

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)

THEREZINHA TRAVASSOS CARVALHO DE ALMEIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública

**Área de concentração: Prática em Saúde Pública
Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA HELENA MATTÉ**

**São Paulo
2004**

Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e reação em cadeia pela polimerase (PCR)

THEREZINHA TRAVASSOS CARVALHO DE ALMEIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública

**çãçÁrea de concentração: Prática em Saúde Pública
Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA HELENA MATTÉ**

**São Paulo
2004**

Dedico este trabalho

Ao meu amado filho Marcos, que desde pequeno sofreu minhas ausências durante a execução desta tese.

Ao meu querido pai Telmo, pelo seu exemplo vivo de honestidade, lisura, paciência, condescendência e amor pelo próximo, e também pela força e incentivo que sempre me deu.

À minha mãe Dilma, que certamente ficaria muito feliz ao ver sua filha tornando-se doutora.

Agradecimentos

Meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora, Profa. Dra. Maria Helena Matté, que, como eu, adora desafios! Profissional competente, incansável, sempre pronta para o trabalho, a qualquer hora! Professora nata, de memória invejável, consegue orientar e acompanhar todas suas alunas. Como mãe, sempre soube compreender minhas necessidades de dividir-me entre a maternidade e o laboratório. Como professora, sempre soube me orientar e estimular. Como pessoa, sabia escutar e tentar compreender minhas dificuldades. Muito obrigada!!! Espero que a amizade pessoal e a afinidade profissional advindas deste trabalho produzam muitos frutos.

Meu muito obrigada,

À Profa. Dra. Hermínia Yokho Kanamura, por ter me introduzido nesse campo de estudo e pelas sugestões.

Às amigas Angélica Maria Casimiro, por ceder-me as amostras do bezerro, e pela grande e inestimável ajuda na etapa de

preparação dessas amostras e à Aparecida Gomes, por ceder-me uma amostra clínica.

À colega Mônica Schuller, por gentilmente ceder-me as amostras de pombos.

À Profa. Dra. Solange Maria Gennaro, por providenciar as amostras clínicas dos animais.

A todo o pessoal do Laboratório de Práticas de Saúde Pública: à Milena Dropa, pelo apoio na parte experimental, sempre que precisei; à Mírian Lopes, que muito me ajudou na leitura dos géis; Suzete, Fernanda, Marisa, Thiago, Martha e Karla, e à Silvana Cutolo, do Laboratório de Saúde Ambiental, pelo entusiástico auxílio no início da parte experimental.

Aos membros da Banca Examinadora, Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola, Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi e Prof. Dr. Delsio Natal, pelas sugestões para a elaboração da versão final do trabalho.

À Solange Martone, pela bonita amizade que construímos durante nossas jornadas como doutorandas e pelo auxílio na digitação da tese.

Ao Prof. Dr. Glavur Rogério Matté, pela colaboração no trabalho.

Aos colegas Ana Júlia Urias Araujo, Celma Quadros e Pedro Luís Pinto, pela troca de idéias.

À minha irmã Telma, e toda sua família, Fernando, Simone e Eduardo Henrique, que sempre acolheram com muito carinho meu filho e eu, nas horas em que eu precisava descansar longe de casa e aos amigos Cláudia e Fernando, quando eu podia descansar mais longe ainda.

Ao Instituto Adolfo Lutz, na figura de seus dirigentes, por ter possibilitado a realização desse sonho.

Ao CECOVisa (Centro Colaborador em Vigilância Sanitária da USP) pelo auxílio financeiro através do Convênio CA nº 06/99-44-ANVSMA - processo nº 2001.1.1048.6.9.

Ufa, consegui, terminei, acabei!

Parece um sonho que eu, finalmente, tenha chegado ao fim dessa etapa tão difícil, sofrida a cada momento, em muitos e variados sentidos. Foi uma jornada longa, durante a qual, inúmeras vezes, quis desistir. Mas havia uma estrela a seguir, longe, distante, ainda assim, brilhante. Ou seria um sonho, sonhado por tanto tempo, que não poderia deixar de ser realizado. Ou tão somente uma missão, que deveria ser cumprida a qualquer custos??!! Sim, os obstáculos e as vicissitudes estiveram presentes sempre, sem o menor sinal de arrefecimento.

Agora, trabalho pronto, fica a sensação de que os problemas técnicos, foram a parte boa e fácil desse processo de amadurecimento. Rompemos um paradigma, ao romper a parede dos oocistos desse "bichinho" que tanta dor de cabeça causou! Mas, e quanto aos outros tantos paradigmas?!...

