MARIA CAROLINA GUIDO

**Detecção de DNA de *Brucella abortus* pela PCR em leite
bubalino experimentalmente contaminado pela amostra 1119-3**

São Paulo

2003

MARIA CAROLINA GUIDO

**Detecção de DNA de *Brucella abortus* pela PCR em leite
bubalino experimentalmente contaminado pela amostra 1119-3**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor junto a Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo

2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1240 Guido, Maria Carolina
FMVZ Detecção de DNA de *Brucella abortus* pela PCR em leite
bubalino experimentalmente contaminado pela amostra
1119-3 / Maria Carolina Guido. – São Paulo : M. C. Guido,
2003.

46 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. PCR. 2. Búfalos. 3. Leite. 4. Brucelose animal.
I. Título.

Dedico esse trabalho:

Aos meus grandes tesouros, meu marido Edú, e meus filhos Vitor e Heitor, que sempre me apoiaram mesmo estando ausente por muitas vezes.

À minha mãe Dirce, a grande responsável por eu ter chegado até aqui, companheira e amiga, essa vitória também é dela.

AMO VOCÊS!!!!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida, pois, sem Ele não teria encontrado forças para concluir esse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto pela confiança, compreensão e apoio, quem me estendeu a mão e me auxiliou nessa fase importante da minha formação.

A Adriana amiga e companheira, quem me ensinou os primeiros passos na biologia molecular, sem a qual, esse trabalho não teria sido realizado. Muito obrigada hoje e sempre.

Ao Professor Dr. Leonardo José Richtzenhain por permitir o desenvolvimento desse trabalho no Laboratório de Biologia Molecular do VPS e nortear nossos caminhos.

Ao Professor Dr. Renato Campanarut Barnabé, um dos maiores incentivadores da pós-graduação da FMVZ-USP, professor querido, honesto e batalhador, um dos responsáveis por eu ter escolhido a carreira acadêmica.

A Alessandra e a Nanci, amigas sempre presentes, sempre dispostas a ajudar e nos encorajar.

A Lara, ao Leandro, ao Henrique companheiros de laboratório, por nossas horas de descontração.

As minhas amigas e colegas de trabalho da UNIABC, Cibele Carvalho, Maria Carla, Cynthia Carpigiani, e Regina Vianna, sempre incentivadoras e com palavras de carinho nas horas mais difíceis.

Ao Professor Dr. Pietro Sampaio Baruselli, um dos maiores incentivadores da Bubalinocultura Brasileira e aos seus orientados, companheiros de pós-graduação.

Ao Renato Amaral pela ajuda indispensável na aquisição do leite de búfala para realização deste experimento.

A Profa. Dra. Arlete Dell' Porto a responsável por eu um dia ter descoberto o encanto que é trabalhar com búfalos.

Aos meus alunos, que contribuíram muito para o meu aprimoramento.

Às “meninas” da biblioteca, sempre dispostas a ajudar com carinho e paciência.

*Quando tiver algum problema, faça alguma coisa!
Se não puder passar por cima, passe por baixo, passe através,
dê a volta, vá pela direita, vá pela esquerda.
Se não puder obter o material certo, vá procurá-lo.
Se não puder encontrá-lo substitua-o.
Se não puder substituí-lo, improvise.
Se não puder improvisar, inove.
Mas acima de tudo, faça alguma coisa!!
Há dois gêneros de pessoas que nunca chegam a lugar nenhum:
as que não querem fazer nada e as que só inventam desculpas.*

Anônimo

RESUMO

GUIDO, M. C. Detecção de DNA de *Brucella abortus* pela PCR em leite bubalino experimentalmente contaminado pela amostra 1119-3. [Detection of *Brucella abortus* DNA by PCR in spiked buffalo milk with *B. abortus* strain 1119-3]. 2003. 46 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Com o objetivo de se aperfeiçoar a PCR para detecção de *Brucella* spp. em leite bubalino, foram estudados diferentes protocolos de extração de DNA em leite bubalino experimentalmente contaminado com *Brucella abortus* amostra 1119-3. Esses protocolos basearam-se na utilização de isotiocianato de guanidina, fervura e proteinase K, com algumas variações. O critério de avaliação utilizado foi a sensibilidade analítica. O protocolo utilizando fervura com filtração inicial da amostra em colchão de sacarose a 40% apresentou sensibilidade analítica de 10^3 UFC/ml. Os protocolos utilizando proteinase K para extração de DNA apresentaram sensibilidade analítica de 10^4 UFC/ml. A maior sensibilidade analítica (10^5 UFC/ml) e a melhor visualização do produto amplificado foram obtidos com a utilização de isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool sem adição de Tween 20 na lavagem inicial da amostra.

Palavras-chave: PCR. Búfalos. Leite. Brucelose animal.

ABSTRACT

GUIDO, M. C. **Detection of *Brucella abortus* DNA by PCR in spiked buffalo milk with *B. abortus* strain 1119-3.** [Detecção de DNA de *Brucella abortus* pela PCR em leite bubalino experimentalmente contaminado pela amostra 1119-3]. 2003. 46 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

To improve the PCR performance for detection of *Brucella* spp. in buffalo milk, different DNA extraction protocols were carried out in buffalo milk spiked with *Brucella abortus* strain 1119-3. These protocols were based on utilization of guanidine isothiocyanate, boil and proteinase K, with some variations. The analytical sensitivity was the evaluation criteria. Boiling with initial filtration of the sample through a solution of saccharose 40% presented analytical sensitivity of 10^3 CFU/ml. The protocols based on proteinase K presented analytical sensitivity of 10^4 CFU/ml. The highest analytical sensitivity (10 CFU/ml) and best visualization of the amplified product were verified for the protocol using guanidine isothiocyanate with immediate precipitation in alcohol without addition of Tween 20 in the initial sample wash.

Key words: PCR. Buffalo. Milk. Animal brucellosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo A de extração do DNA (vide item 2.3.1.1)	35
Figura 2 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^1 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo A1 de extração do DNA sem utilização de Tween (vide item 2.3.1.2).	35
Figura 3 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^1 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo A2 de extração do DNA. (vide item 2.3.1.3).	35
Figura 4 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^1 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo A3 de extração do DNA sem lavagem inicial da amostra. (vide item 2.3.1.4).	35
Figura 5 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo A4 de extração do DNA utilizando sobrenadante. (vide item 2.3.1.5).	36
Figura 6 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^1 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo B de extração do DNA (vide item 2.3.1.6).	36
Figura 7 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^4 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo C de extração do DNA (vide item 2.3.2.1).	36
Figura 8 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^5 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo Ca - extração do DNA utilizando protocolo C e tampão sulfato na amplificação. (vide item 2.4.2.1)	36
Figura 9 -	Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^4 UFC/ml para detecção de <i>Brucella</i> spp. em leite de búfala utilizando-se o Protocolo C1 de extração do DNA sem utilização de Tween (vide item 2.3.2.2).	37

