



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE NEMATÓIDES UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR

*Gabriella Magarelli*¹, *Juciê R. C. V. Silva*², *Juaci V. Malaquias*³, *Elida G. Campos*⁴, *Vilmar Gonzaga*⁵, *Dilson da Cunha Costa*⁶, *Vera Lúcia P. Polez*⁷,

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil, gmagarelli@cenargen.embrapa.br

²Universidade de Brasília, Brasília – DF, Brasil,

³Embrapa Cerrados, Planaltina – DF, Brasil, juaci.malaquias@cpac.embrapa.br

⁴Universidade de Brasília, Brasília – DF, Brasil, elida@unb.br

⁵Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil, vilmar@cenargen.embrapa.br

⁶Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil, dilson@cenargen.embrapa.br

⁷Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil, vpolez@cenargen.embrapa.br

Resumo: Foi objetivo do trabalho propor as bases teóricas e práticas para uma validação *in-house* da metodologia de determinação molecular de nematóides do gênero *Ditylenchus* por PCR convencional. Os resultados da validação demonstraram que os oligonucleotídeos específicos para a espécie *D. dipsaci* apresentaram baixo desempenho quanto à sensibilidade, especificidade e eficiência.

Palavras chave: validação, PCR, nematóides

1. INTRODUÇÃO

As exigências para as ações fitossanitárias agregam valor aos produtos agrícolas, e também promovem a confiança do consumidor. A identificação rápida e acurada de pragas inteceptadas é fundamental para a adoção de medidas de contenção. Dentre as principais pragas agrícolas estão os nematóides, que são parasitas de plantas que causam graves prejuízos na produção de diversas culturas. As principais barreiras para a identificação dos nematóides são: a presença de poucos caracteres morfológicos distintivo; a dificuldade em identificar a espécie em diferentes estágios de desenvolvimento; a dificuldade em identificar a espécie a partir de um único indivíduo ou mesmo em organismos mortos. Neste caso, uma importante estratégia é a utilização de métodos que utilizam o DNA para a identificação rápida e acurada desses nematóides de expressão quarentenária após os marcadores específicos terem sido padronizados.

O PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction - Reação da Cadeia Polimerase) é um método de amplificação de DNA sem o uso de organismo vivo (*in vitro*). A metodologia baseia-se no processo de replicação de DNA por enzimas polimerizadoras presentes em células (*in vivo*) e na capacidade da biomolécula de renaturação do DNA. As principais vantagens da técnica são: rapidez, bom limite de detecção, seletividade, sensibilidade, e potencial para automação. Entretanto os métodos baseados em PCR são mais caros quando comparado com os métodos convencionais e ainda, por ser um processo analítico multi-etapas a incidência de erros e a contaminação é acentuada. A falta de requisitos e regulamentos padronizados para estas técnicas dificulta o controle de variáveis intervenientes,

comprometendo a qualidade dos resultados. Assim, a validação de métodos baseados em PCR surge como uma necessidade para a geração de resultados confiáveis e um desafio para a metrologia, pois há muitas dificuldades em estipular medições em nível de gene, proteínas e células.

O método de PCR para a detecção de patógenos é baseado em ensaios qualitativos, cuja resposta é a presença ou ausência do analito detectado, a partir de certa quantidade de uma amostra. Para validação do método baseado em PCR convencional são usados conceitos importados de ensaios microbianos, onde parâmetros de desempenho podem ser utilizados, atestando assim a veracidade da metodologia [1]. Estes parâmetros de desempenho são: 1) Valor preditivo positivo: proporção de amostras verdadeiramente positivas corretamente diagnosticadas; 2) Valor preditivo negativo: proporção de amostras verdadeiramente negativas corretamente diagnosticadas; 3) Razão de falsos-positivos: probabilidade de uma amostra negativa ser classificada como positiva pelo método; 4) Razão de falsos-negativos: probabilidade de uma amostra positiva ser classificada como negativa pelo método; 5) Especificidade: habilidade que um método tem de detectar amostras verdadeiramente negativas; 6) Sensibilidade: habilidade que um método tem de detectar amostras verdadeiramente positivas; 7) Eficiência: capacidade do método em detectar o maior número de verdadeiros positivos e negativos; 8) Acordância: chance (porcentagem) de dois materiais idênticos analisados pelo mesmo laboratório, sob as mesmas condições chegarem ao mesmo resultado.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo propor as bases teóricas e práticas para uma validação *in-house* da metodologia utilizada para a determinação de nematóides do gênero *Ditylenchus* por PCR convencional.

2. MÉTODOS

Preparo do DNA de referência: O DNA de referência foi preparado a partir de amostras de nematóides recebidas na EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os nematóides foram separados e classificados a partir de métodos morfológicos por especialistas da área. Logo após, o DNA genômico de cada indivíduo foi extraído utilizando o kit “DNEASY® BLOOD & TISSUE” da QIAGEN. As

etapas posteriores envolveram a purificação das bandas detectadas no PCR, clonagem do produto de amplificação e sequenciamento. As sequências da região 18S-ITS-5,8S-ITS2-28S das espécies *D. dipsaci* (N=7) e *D. africanus* (N=7) foram clonadas e sequenciadas. As sequências foram obtidas a partir de um único exemplar por extração de DNA.

