

Comparação de Diferentes Protocolos de Extração de DNA do *S. aureus* Diretamente do leite Contaminado

Arnaldo Santos Rodrigues Junior, Silvio Gomes dos Santos, Marina Ferreira da Vitória, Kênia Moura Teixeira, Tania Valeska Medeiros Dantas Simões, Leandro Eugenio Cardamone Diniz, Amaury Apolonio de Oliveira

Resumo

Avanços na biologia molecular têm possibilitado o uso rotineiro de técnicas como PCR e sequenciamento de DNA no diagnóstico na vigilância e na epidemiologia de doenças infecciosas. O DNA genômico pode ser obtido a partir de sangue total, leite, coágulo, bulbo piloso, saliva, urina, entre outros. O uso do leite, como fonte de DNA, reduziria o estresse causado aos animais, além de possibilitar o uso de *pools* de amostra para diagnóstico em nível de rebanho. O objetivo deste estudo foi realizar uma comparação entre quatro protocolos de extração para o DNA do *Staphylococcus aureus* diretamente do leite de bovino. Para o estudo foi utilizado leite UHT contaminado com *Staphylococcus aureus* e submetido a quatro protocolos de extração. A cepa de *Staphylococcus* utilizada foi isolada no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros. O primeiro protocolo de extração foi baseado no uso de solução alcalina e aquecimento, no segundo, o leite foi submetido à fervura e ao congelamento, no terceiro a amostra foi submetida a solução salina e retirada da gordura mecanicamente e no quarto utilizou tampão NET, solução desnaturante e choque térmico. Para a PCR foi utilizado o gene FemA. Após

¹ Graduando de Veterinária, bolsista PIBIC/CNPq da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, juuniiorjr@bol.com.br.

² Graduando em Química, técnico da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, silvio.santos@embrapa.br.

³ Graduanda em Engenharia Florestal, bolsista CNPq da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE marina_fv@hotmail.com.

⁴ Química, especialista em Biotecnologia e Meio ambiente, técnica da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE kenia.teixeira@embrapa.br.

⁵ Médica-veterinária, doutora em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, tania.dantas@embrapa.br.

⁶ Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, leandro.diniz@embrapa.br.

⁷ Médico-Veterinário, mestre em Medicina Veterinária, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, amaury.oliveira@embrapa.br.

a análise dos resultados com relação à pureza e a concentração observou-se que os protocolos um e quatro apresentaram as maiores médias para a relação de A260/A280 e com relação à concentração, o protocolo dois apresentou a maior concentração (354,92 ng/ul,) e diferiu estatisticamente das demais. Para a positividade na PCR o protocolo três apresentou o melhor desempenho com 95 % de positividade e os protocolos dois e quatro apresentaram desempenho similar, no entanto, o quarto protocolo apresentou bandas mais nítidas. Com os resultados obtidos pode-se concluir que o protocolo três apresentou o melhor desempenho na extração de DNA do *Staphylococcus aureus* diretamente do leite e o protocolo quatro apesar da menor porcentagem de positividade na PCR, apresentou bandas mais nítidas.

Palavras-chave: diagnóstico molecular, DNA bacteriano, isolamento, PCR

Introdução

Avanços na biologia molecular têm possibilitado o uso rotineiro de técnicas como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA no diagnóstico, na vigilância e na epidemiologia de doenças infecciosas, além de estudos de mapeamento do genoma (CALDART et al., 2011). A aplicação de técnicas de biologia molecular, aliada às técnicas convencionais de bacteriologia, tem possibilitado novas abordagens na epidemiologia da mamite bovina.

O *Staphylococcus aureus* destaca-se como um dos microrganismos mais frequentemente associados às infecções intramamárias de bovinos em todos os continentes e o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (VASUDEVAN et al., 2003; COSTA, 2008). A detecção direta de patógenos bacterianos em amostras lácteas é um trabalho difícil devido à presença de substâncias inibidoras da PCR (RAMESH et al., 2005; CREMONESI et al., 2005). O uso do leite, como fonte de DNA, permitiria o uso de *pools* de amostra para diagnóstico em nível de rebanho (PSIFIDI et al., 2009) e ainda poderia agilizar o resultado e complementar o diagnóstico microbiológico.

A identificação de *S. aureus* por PCR é baseada na amplificação de um gene altamente conservado dentro da espécie, como por exemplo, o gene *femA* (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000). Para isto deve existir um material genético puro para a realização da PCR, e assim, é necessário um método eficaz de extração de DNA bacteriano. Existem inúmeras metodologias para extração de DNA, no entanto independentemente do método utilizado, a

finalidade dos protocolos de extração é resultar em um DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida e eficiente (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Baseado nisto este estudo teve por objetivo padronizar um protocolo de extração de DNA para *Staphylococcus aureus* diretamente do leite .

Material e Métodos

Para a obtenção do isolado foi coletado leite de vacas leiteiras e em seguida realizado o isolamento e a identificação bacteriana, de acordo com Brito et al., 1999. A contaminação do leite ocorreu pela inoculação de dois ml de cada um dos inoculos de *Staphylococcus* em oito ml de leite de vaca UHT em seguida deixou em incubação por 3h em estufa a 37°C.