- Figura 10 -** Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^3 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo C2** de extração do DNA com colchão de sacarose.(vide item 2.3.2.3). 37
- Figura 11 -** Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo D** de extração do DNA. (vide item 2.3.3.1). 37
- Figura 12 -** Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo E** de extração do DNA. (vide item 2.3.3.2.). 37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Evolução do efetivo animal e da produção de leite no mundo.	14
Quadro 2 -	Evolução do efetivo bubalino (milhares de cabeças) em alguns países.	15
Quadro 3 -	Concentração de minerais e vitaminas (mg/100ml) no leite de bubalinos e bovinos.	19
Quadro 4 -	Sequências dos <i>primers</i> (BAILY et al., 1992) utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção de DNA de <i>Brucella abortus</i> em leite de búfala. São Paulo, 2003.	31
Quadro 5 -	Resultados das sensibilidades analíticas dos diversos protocolos utilizados para extração e amplificação de DNA de <i>Brucella abortus</i> em leite de bubalino experimentalmente contaminado e figuras correspondentes.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Componentes do leite bubalino e bovino.	18
-------------------	--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µl	Microlitro
Ca	Cálcio
Cl	Cloro
°C	Graus Celsius
dATP	Desoxi-adenosina- trifosfato
dCTP	Desoxi-citosina-trifosfato
dGTP	Desoxi-guanosina-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo-trifosfato
dTTP	Desoxi-timidina-trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
g	Gravidade terrestre (9,81 m/s ²)
K	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligrama
Mg ⁺²	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
(NH ₄)SO ₄	Sulfato de amônio
P	Fósforo
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pK	Proteínase K
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TRIS	Tris (hidroximetil)amino metano
UFC	Unidades formadoras de colônias
V	Volt
Vit.	Vitamina
X	Vezes

Obs: Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica, algumas das abreviaturas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	MATERIAL E MÉTODO	21
2.1	AMOSTRAS DE LEITE.....	21
2.2	CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO LEITE COM <i>Brucella abortus</i>	22
2.3	EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>B. abortus</i> A PARTIR DE AMOSTRA DE LEITE EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADA.....	23
2.3.1	Protocolos de Extração de DNA com a Utilização do Isotiocianato de Guanidina	23
2.3.1.1	PROTOCOLO A - Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool.....	23
2.3.1.2	PROTOCOLO A1 - Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool - sem a utilização de Tween 20.....	24
2.3.1.3	PROTOCOLO A2 - Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool sem centrifugação.....	25
2.3.1.4	PROTOCOLO A 3 -Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool, sem adição de tween 20, nem a centrifugação da inicial da amostra.....	25
2.3.1.5	PROTOCOLO A 4 -Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool, com utilização do sobrenadante.....	26
2.3.1.6	PROTOCOLO B - Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação em álcool por 18 horas.....	26
2.3.2	Protocolos de extração de DNA através de fervura	26
2.3.2.1	PROTOCOLO C - Extração através de fervura.....	26
2.3.2.2	PROTOCOLO C1 - Extração através de fervura, sem Tween 20.....	28
2.3.2.3	PROTOCOLO C2 - Extração através de fervura, utilizando colchão de sacarose.....	28
2.3.3	Protocolos de extração DNA por Proteinase k	28
2.3.3.1	PROTOCOLO D - Extração por Proteinase k.....	29
2.3.3.2	PROTOCOLO E - Extração por Proteinase k utilizando centrifugação em colchão de sacarose a 40%.....	30
2.4.	AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Brucella abortus</i>	31
2.4.1	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	31
2.4.2	Protocolo de amplificação	32
2.4.2.1	PROTOCOLO Ca - Utilização de tampão sulfato na amplificação do DNA extraído pelo protocolo C	32
2.5	ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO	33
3	RESULTADOS	34
4	DISCUSSÃO	38
5	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

No período de 1970 a 1998, a população mundial de búfalos (*Bubalus bubalis*) cresceu 51,4%, totalizando um efetivo estimado em 162 milhões de cabeças no ano de 1998 (Quadro 1). Curiosamente, a produção de leite bubalino, no mesmo período, cresceu 185%, demonstrando que a exploração leiteira dos bubalinos tem se aperfeiçoado e crescido no mundo todo (Quadro 1). Ainda nesse mesmo período, a população de bubalinos no Brasil cresceu mais de 13 vezes (Quadro 2), mostrando forte expansão da atividade no nosso país.

<i>Espécie</i>	Variável	1970	1980	1990	1998	Crescimento no período (%)
Bovina	milhões de animais	1.081	1.216	1.296	1.318	21,92
	bilhões de litros de leite	359	422	484	470	30,92
Ovina	milhões de animais	1.061	1.096	1.204	1.064	0,28
	bilhões de litros de leite	5	7	8	8	60,00
Caprina	milhões de animais	376	462	580	670	78,19
	bilhões de litros de leite	7	8	9	11	69,23
Bubalina	milhões de animais	107	122	148	162	51,40
	bilhões de litros de leite	20	27	41	57	185,00

Quadro 1 Evolução do efetivo animal e da produção de leite no mundo.
Fonte: FAO, 1999

	1970	1980	1990	1998	Crescimento no período (%)
Índia	56.118	66.070	80.750	91.738	63,47
Paquistão	9.345	11.547	17.373	21.213	127,00
China	15.712	18.440	21.421	20.817	32,49
Egito	2.009	2.346	2.897	3.150	56,79
Itália	49	89	112	162	230,61
Brasil	118	495	1.397	1.700	1.340,68

Quadro 2 Evolução do efetivo bubalino (milhares de cabeças) em alguns países
Fonte: FAO, 1999

Dentro do bom negócio que se tornou a exploração leiteira de bubalinos, o queijo *mozzarella* é o seu produto com maior valor agregado (TONHATI, 1999). Sabe-se que o leite de búfala apresenta uma composição química mais rica do que o de vaca, o que permite maior rendimento na fabricação de produtos lácteos, além de conferir-lhes uma excepcional qualidade (TONHATI et al., 1996).

A *mozzarella* pode ser produzida tanto com o leite cru, como com o leite pasteurizado, sendo que na pasteurização são eliminadas bactérias desejáveis para obtenção de um produto com sabor e características peculiares. Com a destruição dessas bactérias, se faz necessária adição de culturas de bactérias, denominadas *starters*, para repor a microbiota. Todavia, o produto final obtido com leite pasteurizado apresenta alterações organolépticas, pois essas culturas *starters* não conseguem recompor idealmente a microbiota fermentadora do leite (COPOLLA et al., 1988).

Além das dificuldades de recomposição da microbiota, Thanker et al. (1991) concluíram que o tratamento térmico do leite determina alterações estruturais da matriz protéica do queijo.

Citro (1992), refere que as proteínas séricas que se precipitam pelo calor ligam-se à caseína durante a coagulação e comprometem a filabilidade e higroscopicidade, alterando o produto que é rejeitado pelos consumidores de mercados mais exigentes.

Assim sendo, para produzir a *mozzarella* de alta qualidade físico-organoléptica, o leite não deve ser previamente pasteurizado, ou seja, não deve ser submetido ao procedimento físico que elimina os riscos sanitários pré-existentes na matéria prima, dentre os quais destacam-se a tuberculose e a brucelose.

Portanto, para que a *mozzarella* fabricada com leite *in natura* possa ser oferecida ao consumidor sem o risco de exposição à essas duas doenças, esse mesmo leite deve advir de rebanhos livres dessas doenças.