Deteção e identificação: A deteção e identificação do DNA dos nematóides foram realizadas a partir de oligonucleotídeos que amplificam a região ITS dos ribossomos dos nematóides encontrados na literatura [2e 3]. Foram testados 2 pares de oligonucleotídeos: TW81/AB28 – Oligonucleotídeo universal para a deteção de nematóide; DdpS2/rDNA2 – Oligonucleotídeo específico para a deteção de *Ditylenchus dipsaci* [3].

PCR tradicional: Os reagentes utilizados tinham grau de pureza necessário para reações de PCR. Proporções de reagentes foram otimizadas antes do início da validação. A reação de PCR foi realizada utilizando-se água deionizada q.s.p. (25µL), tampão 1X, MgCl₂ (1mM), dNTPs (6µmol), iniciador forward e reverse (7µmol de cada), 1 unidade de Taq e o DNA-alvo. Termociclador Eppendorf Mastercycler® e MJ Research PTC-100. Análises das amplificações foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%. O produto do PCR foi visualizado por eletroforese em um transiluminador Bioagency T26M com auxílio de fotodocumentador UVP GDS8000.

Controles na amplificação: Para os oligonucleotídeos TW81/AB28: Controle Positivo: DNA de referência de todas as espécies de *Ditylenchus*; Controle Negativo: Veículo; Para Oligonucleotídeos DdpS2/rDNA2: Controle Positivo: DNA de referência de *Ditylenchus dipsaci*; Controle Negativo: DNA de referência de *Ditylenchus africanus*;

Validação: Parâmetros de desempenho como valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de falsos-positivos, razão de falsos-negativos, sensibilidade, especificidade, eficiência e acordância foram calculados para julgamento da aceitação do método e rigor da validação segundo referência da literatura[1].

O processo de validação foi realizado inicialmente com 14 DNA de referência (7 da espécie *D. dipsaci* e 7 da espécie *D. africanus*) e com dois analistas. Todos os DNAs de referência foram submetidos à amplificação pelos oligonucleotídeos testados e os dados gerados foram avaliados (Tabela 1 e 2).

3. RESULTADOS

O oligonucleotídeo universal TW81/AB28 mostrou razoável desempenho em relação à sensibilidade, especificidade e eficiência de amplificação. O oligonucleotídeo específico para a espécie *D. dipsaci* (DdpS2/rDNA2) mostrou baixas sensibilidade, especificidade e eficiência, não sendo indicado a utilização do mesmo (Tabelas 1 e 2). O baixo desempenho dos oligonucleotídeos pode estar relacionado com os seguintes fatores: inibidores da reação de PCR presentes na amostra de DNA template, presença de polimorfismo na região alvo dos oligonucleotídeos ou erros dos analistas. Outro fator importante é a variabilidade intra e interespecífica encontrada entre a espécie *D. dipsaci* (diferenças entre as raças).

Tabela 1 – Desempenho obtido com a validação dos métodos baseados em PCR para o analista 1

Parâmetro	TW81/AB28	DdpS2/DNA2
Valor Preditivo Positivo (%)	100,00	42,86
Valor Preditivo Negativo (%)	41,67	22,22
Razão de Falsos Positivos (%)	0,00	66,67
Razão de Falsos Negativos (%)	20,00	70,00
Sensibilidade (%)	80,00	30,00
Especificidade (%)	100,00	33,33
Eficiência (%)	82,50	31,25
Acordância (%)	56,92	67,50

Tabela 2 – Desempenho obtido com a validação dos métodos baseados em PCR para o analista 2

Parâmetro	TW81/AB28	DdpS2/DNA2
Valor Preditivo Positivo (%)	100,00	57,14
Valor Preditivo Negativo (%)	50,00	55,56
Razão de Falsos Positivos (%)	0,00	37,50
Razão de Falsos Negativos (%)	15,38	50,00
Sensibilidade (%)	84,62	50,00
Especificidade (%)	100,00	62,50
Eficiência (%)	86,67	56,25
Acordância (%)	59,54	60,00

5. CONCLUSÃO

O presente estudo forneceu importantes informações teóricas e práticas referentes à validação de métodos qualitativos para ensaios biológicos. As limitações da especificidade dos oligonucleotídeos para a identificação molecular da espécie quarentenária *D. dipsaci* e *D. africanus* indica a necessidade de novas estratégias para o diagnóstico molecular destas pragas tais como: a utilização de outra região alvo ou a utilização de PCR quantitativo (real time) com o uso de sondas mais específicas.

AGRADECIMENTOS

EMBRAPA CENARGEN, CNPq, MAPA, UnB

REFERÊNCIAS

- [1] FREITAS, E. I. D. *et al.* “Validação de métodos alternativos qualitativos na deteção de patógenos alimentares”. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 11, n. 4, p.1073-1083, 2006.
- [2] ZHENG JINGWU, S., S. A., WAEYENBERGE, L., MOENS, M. “Molecular characterisation of Chinese *Heterodera glycines* and *H. avenae* populations based on RFLPs and sequences of rDNA-ITS regions”. *Russian Journal of Nematology* [S.1.], v. 8, n. 2, p. 109-113, 2000.
- [3] KERKOU, M. *et al.* “Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions”. *Eur J Plant Pathol* 118:323–332, 2007.