Comparação de diferentes metodologias de extração de DNA para o diagnóstico molecular de Bartonella spp..

Ana Paula R. Santos*, Beatriz Andrade, Amanda R. Almeida, Paulo E. N. F. Velho.

Resumo

As bartonelas são um gênero de bactérias emergentes e negligenciadas, que possuem distribuição mundial. Causam manifestações clínicas que podem ser de benignas e autolimitadas a doenças graves e potencialmente fatais. Seu diagnóstico é realizado pela associação diferentes métodos moleculares, na tentativa de evitar resultados falso-negativos, uma vez que ainda não existe um método padrão-ouro para detecção. A comparação entre os métodos de extração de DNA almeja uma maior quantidade de DNA extraído, para aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

Palavras-chave: *Bartonella*, extração de DNA, diagnóstico.

Introdução

As bartonelas são um gênero de bactérias emergentes e negligenciadas, que tem distribuição mundial. Apresentam morfologia cocobacilar, são Gram negativas e muito pequenas. Crescem em ágar enriquecido com sangue (5 e 10%), ambiente rico em CO₂ e a temperatura de 35°C. São microaerófilas, oxidase e urease-negativas, de crescimento fastidioso e não utilizam carboidratos em seu metabolismo (VELHO et al., 2003).

São patógenos intracelulares facultativos que possuem tropismo por eritrócitos, células epiteliais, células dendríticas e macrófagos. Diversos artrópodes hematófagos são descritos como vetores na transmissão de *Bartonella* spp., dentre eles encontram-se o piolho de corpo humano, pulgas e moscas. Uma das características importantes das bartonelas é a baixa bacteremia, fator este que dificulta seu diagnóstico. A maioria das infecções humanas são causadas por três principais espécies, sendo elas: *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* e *Bartonella bacilliformis*, embora existam mais de 31 espécies e subespécies de outras bartonelas (HARMS & DEHIO, 2012).

Sua detecção é realizada por meio de diversos métodos diagnósticos moleculares, na tentativa de evitar resultados falso-negativos, uma vez que ainda não existe um método padrão-ouro para detecção (KAISER et al., 2011). Isso dificulta o diagnóstico, demandando um tempo maior para o resultado e maiores custos na realização de diversas técnicas, sendo um problema a aplicabilidade na rotina clínica (HARMS & DEHIO, 2012).

Sendo assim, este trabalho tem o objetivo de comparar a extração de DNA utilizando *kit* comercial e extração com cloreto de lítio, na busca de uma técnica mais sensível, com uma redução de resultados falso-negativos e que gere menos resíduos ao meio ambiente, sendo viável na rotina clínica.

Resultados Parciais e Discussão

Figura 1.Fluxo experimental.

Tabela 1. Quantificação do DNA.

Método	Concentração µg/µl	Razão 260/280nm
Comercial	0,03	1,74
LiCl	1,14	1,68
teste t	p < 0,001	p > 0,05

Entre os protocolos avaliados, a quantificação do DNA extraído do sangue total foi altamente significativa para a extração com LiCl. Com relação a qualidade do DNA extraído, não houve diferença significativa entre as extrações.

Conclusões

Até o presente momento a extração de LiCl mostra-se muito eficiente, extraindo grande quantidade de DNA com qualidade.

HARMS A, DEHIO C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of Bartonella spp. **Clinical microbiology reviews**. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 25(1):42-78, Jan, 2012.

KAISER PO, RIESS T, O'ROURKE F, LINKE D, KEMPF VA. Bartonella spp.: throwing light on uncommon human infections. **International journal of medical microbiology: IJMM**. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 301(1):7-15, Jan, 2011.

VELHO, PENF. et al. Angiomatose bacilar: revisão da literatura e documentação iconográfica. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 78 (5): 601-609 set./out. 2003.