Visando a solução desses problemas sanitários, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em janeiro de 2001, instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), cujo objetivo principal é abaixar a prevalência e incidência dessas doenças, trazendo como benefícios o desenvolvimento das cadeias produtivas de carne e leite, a organização dos serviços veterinários de defesa sanitária animal e a melhoria da qualidade sanitária dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor (BRASIL, 2001). Esse programa é voltado para as populações bovina e bubalina e tem como estratégia principal a certificação de propriedades livres através de testes diagnósticos indiretos sucessivos e sacrifício dos animais reatores.

Tradicionalmente, nesse programa, os testes indiretos são utilizados no diagnóstico massal e os testes diretos de forma estratégica, confirmando focos de doença e esclarecendo situações não triviais, para as quais os testes indiretos são insuficientes.

Relativamente à brucelose, os métodos diretos aplicados ao leite dão bons resultados e são uma boa alternativa para a detecção do agente no animal vivo.

Classicamente, a detecção da *Brucella abortus*, agente da brucelose bubalina, é feita através do isolamento e identificação da bactéria, envolvendo o cultivo em meios especiais sob condição de microaerofilia por até 21 dias e realização de provas bioquímicas e observação do comportamento frente a fagos específicos (MURRAY et al., 1999).

Recentemente, a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) vem se difundindo cada vez mais como procedimento rotineiro de diagnóstico direto para várias doenças devido à facilidade de execução e rapidez. Trata-se de um método de amplificação enzimática de pequenas quantidades de DNA ou RNA (SAIKI et al., 1985), aplicável às mais variadas amostras clínicas (ERLICH et al., 1991; GINGERAS et al., 1990; PERSING, 1991).

A reação depende basicamente da construção de oligonucleotídeos iniciadores, também denominados *primers*, complementares às extremidades que delimitam a região alvo. Ciclos repetidos de trocas de temperatura possibilitam a desnaturação, o pareamento e extensão dos *primers*, resultando na multiplicação exponencial do fragmento genético em estudo, pois cada fita de DNA formada serve como molde para o próximo ciclo de replicação. Em poucas horas, depois de algumas dezenas de ciclos, haverá milhões de cópias do fragmento de ácido nucleico alvo (XU e LARZUL, 1991).

Nos últimos anos vários métodos de PCR têm sido descritos para amplificar seqüências de DNA de *Brucella* spp. Essa técnica tem sido utilizada em tecidos de fetos abortados (CORTEZ et al., 2001; FEKETE, 1992) e em sangue (GUARINO et al., 2000; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995). A detecção de *Brucella* spp. em leite de bovinos pela PCR é um assunto relativamente bem estudado e já existem vários protocolos descritos para a utilização em laboratórios de rotina (DE GRACIA, 1997; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; ROMERO et al., 1995; ROMERO e LOPEZ-GOÑI, 1999). Porém, a simples aplicação desses protocolos desenvolvidos para o leite bovino, em leite de bubalino, desconsiderando uma possível interferência da diferença de composições químicas entre os leites dessas duas espécies (Tabela 1 e Quadro 3), tem estimulado pesquisadores

a estudar protocolos específicos de PCR para a detecção de *Brucella* spp. em leite de bubalinos. Nessa linha têm trabalhado Serpe et al. (1998,1999) que, com a intenção de desenvolver um teste rápido para revelar a presença de brucelas em leite e derivados, conseguiram desenvolver um protocolo capaz de detectar 10^4 UFC/ml em leite de búfala experimentalmente contaminado. Esses autores trabalharam com métodos muito simples de obtenção do DNA, ou seja, a sonicação, seguida da fervura e congelamento. Esse protocolo, assim como a tentativa de isolamento pelos métodos clássicos, foram aplicados em 18 amostras de leite de búfalas, cujos resultados mostraram-se todos negativos (FENIZIA et al., 2001).

De acordo com Citro (1992), o leite de búfala possui maior concentração de íons Mg^{+2} (18,50 mg/100ml) do que o leite de bovino (11,50 mg/100ml), podendo representar um fator a ser considerado para realização da PCR em leite de búfala, visto que Gelfand e White (1990) e Shibata (1994) referem uma possível interferência do Mg^{+2} na atividade da Taq DNA Polimerase.

A PCR é realizada em três etapas: extração do ácido nucléico contido na amostra, sua amplificação e a visualização d produto. Os pontos críticos para o sucesso da aplicação da PCR são: a escolha correta dos *primers* a serem empregados e a qualidade da extração do DNA (COLLINS et al., 1994).

Tabela 1 Composição do leite bubalino e bovino.

Componentes	Leite Bubalino (%)	Leite bovino (%)
Água	82,5	88
Sólidos totais	18,0	12,7
Lipídios	6,0-8,0	3,4-3,8
Proteínas	4,42	2,75
Lactose	4,9	4,7
Caseína	3,37	2,11
NaCl	0,108	0,136
Ca	0,199	0,117
P	0,124	0,088
Relação Ca/P	1,61	1,31

Adaptado de CHIMENTI, 2001 e GUIMARÃES, 2001

Elementos	Espécie	Bubalina	Bovina
Ca		203,0	102,1
Mg		18,50	11,50
Na		50,15	50,0
K		108,5	148,0
Fosfato		129,3	95,0
Citrato		160-200	166
Cl		65-82	106
Vit .A (mg/g de gordura)		9,5	9,2
Tiamina		0,50	0,45
Riboflavina		1,07	1,47
Vit. C		2,97	2,56

Quadro 3 Concentração de minerais e vitaminas (mg/100ml) no leite de bubalinos e bovinos. Adaptado de : CITRO ,1992

A PCR é um teste diagnóstico, e como tal pode ser avaliado através de parâmetros de sensibilidade e especificidade, que podem ser analisados sob o contexto analítico e diagnóstico (Gardner e Greiner, 2000).

Do ponto de vista analítico:

Sensibilidade analítica refere-se à menor quantidade do analito (unidade em análise, que pode ser antígeno, anticorpo, substância, DNA, etc.) que o teste é capaz de detectar. Um teste apresentará alta sensibilidade analítica, quanto maior for a sua capacidade de detectar pequenas quantidades do analito.

Especificidade analítica refere-se à capacidade do teste em detectar somente o analito e não outras substâncias de estrutura semelhante. Um teste apresentará alta especificidade quanto menor for a sua capacidade de detectar substâncias de estrutura semelhante ao analito.

Do ponto de vista diagnóstico:

Sensibilidade diagnóstica refere-se à capacidade do teste em classificar como positivo o indivíduo que possui o parâmetro em diagnóstico (doença, infecção, etc.). Um teste apresentará alta sensibilidade diagnóstica quanto maior for sua capacidade de classificar como positivo um animal que possua o parâmetro em diagnóstico.

Especificidade diagnóstica refere-se à capacidade do teste em classificar como negativo o indivíduo que não possua o parâmetro em diagnóstico. Um teste apresentará alta especificidade diagnóstica quanto maior for a sua capacidade de classificar como negativo um animal que não possua o parâmetro em diagnóstico.

Embora meçam grandezas diferentes, há uma forte correlação direta entre a sensibilidade analítica e a diagnóstica.

