

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE MICOBACTÉRIAS**Mariane S. Dal Pizzol¹, Adriana M. G. Ibelli², Beatris Kramer², Virgínia S. Silva³
e José R. Pandolfi³**¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado - Campus Concórdia, estagiário da Embrapa Suínos e Aves, bolsista CNPQ/PIBIC²Analista na Embrapa Suínos e Aves³Pesquisador(a) na Embrapa Suínos e Aves, jose.pandolfi@embrapa.br**Palavras-chave:** *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium aviumhominissuis*, extração de DNA genômico.**INTRODUÇÃO**

As micobacterioses, infecções causadas por bactérias do gênero *Mycobacterium*, podem causar grande impacto na cadeia produtiva de suínos (1), que são susceptíveis a infecções por micobactérias, tanto do Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), no qual o *M. aviumhominissuis* está classificado; quanto àquelas do complexo *M. tuberculosis* (CMTB), que inclui o *M. bovis*. A linfadenite granulomatosa, causada por agentes do MAC é mais prevalente na suinocultura tecnificada do que a tuberculose animal, causada por *M. bovis* (2). As micobactérias do MAC causam prejuízos econômicos por produzirem lesões macroscópicas indistinguíveis daquelas apresentadas na tuberculose, resultando em condenação total ou parcial das carcaças acometidas (3). A tuberculose animal é um problema importante para a pecuária e um risco à saúde pública face ao seu aspecto zoonótico, posto que afeta bovinos, diversas outras espécies, tanto domésticas como silvestres, e também o ser humano (4,5,6). As micobactérias possuem crescimento lento, levando até 18 horas para sua duplicação, de modo que o diagnóstico laboratorial pode ser demorado. Além disso, sua parede celular, rica em lipídios, possui ácidos micólicos, tornando-as álcool-ácido-resistentes e hidrófobas, propiciando sua sobrevivência em condições ambientais adversas (4). Portanto o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico rápidas e eficazes, como as moleculares, é primordial. A extração de DNA puro e em quantidade suficiente é importante para o sucesso das técnicas moleculares. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar protocolos de extração de DNA genômico de micobactérias encontrados na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas bactérias do CMTB (*Mycobacterium bovis*- INCQS – 00062) e do MAC (*Mycobacterium aviumhominissuis*). As cepas foram cultivadas em meio líquido 7H9 a 37° por 28 dias. Foram feitas cinco repetições de cada micro-organismo para cada um dos protocolos avaliados. As alíquotas foram padronizadas através da homogeneização dos cultivos, distribuição de 1 mL por microtubo e centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e o descarte do sobrenadante. Então os *pellets* de micobactérias foram congelados (-20°C) até o momento do uso. Foram avaliados 6 protocolos de extração: (A) Protocolo Rápido de Extração Limpa de DNA (7), caracterizado por termólise, purificação com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol; (B) Protocolo Lento de Extração Limpa de DNA(8), empregando métodos físicos (mecânico e calor), enzimáticos (lisozima e proteinase K) e químico (SDS 10%) para a ruptura das células, NaCl 5M para recuperação do DNA, purificação com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol; (C) Extração de DNA utilizando apenas método físico (fervura/congelamento) e químico (Triton 1%)(9) seguido de precipitação com etanol; (D) Extração de DNA por método físico (fervura/congelamento) e químico (Triton 1%), com purificação empregando fenol/clorofórmio e precipitação com etanol (9); (E) Extração por técnica de termólise (método físico) seguida de precipitação com etanol(10) e (F) Extração por termólise (método físico) com purificação empregando fenol/clorofórmio e precipitação com etanol (10). Após a extração do DNA, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro Biodrop, e verificadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio por 1,5 h a 90 V, para a avaliação da sua quantidade e qualidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação entre os protocolos testados foi feita através das médias dos valores das amostras de cada espécie de micobactéria em cada protocolo testado. Os resultados podem ser observados na Tabela 1, que apresenta as quantidades e as razões de qualidade das amostras de DNA extraídas. Assim, o protocolo que obteve maior concentração de DNA (ng/uL) foi o B e o protocolo que propiciou a recuperação de DNA em menor concentração foi o E. Em relação à qualidade do DNA, neste experimento nenhum protocolo apresentou resultado igual ou superior a 1,8, sendo que, em amostras puras, as razões 260/280nm e 260/230nm devem estar acima de 1,8 e 2,0 respectivamente (11,12). Observou-se a presença de RNA em grande quantidade na eletroforese em todas as amostras. Apesar das semelhanças entre os protocolos A, D e F, nota-se grande diferença na quantidade de DNA obtida, bem menor no protocolo A quando comparada aos outros dois, que apresentaram resultados equivalentes. Os protocolos D e F são, respectivamente, variações do C e do E aos quais foi adicionado um passo de purificação empregando fenol/clorofórmio e, a despeito de ocorrerem perdas na recuperação da fase aquosa durante o passo de purificação, observou-se a obtenção de maior quantidade de DNA nos métodos variantes, quando comparados aos originais. Este fato indica a importância do passo de purificação, que permitiu a recuperação de DNA em maior quantidade e com melhor qualidade, como se observa na coluna da média

das razões 260/230. O fato de que nenhum protocolo conseguiu obter amostras puras, aponta a necessidade de aprimoramento dos mesmos, seja através da adoção de outras estratégias de purificação ou do emprego de etapas adicionais de purificação.

