

TÉCNICA DE PCR *SIMPLEX* ASSOCIADA A MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BAIXO CUSTO PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *SHIGELLA SPP*¹

THE PCR SIMPLEX TECHNIQUE ASSOCIATED TO THE LOW COST DNA EXTRACTION METHOD FOR MOLECULAR IDENTIFICATION OF SHIGELLA SPP CLINICAL ISOLATES

**Renata Zorzetto², Luana Carvalho Saraiva², Luana Costa², Taís Vidal Palma²,
Jéssica Carla Martins Couto², Letícia Maffi Augusti², Guilherme Teixeira Leal²,
Felipe Pinto de Quadros², Gabriela Murari Fernandes², Jenifer Kolling², André Nussbaumer²,
Carolina dos Santos Santini³, Graziela Schuh⁴, Michele Sagrilo⁴ e Bruno Stefanello Vizzotto⁵**

RESUMO

Shigelose é uma doença entérica responsável por 1,1 milhões de mortes anualmente, 60% destas representadas por crianças menores de 5 anos. Espécies de *Shigella* são encontradas em água e alimentos contaminados, sendo a rota de transmissão deste patógeno por meio do contato fecal-oral. O presente estudo visou a adaptar uma técnica molecular com vistas à identificação de casos clínicos de gastroenterite provocadas por *Shigella spp*. A cultura bacteriana do isolado clínico de *S. sonnei* LCL-01 foi submetida à extração de DNA genômico por meio do método de fenol-clorofórmio com modificações, submetendo o material genético resultante à técnica de PCR *simplex*. O procedimento de extração resultou em um DNA genômico de boa qualidade, obtendo-se fragmento de 615 pb após amplificação do gene *ipaH*. Dessa forma, viabilizou-se a identificação molecular de *S. sonnei* por meio da adaptação de uma metodologia *in-house* de baixo custo, baseada na utilização de fenol-clorofórmio como ferramenta para romper a parede celular bacteriana visando à extração de DNA genômico, a qual poderá auxiliar no rastreamento, detecção e tratamento de infecções causadas por *S. sonnei*.

Palavras-chave: PCR, fenol-clorofórmio, gene *ipaH*.

ABSTRACT

Shigellosis is an enteric disease responsible for 1.1 million deaths annually. 60% of those is represented by children under 5 years old. Shigella species are found in contaminated food and water, so the transmission's route is through fecal-oral contact. The present study aims to adapt a molecular method for the identification of clinical gastroenteritis cases caused by Shigella spp. The bacterial culture of the S. sonnei LCL-01 clinical isolate was subjected to the genomic DNA extraction by means of the modified phenol-chloroform method. The resulting genetic material was subjected to the PCR simplex technique. This procedure resulted in a genomic DNA of good quality, with a fragment of 615 pb after the amplification of the ipaH gene. In this manner, it was possible the molecular identification of S. sonnei by adapting an in-house low cost method, which is based in the usage of phenol-chloroform as a tool for breaking the bacteria cell wall for the extraction of genomic DNA. This may help tracking, detecting and treating infections caused by S. sonnei.

Keywords: PCR, phenol-chloroform, *ipaH* gene.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmicos do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano.

³ Aluna do Mestrado em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

⁴ Colaboradores - Professores do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano.

⁵ Orientador - Professor do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano. E-mail: bvizzotto@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A doença diarreica destaca-se como uma das principais causas de mortalidade infantil, particularmente em países em desenvolvimento. A incidência dos casos está fortemente relacionada às condições precárias de higiene e saneamento básico, e é no verão o período em que são registrados os maiores índices de internação hospitalar devido à desidratação. A transmissão ocorre por meio da via fecal-oral, com incidência maior em crianças em que a doença pode causar um nível de desidratação de difícil reversão, assim como em idosos e enfermos. Dessa forma, estratégias de controle e prevenção da diarreia aguda causada por enteropatógenos são necessárias no intuito de compor planos de controle que evitem a disseminação da doença (SOUZA et al., 2002; MARCHOU, 2013; BINET; DEER; UHLFELDER, 2014).