Dada a importância da exploração leiteira da espécie bubalina no nosso país, a presença da brucelose nessa população, a recente instituição do PNCEBT, os benefícios que uma técnica rápida e eficiente de detecção do agente em leite desses animais trariam ao programa, esse estudo tem como objetivo comparar algumas técnicas de extração de DNA em protocolo de PCR para a detecção de *Brucella abortus* em leite bubalino, visando a identificação do protocolo que apresenta maior sensibilidade analítica.

2 MATERIAL E MÉTODO

Estão descritos a seguir a metodologia e o material utilizado para realização do presente trabalho.

2.1 AMOSTRAS DE LEITE

Foram colhidas amostras de leite bubalino provenientes de rebanho sorologicamente negativo para brucelose há pelo menos três anos. Esse rebanho foi e continua sendo submetido a provas sorológicas anuais.

O leite foi colhido assépticamente, mantido refrigerado e transportado até o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

Essas amostras foram submetidas ao cultivo microbiológico (GENOVEZ et al., 1993.), apresentando-se negativas para a presença de *Brucella* spp.

Foram mantidas em microtubos sob a temperatura de -20°C , em alíquotas de 900 μl até o momento da contaminação experimental para extração do DNA de *Brucella abortus*.

2.2 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO LEITE COM *Brucella abortus*

Utilizou-se uma suspensão bacteriana pura de *Brucella abortus* 1119-3 cedida pelo Instituto Biológico de São Paulo com $2,8 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). Para contagem de colônias foi utilizado método descrito por Alton et al. (1988).

Foi realizada a contaminação experimental do leite bubalino adicionando-se a 900 μ l de leite, 100 μ l da suspensão bacteriana de *Brucella abortus* 1119-3 inativada, com concentração de 1×10^7 UFC/ml, resultando assim uma amostra de leite contendo 1×10^6 UFC/ml. Dessa diluição inicial foram obtidas outras de razão dez, até atingir 1×10^0 UFC/ml, conforme Esquema 1.

Esquema 1 Contaminação experimental seriada das amostras de leite de bubalino

A contaminação foi realizada à medida que se fez necessária para a execução de novo protocolo de extração de DNA.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE *B.abortus* A PARTIR DE AMOSTRA DE LEITE EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADA

Foram realizados alguns protocolos diferentes de extração de DNA de *Brucella abortus* a partir do leite. Os protocolos foram repetidos por três vezes.

2.3.1 Protocolos de Extração de DNA com a Utilização do Isotiocianato de Guanidina

Os protocolos abaixo descritos são variações utilizando a extração de DNA com a utilização de Isotiocianato de Guanidina.

2.3.1.1 PROTOCOLO A – Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool.

O protocolo foi adaptado de CHOMKZYNSKI (1993).

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Colocar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2)
- ✓ Acrescentar 20 µl de Tween 20 (adaptado de SERPE et al, 1999).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g /10 min. à temperatura de 20°C.
- ✓ Descartar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Suspender o sedimento em 200 µl de Tris HCl (150 mM – pH 8,0).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Acrescentar 600 µl de isotiocianato de guanidina (5mol/l).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Acrescentar 100 µl de clorofórmio gelado.
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g / 5 min à temperatura de 4°C.

- ✓ Retirar 500 µl de sobrenadante (tomando o cuidado para não aspirar a interface orgânica) e transferir para outro microtubo de 1500 µl.
- ✓ Realizar precipitação acrescentando 750 µl de propanol gelado, homogeneizar por inversão.
- ✓ Realizar centrifugação a 12.000 X g /20 min.
- ✓ Desprezar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Acrescentar 500 µl de etanol a 70%.
- ✓ Homogeneizar em agitador orbital (Vórtex) por 10 segundos.
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g / 15 min.
- ✓ Desprezar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Secar o sedimento.
- ✓ Suspender o sedimento com 30 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).
- ✓ Colocar em banho Maria a 56°C por 15 minutos.
- ✓ Estocar a - 20°C até o momento da amplificação (item 2.4.2).

2.3.1.2 PROTOCOLO A1 - Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool - sem a utilização de Tween 20.

O protocolo A1 diferiu do protocolo A apenas por não acrescentar o Tween 20, ao leite contaminado, antes da centrifugação da amostra.

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Colocar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g /10 min. à temperatura de 20°C.
- ✓ Descartar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Seguir o protocolo A a partir do item 10.

2.3.1.3 PROTOCOLO A2 - Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool sem centrifugação.

O protocolo A2 diferiu do protocolo A apenas por não realizar centrifugação inicial das amostras.

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Colocar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2).
- ✓ Acrescentar 20 µl de Tween 20 (adaptado de SERPE et al, 1999).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Acrescentar 600 µl de isotiocianato de guanidina (5mol/l).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Seguir o protocolo A a partir do item 10.

2.3.1.4 PROTOCOLO A 3 - Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool, sem adição de tween 20, nem a centrifugação da inicial da amostra.

O protocolo A3 diferiu do protocolo A por não realizar nem a adição de Tween 20, nem a centrifugação inicial da amostra.

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Colocar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2).
- ✓ Acrescentar 600 µl de isotiocianato de guanidina (5mol/l).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Seguir o protocolo A a partir do item 10.

2.3.1.5 PROTOCOLO A 4 - Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação imediata em álcool, com utilização do sobrenadante.

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Colocar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2).
- ✓ Centrifugar a 2.000 x g / 10 min.
- ✓ Transferir o sobrenadante para novo microtubo.
- ✓ Acrescentar 600 µl de isotiocianato de guanidina.(5mol/l).
- ✓ Seguir o protocolo A a partir do item 10.

2.3.1.6 PROTOCOLO B – Extração com isotiocianato de guanidina com precipitação em álcool por 18 horas.

O protocolo de extração foi semelhante ao Protocolo A (item 2.3.1.1) diferindo apenas no tempo de precipitação em álcool, sendo realizada por 18 horas a – 20°C, ao invés de ser imediata.

2.3.2 Protocolo de extração de DNA através de fervura

A seguir são descritos os protocolos utilizando a fervura para extração do DNA.

2.3.2.1 PROTOCOLO C – Extração através de fervura

O protocolo foi adaptado de CORTEZ, 1999.

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Colocar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2)

- ✓ Acrescentar 20 µl de Tween 20 (adaptado de Serpe et al, 1999).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g /10 min. à temperatura de 20°C.
- ✓ Descartar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Suspende o sedimento em 400 µl de Tris HCl (150 mM – pH 8,0).
- ✓ Colocar em Banho-Maria a 100°C ± 2°C por 15 minutos.
- ✓ Acrescentar 350 µl de fenol tamponado pH 8,0.
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Centrifugar a 13.000 X g / 5 min.
- ✓ Transferir 300 µl de sobrenadante para um novo microtubo de 1500 µl.
- ✓ Acrescentar 150µl de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25: 24:1).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Centrifugar a 13.000 X g /5 min.
- ✓ Transferir 200 µl de sobrenadante para novo microtubo.
- ✓ Acrescentar 35,3 µl de acetato de sódio (2M).
- ✓ Acrescentar 500 µl de etanol absoluto gelado.
- ✓ Homogeneizar por inversão.
- ✓ Precipitar por 18 horas - 20°C.
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g /20 min.
- ✓ Desprezar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Secar o sedimento.
- ✓ Suspende o sedimento com 30 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).
- ✓ Colocar em banho Maria a 56°C por 15 minutos.
- ✓ Estocar a -20°C até o momento da amplificação (item 2.4.2).

