

ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium tuberculosis* DE AMOSTRA CLÍNICA PELA COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

¹ Aluna do curso de graduação de Biomedicina – Bolsista CNPq – clmorais.fran@gmail.com

² Aluna de mestrado do programa PPGBiosaúde – Bolsista CNPq – grazilbello@gmail.com

³ Professora do curso de graduação de Biomedicina/Farmácia e PPGBiosaúde – mrossett@terra.com.br

Morais, F.C.L.¹ e Bello, G.L.²

Rossetti, M.L.³

ULBRA, Canoas - RS

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença crônica, com altos índices de mortalidade. A padronização da técnica de extração de DNA tem grande importância, auxiliando no desenvolvimento e padronização de um teste. A técnica de extração através de beads-magnéticas é fundamentada na interação do DNA com partículas magnéticas revestidas de sílica. A técnica de extração por resina de sílica é baseada na interação da sílica com grupamentos do DNA que causam ligações reversíveis, permitindo a separação do mesmo de outras moléculas. A extração de DNA por ultrassom consiste no rompimento da parede celular bacteriana pela emissão de vibrações ultrassônicas. Este trabalho foi realizado visando a comparação de três técnicas de extração DNA, para isolar DNA de *M. tuberculosis* de amostras clínicas.

Objetivo

Padronização da extração de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* de amostras clínicas.

Metodologia

Foi realizado um pool com 10 amostras negativas para tuberculose, posteriormente foram contaminadas com *Mycobacterium Bovis* BCG, e divididas em 10 alíquotas. As amostras foram centrifugadas e ressuspensas em TE 1X até atingir o volume de 1,5 mL. Após divididas em três alíquotas de volume igual. Cada alíquota foi processada pelas três técnicas.

A extração de DNA por sílica foi realizada com os reagentes componentes do kit DETECT-TB (Labetest. MG).

A extração de DNA através de BEADS-MAGNÉTICAS foi realizada utilizando reagentes que compõem um protótipo de kit de extração de DNA da empresa Ampligenix (MG). A extração de DNA por ULTRASSOM utilizou o protocolo adaptado de SCHMID, 2014.

O DNA purificado das amostras foi amplificado por PCR convencional, utilizando o kit DETECT-TB que amplifica um fragmento de 245 pb com primers específicos da região de DNA (IS6110). Foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Resultados

Foram analisadas 10 amostras positivas com cada técnica.

Todos os 30 DNAs extraídos foram amplificados e a intensidade do produto de DNA amplificado foi comparado.

Os produtos de amplificação dos DNAs extraídos por sílica foram visualizados como uma banda forte em todas as amostras. Os DNAs extraídos pelo método de BEADS-MAGNÉTICAS apareceram como bandas no gel de agarose, porém em uma amostra a banda estava fraca (conforme figura abaixo). Pelo método de ULTRASSOM, em uma amostra a banda estava bem fraca, em comparação com o método das BEADS-MAGNÉTICAS, e a outra amostra não apareceu banda (conforme figura abaixo).

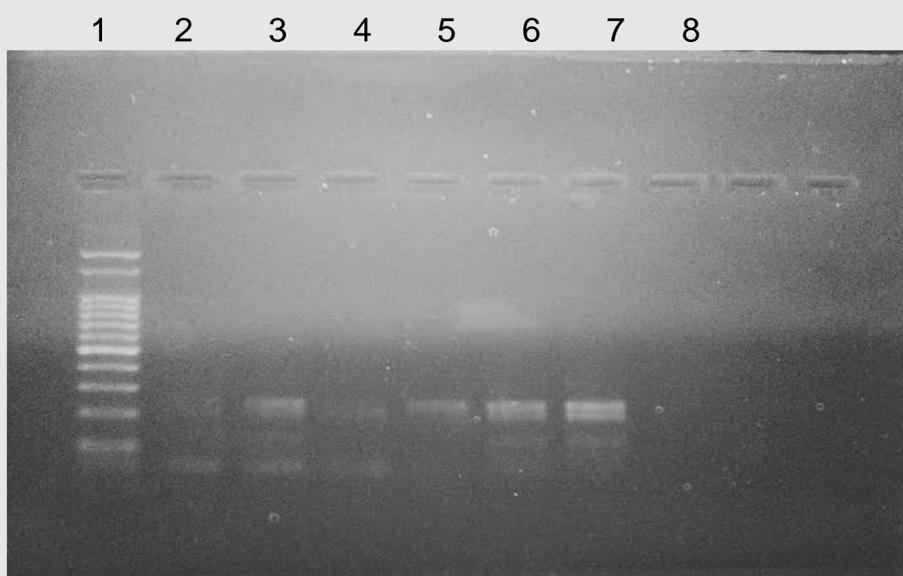


Figura. Eletroforese em gel de agarose 1,5% - de produto amplificado de duas amostras. 1 – Marcador 100 pb. 2 – Controle Positivo (DNA de BCG). 3 e 6 – Amostras extraídas por sílica, com o kit DETECT-TB. 4 e 7 – Amostras extraídas através de beads-magnéticas. 5 e 8 – Amostras extraídas por ultrassom.

Conclusão

Os resultados iniciais mostraram que o método de extração que utiliza sílica para purificar o DNA foi o que recuperou uma concentração de DNA maior em todas as amostras. Ainda será realizado o teste com outras amostras com concentração conhecida e amostras negativas afim de confirmar a técnica mais adequada.

Referências

BRASIL, Ministério da Saúde, 2015. **Secretária de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11045&Itemid=674>. Acessado em: 10 de Agosto de 2016.

MICHELON, C.T. et. al. **Colorimetric Microwell Plate Reverse-Hybridization assay for mycobacterium tuberculosis detection**, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537680>>. Acessado em: 08 de Agosto de 2016.

SCHMID, KB. **Comparação de suas metodologias moleculares para o diagnóstico de tuberculose**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2014.

Aprovado pelo comitê de ética (CEP ULBRA) sob o n° de registro:
2011-340H.

Apoio financeiro: CNPq, FEPPS e ULBRA.