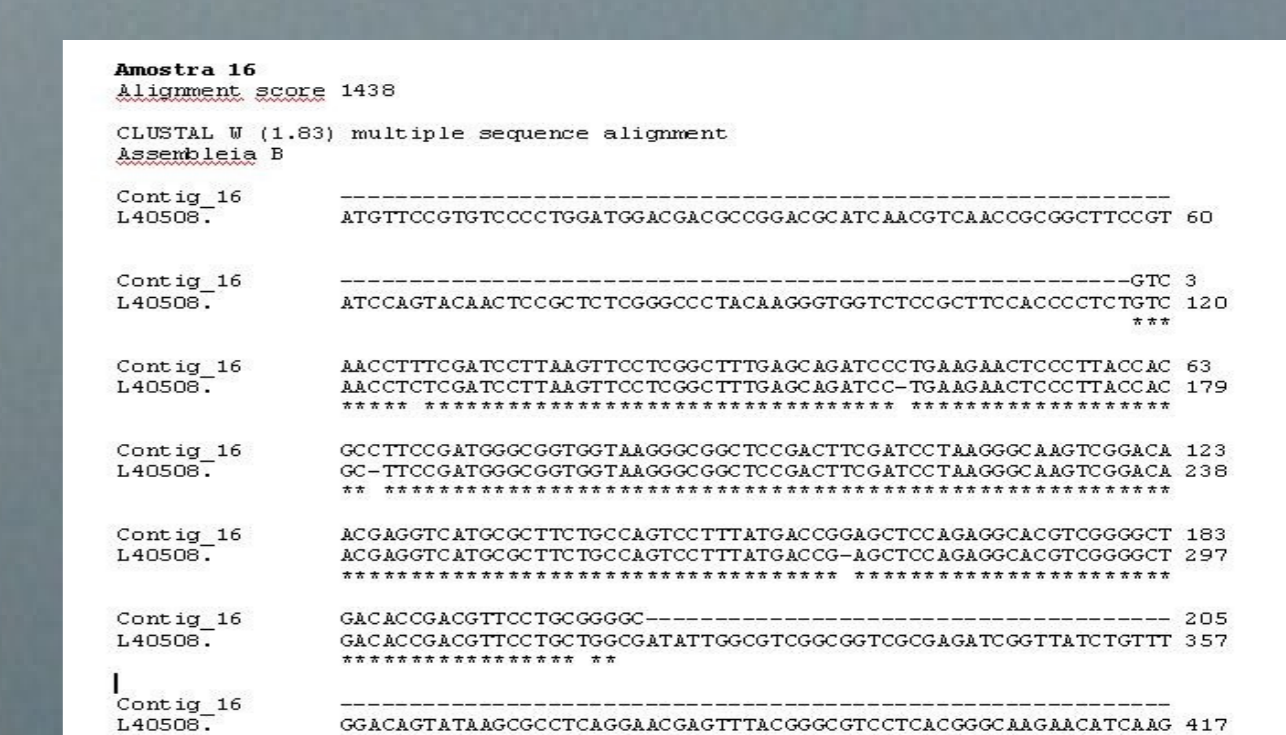


Fig 4. Amostra 16 alinhada com padrão da assembléia B

Conclusões:

Para a conservação dos cistos, a metodologia mais adequada é a purificação seguida pela adição de antibióticos e congelamento em N₂ líquido.

A extração de DNA deve ser realizada com kits, que apresentam maior rendimento e limpeza da amostra.

As amostras seqüenciadas apresentaram os genótipos humano-específicos, cuja implicação epidemiológica fica restrita a humanos. Os genótipos estão presentes na região de Campinas