2.3.2.2 PROTOCOLO C1 - Extração através de fervura, sem tween 20.

O protocolo C1 diferiu do protocolo C apenas por não acrescentar o Tween 20, ao leite contaminado, antes da centrifugação da amostra.

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Adicionar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2).
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g /10 min. à temperatura de 20°C.
- ✓ Descartar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Seguir o protocolo C a partir do item 6.

2.3.2.2 PROTOCOLO C2 - Extração através de fervura, utilizando colchão de sacarose.

- ✓ Em um microtubo de 1500 µl:
- ✓ Colocar 50 µl de solução de sacarose a 40%.
- ✓ Acrescentar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2).
- ✓ Centrifugar a 12.000 x g /10 min a 20°C.
- ✓ Descartar o sobrenadante.
- ✓ Seguir conforme o protocolo C a partir do item 6.

2.3.3 Protocolos de extração de DNA por proteinase K

A seguir são descritos os protocolos utilizando a proteinase K para extração de DNA da amostra.

2.3.3.1 PROTOCOLO D - Extração por proteinase K

O protocolo foi adaptado de DE GRACIA (1997).

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Colocar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2).
- ✓ Acrescentar 20 µl de Tween 20 (adaptado de Serpe et al, 1999).
- ✓ Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g /10 min. à temperatura de 20°C.
- ✓ Descartar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Suspende o sedimento em 300 µl de tampão de lise [60 µl de tampão de extração (100mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl), 30µl de SDS a 10%, 15µl de pK 20mg/ml, 195 µl de água ultra pura autoclavada].
- ✓ Incubar a 37°C por uma hora – homogeneizando a cada 15 min.
- ✓ Adicionar 250 µl de fenol tamponado.
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g /5 min.
- ✓ Transferir 200 µl de sobrenadante a um novo microtubo de 1500 µl.
- ✓ Adicionar 100 µl de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25: 24:1).
- ✓ Centrifugar a 12.000 x g /5 min.
- ✓ Transferir 150 µl do sobrenadante a um novo microtubo.
- ✓ Adicionar 26,5 µl de acetato de sódio (2M).
- ✓ Adicionar 400 µl de etanol absoluto.
- ✓ Precipitar por 18 horas a –20°C.
- ✓ Centrifugar 12.000 x g / 20min.
- ✓ Descartar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Secar o sedimento.

- ✓ Suspende o sedimento com 30 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).
- ✓ Incubar a 56° C por 15 min.
- ✓ Estocar a -20°C até o momento da amplificação.

2.3.3.2 PROTOCOLO E – Extração por proteinase K utilizando centrifugação em colchão de sacarose a 40%.

O protocolo foi adaptado de DE GRACIA (1997)

Em um microtubo de 1500 µl:

- ✓ Colocar 200 µl de cada amostra de leite previamente contaminado (item 2.2).
- ✓ Centrifugar a 2.000 X g / 5 min.
- ✓ Transferir o sobrenadante para um novo microtubo de 1500 µl que está com 50 µl de sacarose a 40%.
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g / 10 min.
- ✓ Descartar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Suspende o sedimento em 300 µl de tampão de lise [60 µl de tampão de extração (100mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl), 30µl de SDS a 10%, 15µl de pK 20mg/ml, 195 µl de água ultra pura autoclavada].
- ✓ Incubar a 37°C por uma hora – homogeneizando a cada 15 min.
- ✓ Adicionar 250 µl de fenol tamponado.
- ✓ Centrifugar a 12.000 X g /5 min.
- ✓ Transferir 200 µl de sobrenadante a um novo microtubo de 1500 µl.
- ✓ Adicionar 100 µl de fenol - clorofórmio-álcool-isoamílico (25: 24:1).
- ✓ Centrifugar a 12.000 x g /5 min.
- ✓ Transferir 150 µl de sobrenadante a um novo microtubo.
- ✓ Adicionar 26,5 µl de acetato de sódio (2M).

- ✓ Adicionar 400 µl de etanol absoluto.
- ✓ Precipitar por 18 horas a –20°C.
- ✓ Centrifugar 12.000 x g / 20min.
- ✓ Descartar o sobrenadante por inversão.
- ✓ Secar o sedimento.
- ✓ Suspender o sedimento com 30 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).
- ✓ Incubar a 56° C por 15 min.
- ✓ Estocar a –20°C até o momento da amplificação.

2.4. AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Brucella abortus*.

A seguir são descritas as etapas de amplificação do DNA de *Brucella abortus*

2.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Utilizou-se um par de *primers* gênero específico, B₄ e B₅ descrito por Baily et al. (1992). Estes oligonucleotídeos delimitam um segmento de 223 pares de bases de um gene que codifica uma proteína de membrana (BCSP-31) de 31 kDa presente no gênero *Brucella* (MAYFIELD et al. 1988).

PRIMERS	SEQUÊNCIA
B ₄	5'TGGCTCGGTTGCCAATATCAA3'
B ₅	5'CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG3'

Quadro 4 Sequências dos *primers* (BAILY et al., 1992) utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de DNA de *Brucella abortus* em leite de búfala. São Paulo, 2003.

2.4.2 Protocolo de Amplificação

Para a amplificação do DNA de *Brucella abortus* em um volume final de 50 µl, foi realizado o seguinte protocolo:

- ✓ Adicionar 26,2 µl de água ultra pura (tipo Milli Q).
- ✓ Adicionar 8 µl da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]).
- ✓ Adicionar 5 µl de Tampão de reação 10x (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0).
- ✓ Adicionar 2 µl de cada primer (B4 e B5, 10 pmoles/µl)
- ✓ Adicionar 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM)
- ✓ Adicionar 0,3 µl de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*®) (5 unidades/µl)
- ✓ Adicionar 5 µl do DNA extraído.

Em um termociclador PTC-200 MJ Research® foi realizada uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 60°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C/10min (BAILY et al.,1992).

Com o intuito de melhorar a sensibilidade analítica do protocolo que utilizou a fervura como método de extração, foi testado o tampão sulfato como tampão de reação.

2.4.2.1 PROTOCOLO Ca – Utilização de tampão sulfato na amplificação do DNA extraído pelo protocolo C.

Realizou-se a extração de acordo com o protocolo C.

Na amplificação, ao invés de se utilizar tampão convencional de reação 10x (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0), utilizou-se tampão sulfato de amônio 10x [750mM Tris-HCl (pH 8,8 a temperatura 25°C), 200 mM (NH₄)₂ SO₄, 0,1% Tween 20] (*Fermentas*®).

2.5 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

A visualização do produto amplificado foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), utilizando-se tampão de corrida TBE 0,5X (0,04 M Tris- borato e 0,001 M EDTA, pH 8,0), segundo Sambrook et al. (1989), como segue:

- ✓ Adicionar a cada uma das cavidades do gel, 10 µl de uma mistura contendo tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 40% [p/v]) mais o produto amplificado numa proporção de 1:5.
- ✓ Adicionar a uma das cavidades 5 µl de padrão contendo fragmentos de DNA de 100 a 1500 pb, com incrementos de 100 pb.
- ✓ Submeter a uma voltagem constante de 6-7 V por centímetro quadrado de gel, em cuba horizontal, contendo tampão de corrida TBE 0,5X.