Entre os agentes bacterianos responsáveis pela deflagração de quadros de diarreia aguda destacam-se os microrganismos pertencentes ao gênero *Shigella*, devido à elevada prevalência e gravidade do quadro clínico. São transmitidos ao homem pela ingestão de água ou alimentos contaminados, desenvolvendo um quadro clínico conhecido como shigelose, caracterizado pela destruição do epitélio intestinal devido à reação inflamatória, ocasião em que é evidenciada a presença de leucócitos, muco e sangue nas fezes do indivíduo. Existem atualmente 43 sorotipos divididos em quatro subgrupos, representados pelas espécies *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*, e é obrigatoriamente confirmada a identificação das diferentes espécies por meio de testes sorológicos (HALE; KEUSCH, 1996; PARSOT, 2005; PHALIPON; SANSONETTI, 2007; OGAWA ET AL., 2008; BINET; DEER; UHLFELDER, 2014).

Um método de detecção molecular sensível é especialmente importante na detecção de isolados de *Shigella* devido à baixa dose infectante (10 células) apresentada por esse patógeno. Dentre essas técnicas destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual permite ensaios de amplificação por meio da utilização de *primers* específicos, apresentando rapidez e sensibilidade na detecção de genes alvo, como o gene *ipaH*, um dos alvos moleculares mais utilizados para a identificação de *Shigella*, responsável pela síntese da proteína flagelar presente em todas as espécies desse gênero (KARANAM et al., 2008; BINET, DEER E UHLFELDER, 2014). Os métodos de extração de DNA *in-house* mostram-se efetivos, simples e rápidos, eliminando a presença dos inibidores da PCR durante a extração, apresentando um custo mais baixo em comparação aos kits comerciais disponíveis no mercado (KARANAM et al., 2008; BINET; DEER; UHLFELDER, 2014).

Tendo em vista a relevância clínica e os dados epidemiológicos da patologia causada por *Shigella spp.*, o objetivo deste estudo foi realizar a adaptação de um método *in-house* de extração de DNA acoplado à técnica de PCR *simplex*, com vistas a viabilizar a identificação de casos clínicos de gastroenterite provocadas por *Shigella spp.*, visando a auxiliar os estudos epidemiológicos desenvolvidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Franciscano.

MATERIAL E MÉTODOS

CONDIÇÕES DE CULTIVO BACTERIANO

O isolado clínico de *S. sonnei* LCL-01 foi utilizado como microrganismo-teste na padronização da detecção molecular. Inicialmente, foi inoculado em ágar MacConkey e incubado por 18h a $35\pm 1^\circ\text{C}$ em aerobiose, sendo a identificação da espécie confirmada por meio do sistema API20E (Biomérieux®), assim como utilizando anticorpos polivalentes específicos (PROBAC®).

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A metodologia empregada para a extração do DNA genômico do microrganismo-teste foi baseada no método de fenol-clorofórmio (JIMÉNEZ, MCCOY; ACHÍ, 2010) com as seguintes modificações: 3-5 colônias do microrganismo-teste foram dissolvidas em 500µl de Água Milli-Q ultra-pura estéril com posterior centrifugação a 12.000 xg por 3 min., o *pellet* celular foi ressuspenso em 500µl de Tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0), 15µl de SDS 10% e 3µl de Proteinase K (20mg/ml), com posterior homogeneização em vórtex e incubação a 56°C durante 30 min. Em seguida, houve a adição de 100µl de NaCl 5M e 80µl de CTAB, seguido de homogeneização, incubação a 95°C por 5 min, adição de 500µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneização em vórtex e centrifugação a 12.000 xg por 2 min. Logo após, procedeu-se a transferência da fase aquosa para um novo tubo e adição de 500µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), centrifugação a 12.000xg por 2 min e transferência da fase aquosa novamente para um novo tubo. Para permitir a precipitação do DNA, foram adicionados 2V de etanol absoluto gelado e o mesmo resfriado a -80°C por 10 min, com posterior centrifugação a 12.000xg por 10 min e descarte do sobrenadante. Procedeu-se à etapa de lavagem do *pellet* de DNA com a adição de 500µl de etanol 70% e centrifugação a 12.000xg por 10 min, passo que foi repetido mais uma vez. Ao final da extração, o etanol residual foi descartado e os tubos submetidos à evaporação em estufa a 37°C por 15 min, com posterior hidratação do DNA em 50µl de Água Ultra-pura estéril e armazenamento a -20°C (KARANAM et al., 2008).