CONCLUSÕES

O método B, que emprega estratégias físicas, enzimáticas e químicas para a ruptura das células e ainda um passo de purificação que utiliza fenol/clorofórmio, foi aquele que propiciou a recuperação de maior quantidade de DNA. Nenhum dos métodos foi capaz de isolar DNA com baixa quantidade de impurezas, demonstrando então que etapas de purificação adicionais devem ser adotadas.

REFERÊNCIAS

1. RUSSI, L. S. et al. **Avaliação** de métodos para extração de DNA de culturas de micobactérias. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE CORTE, 5., 2009, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009.
2. SIRCILLI, M. P.; OLIVEIRA, R. A.; BALLIAN, S. C.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, V. S.; MORÉS, N.; CHIMARRA, E.; LEÃO, S. C. Epidemiologia e controle das micobacterioses no sul do Brasil. Estudo molecular dos isolados: identificação dos agentes presentes nas lesões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9. **Anais...**, p.221, Belo Horizonte, 1999.
3. MARTINS, L. S., LEÃO, S. C., MORÉS, N., SILVA, V. S., DUTRA, V., PINHEIRO, S. R., BALIAN, S., HOMEM, V. S. F., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologia e controle das micobacterioses em suínos no Sul do Brasil - estimativa do impacto econômico. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.1, p.39-43, jan./mar., 2002.
4. QUINN P.J., et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1ª edição. Artmed, Porto Alegre, 512p. 2005.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bovine Tuberculosis**. IN: OIE terrestrial Manual. Chap. 2.4.7, 16p. 2009. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf>. Acesso em 26/08/2015.
6. GOOD, M., DUGNAN, A. **Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication**. **Vet Med Int.**, v. 2011, 11 p., ID:410470, 2011.
7. SANTOS, A.C.B. **Genotipagem de isolados de M. tuberculosis provenientes de comunidades indígenas e não indígenas do MS**. 2011. Nº páginas. Dissertação– Programa de Pós-graduação em XX, Universidade XX.
8. Institute Pasteur – Paris, France. **Molecular tools and epidemiology of tuberculosis course** –Abril de 2005.
9. CLARRIDGE, J. E., SHAWAR, R. M., SHINNICK, T. M., PLIKAYTIS, B. B. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 8, p. 2049-56, 1993.
10. PANDOLFI, J. R. **Otimização da técnica de MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) para o estudo epidemiológico de pacientes com tuberculose**. 2006. 84f. Doutorado – Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista.
11. SAFFACHE, F. **Comprehensive DNA quantification**. GEN. Omics tutorial. v.34, n.21, 2 p., 2014.
12. THERMO SCIENTIFIC. **260/280 and 260/230 ratios**. T009 – Technical Bulletin – Nanodrop 1000&8000. Disponível em <<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0CCcQFjACahUKEwim7e71p8nHAhWHC5AKHRmNCIs&url=http%3A%2F%2Fwww.nanodrop.com%2Flibrary%2FT042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf&ei=gjfvAalDleXwASZmqLYCA&usg=AFQjCNFauwqaySK8aYTVnnfANVZjyyaDzw&sig2=lemPK2AMwMEc9M0j22DR0g>>. Acesso em 26/08/2015.

Tabela 1. Quantidade e qualidade do DNA obtido nos diferentes protocolos de extração testados.

Protocolo/micobactéria	Média de concentração (ng/uL)	Média 260/230*	Média 260/280**
(A) BCG	121,92	1,54	1,45
(A) Mah	168,10	1,73	1,49
(B) BCG	1.221,34	1,53	1,46
(B) Mah	1.496,58	1,49	1,44
(C) BCG	156,18	0,19	0,8
(C) Mah	141,80	0,25	1,07
(D) BCG	927,26	1,64	1,53
(D) Mah	586,31	1,71	1,64
(E) BCG	20,43	0,37	1,46
(E) Mah	68,81	0,28	1,30
(F) BCG	509,74	1,58	1,48
(F) Mah	767,98	1,69	1,49

*Valores inferiores a 2,0 indicam contaminação por reagentes como fenóis, peptídeos, carboidratos ou compostos aromáticos (11,12).

**Valores inferiores a 1,8 podem indicar a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvem a luz no comprimento de onda de 280nm ou em comprimentos de ondas próximos a ele (11,12).