A revelação das bandas foi realizada através da imersão do gel em uma solução de brometo de etídio a 5 µg/ml durante 10 minutos e posterior observação em transluminador ultravioleta.

O gel foi fotografado através de câmera KodaK Digital Science (DC40).

3 RESULTADOS

No quadro abaixo foram descritos os resultados da sensibilidade analítica dos diferentes protocolos utilizados.

PROTOCOLO	DESCRIÇÃO	SENSIBILIDADE ANALÍTICA	FIGURA
A	EXTRAÇÃO COM ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA COM PRECIPITAÇÃO IMEDIATA EM ÁLCOOL	10^2 UFC/ml	1
A1	EXTRAÇÃO COM ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA COM PRECIPITAÇÃO IMEDIATA EM ÁLCOOL - sem a utilização de Tween.	10^1 UFC/ml	2
A2	EXTRAÇÃO COM ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA COM PRECIPITAÇÃO IMEDIATA EM ÁLCOOL - sem centrifugação	10^1 UFC/ml	3
A3	EXTRAÇÃO COM ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA COM PRECIPITAÇÃO IMEDIATA EM ÁLCOOL - sem a utilização de Tween 20 , nem a centrifugação inicial	10^1 UFC/ml	4
A4	EXTRAÇÃO COM ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA COM PRECIPITAÇÃO IMEDIATA EM ÁLCOOL - com utilização do sobrenadante.	10^2 UFC/ml	5
B	EXTRAÇÃO COM ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA COM PRECIPITAÇÃO EM ÁLCOOL POR 18 HORAS.	10^1 UFC/ml	6
C	EXTRAÇÃO ATRAVÉS DE FERVURA	10^4 UFC/ml	7
Ca	EXTRAÇÃO ATRAVÉS DE FERVURA – amplificação com tampão sulfato de amônio	10^3 UFC/ml	8
C1	EXTRAÇÃO ATRAVÉS DE FERVURA - sem utilização de Tween	10^4 UFC/ml	9
C2	EXTRAÇÃO ATRAVÉS DE FERVURA - com colchão de sacarose a 40%	10^3 UFC/ml	10
D	EXTRAÇÃO POR PROTEINASE K	10^2 UFC/ml	11
E	EXTRAÇÃO POR PROTEINASE K - utilizando centrifugação em COLCHÃO DE SACAROSE a 40%.	10^2 UFC/ml	12

Quadro 5 – Resultados das sensibilidades analíticas dos diversos protocolos utilizados para extração e amplificação de DNA de *Brucella abortus* em leite de bubalino experimentalmente contaminado e figuras correspondentes.

Figura 1 – Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo A** de extração do DNA (vide item 2.3.1.1).

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1A= 10^6 UFC/ml; 2A = 10^5 UFC/ml; 3A = 10^4 UFC/ml; 4 A = 10^3 UFC/ml; 5A = 10^2 UFC/ml; 6A = 10^1 UFC/ml; 7A = 10^0 UFC/ml; 8A = controle negativo da extração ; N = controle da amplificação

Figura 2 – Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^1 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo A1** de extração do DNA sem utilização de Tween (vide item 2.3.1.2).

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1A1= 10^6 UFC/ml; 2A1 = 10^5 UFC/ml; 3A1 = 10^4 UFC/ml; 4A1 = 10^3 UFC/ml; 5A1 = 10^2 UFC/ml; 6A1 = 10^1 UFC/ml; 7A1 = 10^0 UFC/ml; 8A1 = controle negativo da extração

Figura 3 – Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^1 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo A2** de extração do DNA. (vide item 2.3.1.3)

Legenda: 100pb - padrão com 100 pares de bases; 1A2= 10^6 UFC/ml; 2A2 = 10^5 UFC/ml; 3A2 = 10^4 UFC/ml; 4A2 = 10^3 UFC/ml; 5A2 = 10^2 UFC/ml; 6A2 = 10^1 UFC/ml; 7A2 = 10^0 UFC/ml; 8A2 = controle negativo da extração

Figura 4 – Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^1 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo A3** de extração do DNA sem lavagem inicial da amostra. (vide item 2.3.1.4)

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1A3 = 10^6 UFC/ml; 2A3 = 10^5 UFC/ml; 3A3 = 10^4 UFC/ml; 4A3 = 10^3 UFC/ml ; 5A3 = 10^2 UFC/ml; 6A3 = 10^1 UFC/ml; 7A3 = 10^0 UFC/ml ; 8A3= controle negativo da extração

Figura 5 - Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica 10^2 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo A4** de extração do DNA utilizando sobrenadante. (vide item 2.3.1.5)

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1A4 = 10^6 UFC/ml; 2A4 = 10^5 UFC/ml; 3A4 = 10^4 UFC/ml; 4A4 = 10^3 UFC/ml; 5A4 = 10^2 UFC/ml; 6A4 = 10^1 UFC/ml; 7A4 = 10^0 UFC/ml; 8A4 = controle negativo da extração.

Figura 6 - Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^1 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo B** de extração do DNA (vide item 2.3.1.6).

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1B = 10^6 UFC/ml; 2 B = 10^5 UFC/ml; 3 B = 10^4 UFC/ml; 4 B = 10^3 UFC/ml; 5 B = 10^2 UFC/ml; 6 B = 10^1 UFC/ml; 7 B = 10^0 UFC/ml; 8B = controle negativo da extração; N = controle da amplificação

Figura 7 - Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^4 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo C** de extração do DNA (vide item 2.3.2.1).

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1C = 10^6 UFC/ml; 2C = 10^5 UFC/ml; 3C = 10^4 UFC/ml; 4C = 10^3 UFC/ml; 5C = 10^2 UFC/ml; 6C = 10^1 UFC/ml; 7C = 10^0 UFC/ml; 8C = controle negativo da extração; N = controle da amplificação

Figura 8 -Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^3 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo Ca** - extração do DNA utilizando protocolo C e tampão sulfato na amplificação (vide item 2.4.2.1).

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1Ca = 10^6 UFC/ml; 2Ca = 10^5 UFC/ml; 3Ca = 10^4 UFC/ml; 4Ca = 10^3 UFC/ml; 5Ca = 10^2 UFC/ml; 6Ca = 10^1 UFC/ml; 7Ca = 10^0 UFC/ml

Figura 9 – Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^4 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo C1** de extração do DNA sem utilização de Tween (vide item 2.3.2.2).