Para verificar a pureza do DNA resultante do processo de extração, foi utilizada a razão da absorbância em 260 e 280nm (A260/280), medida em espectrofotômetro UV-1100 (Pró-análise®). A verificação da qualidade do DNA extraído foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e visualizado em transiluminador UV.

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para confirmar a identificação molecular do isolado LCL-01, foram utilizados dois *primers* específicos para a amplificação do gene *ipaH*: IpaH1 - 5'GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATAACCGTC3' e IpaH2 - 5'GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC3'. A amplificação foi realizada em um volume total de 25µl consistindo de 0.2mM de cada dNTP, 1.5mM MgCl₂, Tampão Taq 10x (Life®), 0.2 µM de cada *primer*, 1U TaqDna polimerase e 1µl de DNA molde, em termociclador Swift Maxi (ESCOÒ). Os parâmetros de termociclagem utilizados foram os seguintes: desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguidos de 36 ciclos de 95° C por 30 seg, 60° C por 30 seg e 72° C por 1 min, com uma extensão final a 72° C por 10 min. O produto de amplificação foi então submetido à eletroforese em gel de agarose 1% contendo GelRed (Uniscience®), e fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador, em que a presença de uma banda de 619pb indica amplificação da região alvo (JIMÉNEZ, MCCOY; ACHÍ, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

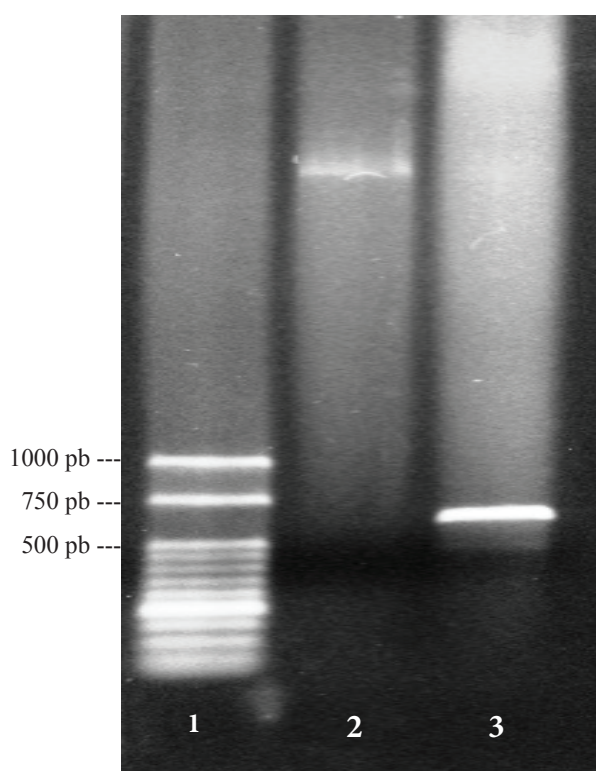
Com a crescente implantação de técnicas moleculares voltadas à identificação microbiológica, novas metodologias baseadas na amplificação de genes alvo por PCR foram desenvolvidas, levando a uma revolução nas técnicas de diagnóstico laboratorial. Porém, há a co-extração de fatores inibitórios, bem como diferenças intra e interespecies que atuam como interferentes durante a extração do DNA genômico bacteriano, assim como o elevado custo dos *kits* de extração comerciais, por vezes inviabilizando o processo de diagnóstico molecular (NOGUEIRA et al., 2004; ABRÃO et al., 2005). A extração de DNA a partir de microrganismos é realizada por diversas técnicas moleculares, nas quais a extração utilizando fenol-clorofórmio tem permitido a obtenção de DNA de melhor qualidade aliado ao baixo custo dos reagentes empregados (NOGUEIRA et al., 2004; ABRÃO et al., 2005).

Na figura 1, pode-se observar que a presença de material genético degradado foi pequena, obtendo-se uma banda de DNA genômico visível, de boa qualidade e baixas concentrações de proteínas e RNA. Na análise de amplificação do gene *ipaH* por PCR, obteve-se fragmento de 600 pares de base (pb), demonstrando que o DNA está íntegro e é confiável para análises moleculares utilizando a técnica de PCR.

