

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium tuberculosis* DE AMOSTRA CLÍNICA

Morais, Franciele C.L.¹; Bello, Grazielle Lima²; Rossetti, Maria Lúcia³.

¹Graduação de Biomedicina; ²Mestrado do programa PPGBiosaúde; ³Professor do curso de graduação de Biomedicina/Farmácia e PPGBiosaúde.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença crônica, infecciosa e transmissível, com altos índices de mortalidade. É estimado um número de 4.400 mortes por dia no mundo por TB (OMS, 2015). 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 que permitem 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. O método selecionado para extrair DNA presente na amostra clínica é um fator relevante, podendo influenciar na acurácia das técnicas de amplificação. Este trabalho foi realizado visando a comparação de três técnicas de extração DNA, para isolar DNA de *M. tuberculosis* de amostras clínicas.

Metodologia

A extração de DNA por sílica foi realizada com os reagentes componentes do kit DETECT-TB (Labtest. 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 realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Resultados

Os produtos de amplificação do DNA extraído por sílica foram visualizados como uma banda forte em todas as amostras.

Os produtos de amplificação dos DNAs extraído pelo método de BEADS-MAGNÉTICAS apareceram como bandas no gel de agarose, porém em uma amostra a banda estava fraca (conforme figura ao lado).

Os produtos amplificados dos DNAs extraídos pelo método de ULTRASSOM, também apareceram como bandas no gel de agarose, porém em uma amostra a banda estava bem fraca, em comparação com o método das BEADS-MAGNÉTICAS, e a outra amostra não apareceu banda (conforme ao lado).

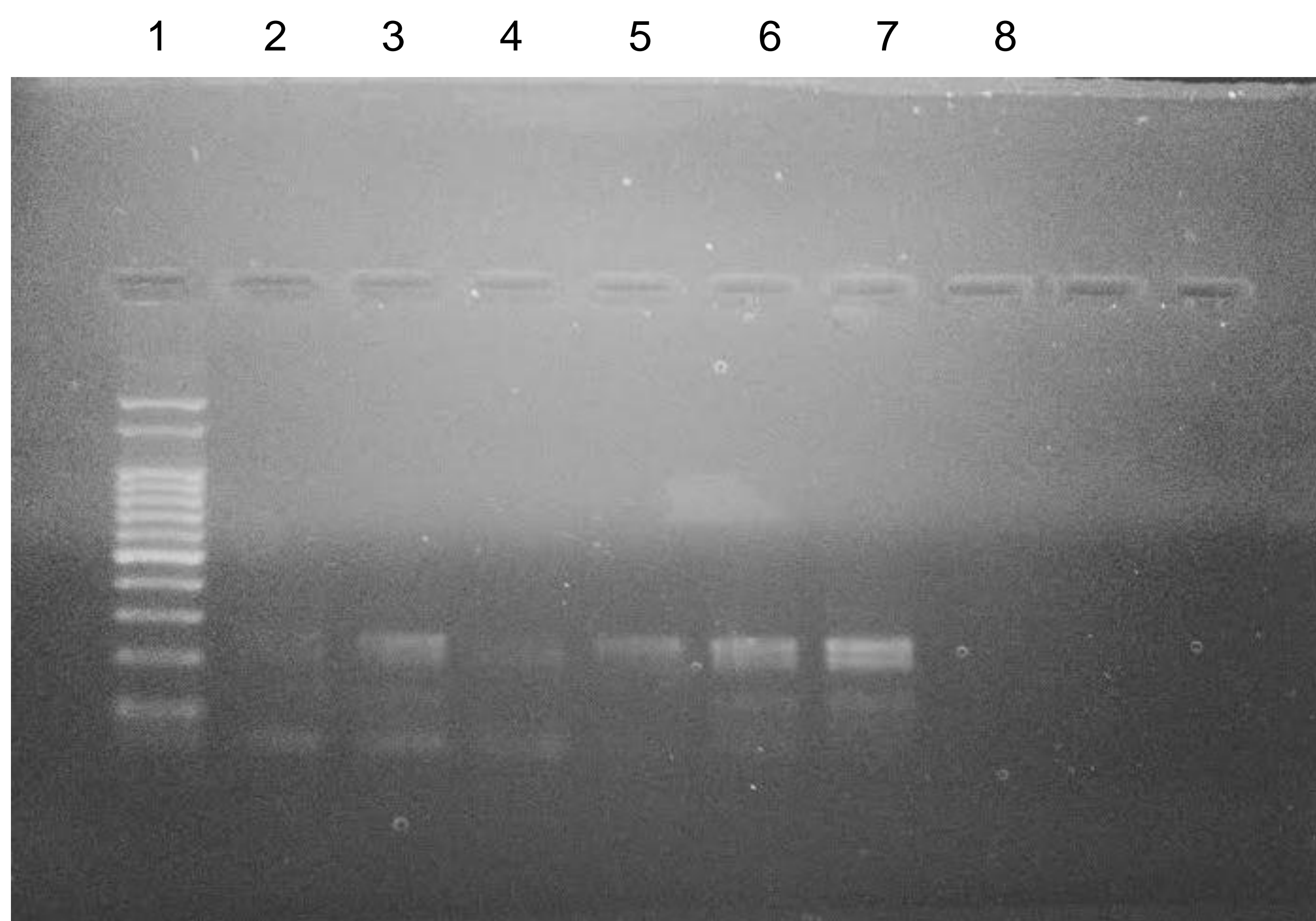


Figura. Eletroforese em gel de agarose 1,5% - de produto amplificado de duas amostras. 1 – Marcador 100pb. 2 – Controle Positivo (DNA de BCG). 3 e 6 – Amostras extraídas por sílica, com o kit DETECT-TB. 4 e 7 – Amostras extraídas através de beads-magnéticas. 5 e 8 – Amostras extraídas por ultrassom.

Conclusão

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

Referências

- BRASIL, Ministério da Saúde, 2015. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11045&Itemid=674>. Acessado em: 25 de maio 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: 28 de maio de 2016.
- SCHMID, K.B. **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.