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1C1= 10^6 UFC/ml; 2C1 = 10^5 UFC/ml; 3C1 = 10^4 UFC/ml; 4C1 = 10^3 UFC/ml; 5C1 = 10^2 UFC/ml; 6C1 = 10^1 UFC/ml; 7C1 = 10^0 UFC/ml; 8C1 = controle negativo da extração

Figura 10 – Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^3 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo C2** de extração do DNA com colchão de sacarose.(vide item 2.3.2.3)

Legenda: 100pb - padrão com 100 pares de bases; 1C2= 10^6 UFC/ml; 2C2 = 10^5 UFC/ml; 3C2 = 10^4 UFC/ml; 4C2 = 10^3 UFC/ml; 5C2 = 10^2 UFC/ml; 6C2 = 10^1 UFC/ml; 7C2 = 10^0 UFC/ml; 8C2 = controle negativo da extração

Figura 11 – Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo D** de extração do DNA. (vide item 2.3.3.1)

Legenda: 100pb - padrão com 100 pares de bases; 1D = 10^5 UFC/ml; 2D = 10^4 UFC/ml; 3D = 10^3 UFC/ml; 4D = 10^2 UFC/ml; 5D = 10^1 UFC/ml; 6D = 10^0 UFC/ml; 7D = controle negativo da extração ; N = controle da amplificação

Figura 12 – Gel de Eletroforese representando a sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ml para detecção de *Brucella* spp. em leite de búfala utilizando-se o **Protocolo E** de extração do DNA. (vide item 2.3.3.2)

Legenda: 100pb- padrão com 100 pares de bases; 1E = 10^5 UFC/ml; 2E = 10^4 UFC/ml; 3E = 10^3 UFC/ml; 4E = 10^2 UFC/ml ; 5E = 10^1 UFC/ml; 6E = 10^0 UFC/ml; 7E = controle negativo da extração ; N = controle da amplificação

4 DISCUSSÃO

Inicialmente, no desenvolvimento dos protocolos A, B, C, D, E, para extração de DNA de *Brucella* spp. o que apresentou maior sensibilidade analítica foi o protocolo B, extração de DNA com isotiocianato de guanidina com precipitação em álcool por 18 horas (10^1 UFC/ml), porém no protocolo A no qual se realizava precipitação direta obteve-se resultados muito próximos (10^2 UFC/ml) ao anterior. Na tentativa de melhorar o resultado da reação e otimizar o tempo de execução, foram realizadas algumas alterações no protocolo A, buscando identificar uma etapa da reação onde poderia estar sendo perdido DNA de *Brucella* spp. As alterações realizadas nos protocolos foram: a supressão da utilização do detergente Tween 20, a eliminação da etapa da centrifugação, a eliminação das duas etapas anteriormente descritas e a utilização do sobrenadante ao invés do sedimento.

Quando o detergente Tween 20 foi retirado da reação (Protocolo A1), obteve-se resultado igual ao do protocolo B (10^1 UFC/ml), sugerindo que o detergente, apesar de “limpar” a amostra, estaria levando à lise de bactérias com perda de DNA bacteriano quando do descarte do sobrenadante após a centrifugação.

A eliminação somente da centrifugação a 12.000 X g/10 minutos (Protocolo A2), também resultou na melhora da sensibilidade analítica de 10^2 para 10^1 UFC/ml (Figuras 1 e 3). Quando foi suprimida tanto a utilização do detergente Tween 20 quanto a centrifugação inicial da amostra (Protocolo A3) a sensibilidade analítica manteve-se em 10^1 UFC/ml (Figura 4).

Apesar dos protocolos A1, A2 e A3 terem apresentado igual sensibilidade analítica (10^1 UFC/ml), vale ressaltar que o protocolo A1 permitiu uma melhor visualização dos produtos amplificados, demonstrando que a supressão do detergente, combinada à realização da centrifugação apresenta os melhores resultados quanto ao rendimento e visualização dos produtos obtidos.

A principal diferença entre os protocolos A4 e A diz respeito ao substrato sobre o qual é aplicado o tampão de lise para exposição do DNA. Enquanto no protocolo A este tampão é aplicado ao sedimento resultante da centrifugação da amostra a $12.000 \times g/10$ minutos, no protocolo A4 o mesmo tampão é aplicado ao sobrenadante resultante da centrifugação da amostra a $2.000 \times g/10$ minutos. A sensibilidade analítica verificada para o protocolo A4 foi de 10^2 UFC/ml, igual à observada para o protocolo A (Figuras 1 e 5).

Um fator importante a considerar é que a centrifugação inicial da amostra para lavagem deve ser realizada à temperatura de 20°C e não a 4°C como no restante do protocolo, pois a centrifugação a 4°C congela a amostra devido à grande quantidade de gordura, o que impede a formação de sedimento.

A extração de DNA através da fervura (Protocolo C), apresentou uma sensibilidade analítica de 10^4 UFC/ml (Figura 7). Serpe et al. (1998,1999) relataram a mesma sensibilidade analítica em protocolo de extração que envolveu a lise através da fervura, seguida do congelamento e sonicação. Importante ressaltar que apesar desses autores também utilizarem *primers* direcionados à uma fração de DNA responsável para codificação da proteína de membrana (BCSP-31), esses primers não foram iguais aos do presente estudo, e que as condições da reação também foram diferentes.

Como a fervura é um método simples e barato de extração de DNA, foram ensaiadas duas variações (Protocolos C1 e C2, Figuras 9 e 10) que poderiam melhorar sua sensibilidade analítica. Desses, apenas a utilização de colchão de sacarose resultou em

melhoria da sensibilidade analítica de 10^4 para 10^3 UFC/ml e também da visualização do material amplificado (Figuras 7 e 10). Diferente do observado para os protocolos A e A1, ambos com isotiocianato de guanidina, a supressão da utilização de detergente, diferença entre os protocolos C e C1, não melhorou a sensibilidade analítica do método, indicando a presença de inibidores na amostra de leite bubalino. Além dessas duas variações para o método de extração de DNA baseado na fervura, foi avaliada uma alteração do tampão da fase de amplificação (Protocolo Ca). A substituição do tampão de cloreto de potássio pelo de sulfato de amônio promoveu um aumento da sensibilidade analítica de 10^4 para 10^3 UFC/ml, além disso a visualização do produto amplificado também melhorou (Figuras 7 e 8).

O método de extração por proteinase K (Protocolo D) apresentou sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ ml, inferior às 12,8 UFC/ml obtidas por De Gracia (1997) trabalhando com leite bovino. Saliente-se que esse autor utilizou os mesmos *primers* (B4 e B5), porém diferentes concentrações de bactérias. Leal-Klevezaz et al.(1995), relataram uma sensibilidade analítica de 10 bactérias/ml.utilizando primers que codificam a proteína de membrana omp-2 de *Brucella abortus*.

A extração de DNA por proteinase K em colchão de sacarose a 40% (protocolo E) produziu resultado semelhante ao obtido por De Gracia (1997). Não houve aumento da sensibilidade analítica, porém a visualização do produto amplificado melhorou (Figuras 11 e 12).

Estudos subsequentes poderiam verificar se diferentes temperaturas e tempos de incubação das amostras com a proteinase K resultam em aumento da sensibilidade analítica do protocolo D.

Durante a execução do protocolo de amplificação de DNA, foram avaliadas duas variações do protocolo original: aumento das concentrações de primers de 20 para 30

pmoles e aumento do volume inicial da amostra de 5 para 10µl., sempre para um volume final de reação de 50 µl .Em ambos os casos a sensibilidade analítica diminuiu.

O protocolo A1, além de apresentar a melhor sensibilidade analítica (10 UFC/ml), o produto amplificado é facilmente visualizado, e pode-se obter seu resultado em um período de 24 horas.