A técnica de extração de DNA baseado no uso do fenol-clorofórmio associado à metodologia molecular de *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, permitiu à Angelini e colaboradores (ANGELINI et al., 2009) investigar a epidemiologia molecular de 119 cepas de *Shigella spp.* isoladas de casos de shigelose ocorridos no Estado de São Paulo, Brasil. Os autores puderam demonstrar, baseados nos resultados encontrados, a necessidade de barreiras sanitárias mais eficientes para prevenir surtos e epidemias

causadas por *Shigella spp.*, auxiliados pelas metodologias moleculares empregadas. Da mesma forma, Villalobo e Torres (1998), visando detectar a contaminação de maionese por cepas de *Shigella spp.* e *Escherichia coli* Enteroinvasora, utilizaram o método de extração de DNA por fenol-clorofórmio associado à amplificação dos genes *virA* e 16SrRNA pela técnica de multiplex-PCR, demonstrando que os métodos são altamente específicos e sensíveis na detecção dos patógenos testados. Da mesma forma, Cruz et al. (2014) acessaram a presença de genes de virulência em cepas de *Shigella spp.* por meio da extração de DNA genômico pelo método do fenol-clorofórmio associada à amplificação por PCR, e compararam com a sintomatologia da shigelose pediátrica, demonstrando forte associação entre presença de genes de virulência e sintomas da doença. Também, Sousa et al. (2013) demonstraram a prevalência de espécies de *Shigella*, suscetibilidade às drogas e fatores de virulência por meio da extração por fenol-clorofórmio e PCR em crianças com quadro diarreico hospitalizadas em Belo Horizonte, MG.

Figura 1 - Eletroforese do produto de extração e do amplicon do isolado clínico de *Shigella sonnei*.



NOTA: Gel de agarose 1% **1.** Marcador de Peso Molecular 50pb (Ludwig)
2. DNA genômico **3.** Amplicon do gene *ipaH*.

CONCLUSÃO

Dessa forma, a disponibilização de uma técnica rápida para o diagnóstico diferencial de casos de shigelose é de grande interesse para a conduta clínica. O método de extração *in-house* mostrou-se eficaz e de baixo custo, viabilizando a correta identificação do gênero *Shigella* por meio da técnica

de PCR. Essa metodologia pode auxiliar no rastreamento desse patógeno durante surtos e epidemias, assim como determinar melhores medidas de controle e erradicação.

CONFLITOS DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, M. G. et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 978-982, 2005.

ANGELINI, M. et al. Molecular epidemiology of Shigella spp strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 685-692, 2009.

BINET, R.; DEER, D. M.; UHLFELDER, S. J. Rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay. **Food Microbiology**, v. 40, p. 48-54, 2014.

CRUZ, C. B. N. da et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 9, 2014.

HALE, T. L.; KEUSCH, G. T. Shigella. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**, 4th. edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

JIMÉNEZ, K. B.; MCCOY, C. B.; ACHÍ, R. Detection of shigella in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 993-1000, 2010.

KARANAM, V. R. et al. Detection of indicator pathogens from pharmaceutical finished products and raw materials using multiplex PCR and comparison with conventional microbiological methods. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, n. 9, p. 1007-18, sep. 2008.

MARCHOU, B. [Traveller's diarrhea: epidemiology, clinical practice guideline for the prevention and treatment]. **Presse Med**, v. 42, n. 1, p. 76-81, jan. 2013.

NOGUEIRA, C. A. M. et al. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 35-38, 2004.

OGAWA, M. et al. The versatility of Shigella effectors. **Nat Rev Micro**, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2008.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. **FEMS Microbiol Lett**, v. 252, n. 1, p. 11-8, nov. 2005.

PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. J. Shigella's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 119-29, feb.-mar. 2007.

SOUZA, E. C. et al. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 31-38, 2002.

SOUSA, M. A. et al. Shigella in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 30-5, feb. 2013.

VILLALOBO, E.; TORRES, A. PCR for Detection of Shigella spp. in Mayonnaise. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1242-1245, apr. 1998.

