



## PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA DE *TREPONEMA PALLIDUM* ATRAVÉS DO MÉTODO DE ULTRASSOM

Alisson Messalas Vargas Faria<sup>1</sup>  
Vera Mileide Trivellato Grassi<sup>2</sup>  
Márcia Susana Nunes Silva<sup>3</sup>

### Resumo

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível que surgiu na Europa por volta do século XV sendo esta causada pela espiroqueta *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*. Ainda hoje surtos epidemiológicos de sífilis prevalecem fazendo desta doença um motivo de preocupação. O presente estudo tem como objetivo padronizar um método de extração de DNA do *T. pallidum* a partir de amostras clínicas e realizar a amplificação do DNA extraído por PCR para detectar a presença do *T. pallidum*. Para isto, a extração de DNA das amostras foi feita através da utilização de um aparelho de ultrassom. Este aparelho emite vibrações ultrassônicas o que acaba por romper a parede celular bacteriana. Até o momento foi extraído DNA de 25 amostras clínicas.

Palavras-chave: Sífilis; DST; PCR;

### INTRODUÇÃO

A sífilis surgiu subitamente na Europa, como uma grande pandemia, no final do século XV apresentando as seguintes manifestações clínicas: lesões na pele (principalmente na região bucal ou genital), porém em casos mais avançados podem ocorrer complicações neurológicas e cardíacas (CASTRO, 2004). O agente etiológico da sífilis é a bactéria *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, pertence à ordem *Spirochaetales* da família *Treponemataceae* (FERREIRA et al., 2000). A principal população atingida pela sífilis é a população sexualmente ativa. Isso se deve ao fato de existirem basicamente duas formas de infecção sífilítica: a sexual e a por transmissão vertical, ou seja, da gestante para o feto (CRUZ et al., 2010; GOH et al., 2005).

Quanto à epidemiologia, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que aproximadamente 12 milhões de novos casos de sífilis ocorrem anualmente em todo mundo, destes cerca de quatro milhões ocorrem na África subsaariana (CENTURION-LARA et al., 2006). Durante o período de 2010 a junho de 2016, foi notificado no SINAN um total de 227.663 casos de sífilis adquirida no Brasil, dos quais 20,5% pertenciam à região Sul. A taxa de detecção no Brasil em 2015 foi de 42,7 casos de sífilis adquirida/100 mil hab., taxa superada pelas regiões Sul (75,3 casos/100 mil hab.) e Sudeste (55,7 casos/100 mil hab.). Quanto aos estados, a taxa de detecção mais elevada, em 2015, foi observada no Rio Grande do Sul (111,5 casos/100 mil hab) (BRASIL, 2016).

---

<sup>1</sup> Graduando em biomedicina- Bolsista FAPERGS - Alissonfaria27@hotmail.com

<sup>2</sup> Mestranda no PPGBiosáude – Vmgrassi@hotmail.com

<sup>3</sup> Professora do curso de graduação de Biomedicina/Farmácia e PPGBiosáude – Marcia\_Susana@hotmail.com

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de amplificação de uma região alvo do DNA que se baseia num ciclo repetitivo de três reações que ocorrem em diferentes temperaturas e em diferentes tempos. Para isso são necessários um par de primers, a enzima *Taq* DNA-polimerase e os desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dCTP, dGTP, dTTP, dATP) (EISENSTEIN, 1990) para produzir um amplicon de 377 pares de base (pb). Este estudo tem como objetivo padronizar um método de extração de DNA do *T. pallidum* a partir de amostras clínicas e realizar a amplificação do DNA extraído por PCR para detectar a presença do *T. pallidum*.

## **METODOLOGIA**

Foram utilizadas amostras de soros de pacientes com resultado conhecido nos testes sorológicos para sífilis (VDRL e ELISA). A extração de DNA das amostras foi realizada conforme protocolo adaptado de MOREIRA et al (2010). Resumidamente, foram separados 200 µL de soro em microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 500 µL de tampão PBS (tampão fosfato PH = 6,8) com posterior agitação no vórtex e centrifugação de 10 minutos a 3.000 rpm. Em seguida, foi retirado e desprezado o sobrenadante. No eppendorf com sedimento, foram adicionados 100 µL de água ultrapura e passado os tubos no vórtex até desmanchar o botão. Por conseguinte, foi levado ao banho seco por 20 min a 95°C. Após, foi colocado no banho de ultrassom durante 10 minutos a 30°C e centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. Em seguida, retirou-se o sobrenadante (onde está o DNA) para novos tubos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De um total de 50 amostras, até o momento foram extraídas 20/25 amostras com resultado negativo e 5/25 amostras com resultado positivo nos exames sorológicos dos pacientes.

## **CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este trabalho tem como finalidade padronizar um método de extração de DNA através do método de ultrassom, visto este ser simples e prático. Os próximos passos da pesquisa incluem finalizar a extração das amostras, tanto positivas quanto negativas, e submetê-las à amplificação por PCR.

## **REFERÊNCIAS**

CASTRO, Rita. Contribuição para o estudo de infecção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*: resposta serológica, diagnóstico molecular e genotipagem. 2004.

FERREIRA, W. F. C; Sousa, J. C. F. (2000). **Microbiologia**. In: W.F.C. Ferreira, J.C.F. Sousa (Eds). Vol. 2; *Treponema*. (pp.259-269). LIDEL, Lisboa.

SINGH, Ameeta E.; ROMANOWSKI, Barbara. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 2, p. 187-209, 1999.

CRUZ, Adriana R. et al. Secondary syphilis in Cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 5, p. e690, 2010.

GOH, Beng T. Syphilis in adults. **Sexually transmitted infections**. 81 (6):448-52. 2005.

CENTURION-LARA, Arturo et al. Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3377-3380, 2006.

BRASIL. Ministério da saúde, 2016. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico**. Vol. 47; N° 35, 2016. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/outubro/31/2016\\_030\\_Sifilis-publicacao2.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/outubro/31/2016_030_Sifilis-publicacao2.pdf)>. Acesso em: 25Mai. 2017, 18:08:52

EISENSTEIN, B.I. The Polymerase Chain Reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v.3, p.178-183, 1990