Bem, cabeça no travesseiro, me ponho a conjecturar se, algum dia, conseguirei também, me livrar da imensa dor de cabeça causada pelas dificuldades existenciais, sentimentais, financeiras, econômicas, etc. Acho que não, mas uma coisa tenho certeza: não possuo conhecimentos psicológicos, antropológicos, espíritas ou religiosos para explicar, mas um depoimento posso dar. Ainda que parecesse

impossível, ainda que houvesse uma enorme força negativa me empurrando ladeira a baixo, a estrela, o sonho, a missão, ou seja lá qual definição possamos dar, estava lá, à minha frente, me enchendo de forças, de energia, de garra, para não esmorecer.

Estrela alcançada ou sonho realizado ou missão cumprida. Não sei! Porém sei que, vislumbro agora, outra estrela mais brilhante, mais alta e mais distante...

Não esmorecer frente às dificuldades, não desistir nunca dos sonhos. Tudo bem, já aprendi que nunca é tarde para aprender e que sempre é hora para começar, mas, certamente, uma "espaço-nave" para me levar rapidinho à nova estrela, seria ideal!!!

CARVALHO-ALMEIDA, Therezinha Travassos. **Standardization and evaluation of molecular methods to detect oocysts of *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in faecal samples: extraction of genomic DNA and PCR (polymerase chain reaction)**. São Paulo. 2004. [PhD Thesis – School of Public Health, University of São Paulo].

Abstract: The protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* has become recognised as important emerging human pathogens. For molecular studies, most of the techniques to extract genomic DNA require the use of imported kits to concentrate, rupture the very resistant oocyst wall, and purify the DNA from the samples matrix. The aim of this study was to develop a simple and rapid method based on polymerase chain reaction (PCR) to detect *Cryptosporidium* in preserved faeces. Oocysts were concentrated from faecal specimens by flotation on sucrose gradient. Genomic DNA was prepared from purified oocysts by adding a lysis buffer containing 70 mM β -mercaptoethanol, digested with proteinase K and extracted with phenol-chloroform-isoamyl. The standardization was started by performing a one step PCR to detect *Cryptosporidium* spp using a generic set of primer (AWA). To detect *C. parvum* a one step PCR was assayed using the specific primer (LAX). To increase the sensitivity of the method, were tested nested-PCR assays, using an outer primer (XIA). Thirty nine DNA samples were analysed from the standard calf, 52 samples from 17 patients and 45 samples from 14 animals. The results were: 54.28% positive samples by single PCR AWA, 71.42% by nested-PCR, 67.74% by single PCR LAX and 44.44% by nested-PCR for the standard calf. The overall positivity for human and animal samples were: 34.48% by single PCR and 54.83% by nested-PCR for *Cryptosporidium* spp and 16.00% by single PCR and 50.00% by nested-PCR for *C. parvum*. Using Vistra Green for staining agarose gel, yielded the visualisation of the amplicons. These results show that this simple and cheap method could be improved to be used on the routine laboratory work

Key Words: *Cryptosporidium*. DNA extraction. PCR.

CARVALHO-ALMEIDA, Therezinha Travassos. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)**. São Paulo. 2004. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Resumo: O protozoário parasita *Cryptosporidium parvum* tem sido reconhecido como um importante patógeno emergente. Para estudos moleculares, a maioria das técnicas para extração do DNA requer o uso de *kits* importados para concentrar, romper a parede muito resistente do oocisto e purificar o DNA das matrizes das amostras. O objetivo do estudo foi desenvolver um método simples e rápido, baseado na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar *Cryptosporidium* em fezes preservadas. Oocistos foram concentrados das amostras fecais pela flutuação em gradiente de sacarose. Dos oocistos purificados foi extraído o DNA genômico através de incubação em tampão de lise contendo 70 mM β -mercaptoetanol, digerido com proteinase K e extraído com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. A padronização foi iniciada com a PCR única para detectar *Cryptosporidium* spp usando um par de *primer* genérico (AWA). Para identificar *C. parvum* foi realizada a PCR única com o par de *primer* específico (LAX). Para aumentar a sensibilidade do método, foi testada a *nested*-PCR, usando o *primer* externo XIA. Foram analisadas 39 amostras de DNA do bezerro padrão, 52 amostras de 17 pacientes e 45 amostras de 14 animais. Os resultados foram: 54,28% de positividade na PCR AWA, e 71,42% na *nested*-PCR XIA/AWA, 67,74% na PCR LAX e 44,44% na *nested*-PCR XIA/LAX das amostras do bezerro. A positividade geral nas amostras de pacientes e de animais foi: 34,48% pela PCR and 54,83% pela *nested*-PCR para *Cryptosporidium* spp e 16,00% pela PCR e 50,00% pela *nested*-PCR para *C. parvum*. O emprego do corante Vistra Green melhorou significativamente a visualização do gel. Os resultados mostram que este método simples e de baixo custo pode ser melhorado para aplicação na rotina do laboratório.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. Extração de DNA. PCR.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