Embora haja uma forte correlação direta entre a sensibilidade analítica e a diagnóstica de um teste, o passo subsequente e natural do presente estudo, porém mais complexo e oneroso, seria a avaliação da sensibilidade e especificidade diagnósticas de alguns protocolos aqui descritos. A escolha do protocolo de melhor sensibilidade analítica (A1) para tal avaliação é bastante óbvia, porém seria muito interessante verificar se a sensibilidade analítica do método mais simples e barato (fervura) é suficiente para detectar as desconhecidas quantidades de *Brucella abortus* eliminadas pelas búfalas infectadas.

5 CONCLUSÕES

1. O Protocolo A, utilizando Isotiocianato de Guanidina com precipitação imediata em álcool, apresentou uma sensibilidade analítica de 10^2 UFC/ml.
2. A variação do Protocolo A que apresentou sensibilidade analítica mais alta e melhor visualização do produto amplificado foi o Protocolo A1 (10^1 UFC/ml), onde não se realizou, inicialmente, a adição de detergente Tween 20 na amostra.
3. O Protocolo de extração a partir da fervura da amostra apresentou sensibilidade analítica 10^4 UFC/ml, quando foi utilizada a adição de colchão de sacarose a 40% para filtração da amostra durante a extração do DNA ou quando foi utilizado tampão de sulfato de amônio para reação de amplificação, houve uma otimização da reação apresentando sensibilidade analítica de 10^3 UFC/ml.
4. O Protocolo de extração de DNA pela proteinase K apresentou sensibilidade analítica 10^4 UFC/ml, a adição do colchão de sacarose a 40% para a filtração da amostra não promoveu aumento da sensibilidade analítica do teste, apenas melhorou a visualização do produto da amplificação do DNA de *B. abortus*.

REFERÊNCIAS

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Instituto national de la Recherche Agronomique, 1988. 190p.

BAYLY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; SOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 271-275, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. Instrução Normativa nº 2, de 10 de Janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>. Acesso em: 8 fev. 2001.

CHIMENTI, R. La mozzarella di bufala Campana. Disponível em: <http://www.ips.it/scuola/concorso_99/mozzarella/menu/menu.htm>. Acesso em: 4 out. 2001.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532-537, 1993.

CITRO, A. Dove va la mozzarella di bufala campana? **Notiziario Veterinario**, apr. 1992.

COLLINS, D. M.; RADFORD, A. J.; LISLE, G. W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.83-94, 1994.

COPPOLA, S.; PARENTE, E.; DUMONTET, S.; LA PECCERELLA, A. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of mozzarella cheese from water-buffalo milk. **Lait**, v. 68, n. 3, p. 295-310, 1988.

CORTEZ, A. **Emprego da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção de *Brucella abortus* em amostras clínicas de abortos bovinos**. 1999. 34 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada A Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetuses by polimerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, p. 500-501, 2001.

DE GRACIA, A. S. **Detecção de DNA de *Brucella abortus* em amostras de leite bovino experimentalmente contaminado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. 1997. 37 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada A Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v.252, p.1643-51, 1991.

Food and Agriculture Organization – FAO. FAOSTAT: Agriculture data. Disponível em: <<http://apps.fao.org/cgi-gin/nph-db.pl?subset=agriculture/>>. Acesso em: 30 nov.1999.

FEKETE, A.; BANTLE, A. J.; HALLING, S. M.; Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Investigation**, v. 4, p. 79-83, 1992.

FENIZIA, D.; ALFANO, F.; GALLO, P.; AUTIERO, N.; SCARAMUZZO, A.; SERPE, L. Rapid detection by gene-specific PCR of *Salmonella* spp.; *Brucella* spp. y *Listeria monocytogenes* in buffalo milk and dairy products from southern Italy. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 6., 2001, Maracaibo, Venezuela. **Proceedings...**Maracaibo, Venezuela: Astro Data, 2001. v. 2, p. 392-397. The Buffalo: an alternative for animal agriculture in the third millenium.

GARDNER, I. A.; GREINER, M. **Advanced methods for test validation and interpretation in veterinary medicine**. - . Course manual prepared for the first international course. 2ed Berlin: Freie Universität, 2000. 102 p.

GELFAND, D. H.; WHITE, T. J. Thermostable DNA Polimerases. In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J.J., WHITE, T. J **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. E. California: Academic Presss, 1990. p. 129 -141.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no instituo biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal Research Animal Science**, v. 30, n.2, p. 107-112, 1993.

GINGERAS, T. R.; RICHMAN, D. D.; KWOH, D. Y.; GUATELLI, J. C. Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their applications. **Veterinary Microbiology**, v.24,n.3-4, p.235-251, 1990.

GUARINO, A.; SERPE, L.; FUSCO, G.; SCARAMUZZO, A.; GALLO, P. Detection of *Brucella* species in búfalo whole blood by gene-specific PCR. **The Veterinary Record**, v. 147, p. 634-636, 2000.

GUIMARÃES, G. F. P. B. Características peculiares do leite de búfala, Disponível em: <<http://members.nbci.com/bonnetterre>>. Acesso em: 4 out. 2001.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTINEZ-VAZQUEZ, I. O.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J. P. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3087-3090, 1995.

MAYFIELD, J. E.; BRICKER, B. J.; GODFREY, H.; CROSBY, R. M.; KNIGHT, D. J.; HALLING, S. M.; BALINSKY, D.; TABATAI, L. B. The cloning, expression, and nucleotide sequence of gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. **Gene**, v. 63, n. 1, p. 1-9, 1988.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999. 1711 p.

PERSING, D. H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 1281-5, 1991.

ROMERO, C.; GAMAZO, C.; PARDO, M.; LÓPEZ-GOÑI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 615-617, 1995.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3735-3737, 1999.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York : Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SERPE, L.; GALLO, P.; FIDANZA, N.; SCARAMUZZO, A.; FENIZIA, D. Rivelazione di *Brucella* spp. nel latte mediante PCR. **Industria Alimentari**, v. 37, n. 2, p. 191-194, 1998.

SERPE, L.; GALLO, P.; FIDANZA, N.; SCARAMUZZO, A.; FENIZIA, D. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. In soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 313-317, 1999.

SHIBATA, D. Preparation of Nucleic Acids for Archival Material . In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A. **The polymerase chain reaction**. Boston: Birkhäuser, 1994. p. 447-454.

TANKER, P. N.; GANGOPADHYAY, S. K.; MIYANI, R. V. Influence of manufacturing parameters on rheology of mozzarella cheese made from buffalo milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, p.53-56, nov. 1991.

TONHATI, H; BARUSELLI, P. S., OLIVEIRA, J. F. S.; VASCONCELLOS B. F. ; TOLEDO, L. M. Calving season, peak of lactation and milk production of the buffalo in Ribeira Valley, São Paulo state, Brazil. **Buballus bubalis**, Salerno, v. 3, p. 630- 667, 1996.

TONHATI, H. Resultados do controle leiteiro em bubalinos. In : BUBALINOS: sanidade, reprodução e produção. Jaboticabal: Funep, 1999. p. 90-109.

XU, L. Z.; LARZUL, D. The polymerase chain reaction: basic methodology and applications. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.14, n.3, p.209-221, 1991.