

A extração orgânica de DNA aumenta a sensibilidade do diagnóstico molecular das bartoneloses?

Ellen Ap. Nunes*, Amanda Roberta Almeida, Karina de Almeida Lins, Tânia Cristina Benetti Soares, Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Resumo

As bartoneloses são doenças negligenciadas, potencialmente fatais, que cursam com baixa bacteremia e seu diagnóstico exige a realização de diferentes técnicas para diminuir os falsos negativos. As análises moleculares para a investigação dessas doenças dependem da quantidade de cópias de bactéria na amostra estudada. A literatura aponta a extração orgânica como alternativa para aumentar o DNA amostral. Buscando melhorias no diagnóstico dessas doenças, será comparada a eficácia da extração do DNA por "kit" comercial com a obtida pela extração orgânica utilizando diferentes PCR para pacientes infecção.

Palavras-chave: *Bartonella*, extração de DNA, PCR

Introdução

As bartoneloses são doenças re-emergentes e negligenciadas, causadas por uma bactéria intra-eritrocitária facultativa do gênero *Bartonella*. Essas bactérias possuem crescimento fastidioso, com baixa bacteremia em humanos, apresentando sintomas graves e complicações fatais, principalmente em indivíduos imunodeficientes.

Seu diagnóstico consiste em técnicas sorológicas, microbiológicas e moleculares, as quais são aplicadas concomitantemente para evitar os resultados falsos negativos, sendo a sensibilidade do resultado molecular dependente da quantidade de cópias de bactérias. (VELHO et al, 2006)

Em situações onde a quantidade de bactérias é baixa, a extração orgânica vem sendo apontada como uma boa alternativa, pois permite aumentar o volume inicial da extração, apresentando aumento significativo de DNA por amostra, melhorando a sensibilidade diagnóstica e também mantendo a qualidade do material. (VILTROP et al, 2010)

O uso da extração orgânica não é documentado para as pesquisas de bartoneloses, assim será analisada a eficiência de seu uso para a detecção dessas bactérias fastidiosas em humanos, quando comparada com as amostras obtida pela extração com *kit* comercial.

Resultados Parciais e Discussão

O experimento foi realizado de acordo com o seguinte delineamento:

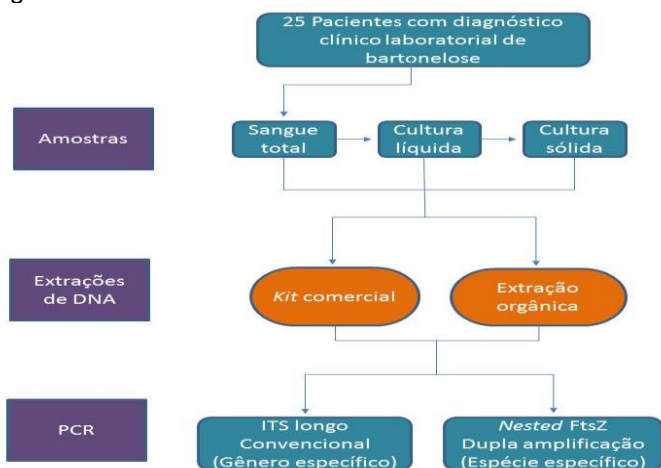


Figura 1. Resultados positivos para extração por *kit* comercial



Na extração por *kit* comercial, como esperado, encontrou-se maior sensibilidade nas culturas líquidas devido ao aumento no número de bactérias. Manteve-se um alto número de falsos negativos, sendo que, das 25 amostras positivas analisadas, apenas 16 indicaram presença de *Bartonella* spp no ITS longo e 13 no *nested*. A extração orgânica do DNA está sendo processada e os resultados das PCR serão comparados com os já obtidos.

Conclusões

Os dados já obtidos confirmam a baixa sensibilidade de cada reação isolada, mesmo utilizando diferentes amostras. Confirmada a maior sensibilidade da extração orgânica, preferencialmente no sangue total, isso representaria ganho de tempo na investigação da doença em até dois meses, além da redução dos custos no processo de diagnose. Espera-se também que haja aumento na sensibilidade em ITS longo para que outras espécies de *Bartonella* possam ser identificadas nas amostras.

¹ Velho P.E.N.F; Souza E.M.; Cintra M. L.; Moraes A. M.; Tanaka A. M. U. Diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp.: a propósito de um caso de angiomatose bacilar, An. Bras. Dermatol. 2006, vol.81 no.4 Rio de Janeiro July/Aug.

² Viltrop. T.; Krjutškova, K.; Paltab P.; Metspalu A. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction, Analytical Biochemistry. 2010, Volume 398, Issue 2, 15 March 2010, Pages 260–262