Para as extrações de DNA, considerou como controle negativo à amostra de leite UHT não inoculado e o controle positivo o isolado da bactéria. Após todos os procedimentos o DNA extraído foi armazenado a -20°C. Nos protocolos 1, 3 e 4 o DNA extraído foi ressuspensionado em 20µl de tampão TE (10mmol/L tris-HCl e 1mmol/L EDTA) após a completa evaporação do álcool da ultima etapa.

Protocolo 1 - Millar et al. (2000), adaptado:

Adicionou um (1) ml da solução de lavagem alcalina ao leite contaminado e homogeneizou em agitador e centrifugou a 17.760g por 20 min a temperatura de 4°C. Descartou o sobrenadante e ressuspendeu o precipitado em 100µl de tris-EDTA "TE". Em seguida, aqueceu a 96°C por duas horas em banho Maria, após o aquecimento (a etapa a seguir foi realizada nos protocolos 1,3 e 4) adicionou solução de clorofórmio – fenol (1:1) e homogeneizou. Centrifugou a 2600g por 5 min a 24°C. Adicionou a solução de clorofórmio ao sobrenadante e homogeneizou. Centrifugou a 2600g por 5 min a 24°C, e adicionou ao sobrenadante etanol 95% .Essa solução foi refrigerada por 1 hora a -70°C para a precipitação de DNA. Após este período, centrifugou a 17760g por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foi adicionado 500µl de etanol 70% para hidratar o DNA, repetiu a centrifugação e descartou o sobrenadante.

Protocolo 2 - Roxo et al. (2002), adaptado:

O leite foi submetido à fervura por 5 minutos a 100°C, em seguida, as amostras foram resfriadas e congeladas "overnight". A extração do DNA foi realizada adicionando 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), agitação e centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante e a

gordura branca em um volume aproximado de 500 μ l foram transferidos para um novo tubo, ao qual acrescentou igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados por 10 minutos, e submetidos à centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo, ao qual adicionou igual volume de álcool absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugados novamente. O sobrenadante foi desprezado por simples inversão do tubo. Os tubos foram novamente lavados com álcool absoluto, utilizando um volume de 100 μ L de álcool. Os tubos foram agitados por inversão e submetidos à centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado, deixando os tubos invertidos para secar. Após a secagem total do álcool, o DNA foi ressuspensionado com 50 μ L de H₂O destilada autoclavada.

Protocolo 3 - Caldart et al. (2011), adaptado:

O leite contaminado foi diluído 1:3 em solução de salina tamponada (PBS) pH 7,2 (137 mM NaCl; 2,7 mM de KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄). Em seguida, foi submetida à centrifugação a 1000 *g* por 10 min. Após a centrifugação, a gordura foi mecanicamente retirada e o sobrenadante desprezado. O sedimento, composto principalmente por células foi diluído em PBS e centrifugado por mais duas vezes. Em seguida, as células foram diluídas em 3 mL de PBS. Cada suspensão de células foi centrifugada a 600 *g* por 5 min sendo o sobrenadante descartado. Ressuspendeu o precipitado em 100 μ L de tris-EDTA "TE". Logo após, aqueceu a 96°C por duas horas em banho Maria. Similar ao protocolo 1

Protocolo 4 - Tampão NET e solução desnaturante:

Adicionou-se 100 mL de tampão NET (50 mM NaCl, 125 mM EDTA e 50 mM Tris-HCl) ao leite contaminado e homogeneizou por um minuto. Centrifugou por 13000 RPM a temperatura ambiente por 10 minutos e descartou o sobrenadante por inversão. Adicionou 200 μ l da solução desnaturante (50 μ L de 2,6N NaOH . 150 μ L de 24%SDS (concentração final de 3,4%) e incubou a 80-100°C por 10 min. Deixou esfriar no gelo. adicionou 100 μ l de solução de clorofórmio – fenol (1:1) e homogeneizou por 10 seg. Similar ao protocolo 1.

PCR

O protocolo de PCR empregado foi baseado nos trabalhos de Silva e Silva (2005) e Silva (2008). Utilizou a técnica da PCR para detecção do gene *femA*, que identifica o *S. aureus*. As condições de ciclagem para análise dos

genes *femA*, foram de 94 °C por cinco minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C , 30 segundos a 45°C e 30 segundos a 72°C, e incubação final de quatro minutos a 72°C.

Eletroforese em gel de Agarose:

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,1 µg/L de brometo de etídio em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 0,1 mM EDTA), a 100 V e 400 A por 50 minutos. Os produtos foram visualizadas sob iluminação de luz ultravioleta.

Análise estatística

Foi realizada análise estatística utilizando o software SISVAR 5.3. As variáveis não-paramétricas (pureza e concentração nos diferentes métodos de extração de DNA) foram analisadas por Anova complementado pelo Teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

O isolado de *Staphylococcus aureus* foi obtido de leite proveniente de vacas leiteiras com mastite e por inoculação em meio Sal Manitol e testes bioquímicos.

Com relação à pureza os resultados obtidos demonstraram que os protocolos dois e três apresentaram médias iguais estatisticamente, no entanto os protocolos um e quatro foram diferentes com as maiores médias para a relação A260/A280, porém com relação à concentração de DNA, as maiores concentrações foram obtidas no protocolo dois e diferiu estatisticamente dos demais protocolos com uma média da concentração de 354,92 ng/ul, as demais variaram, de 33 a 110 ng/ul, mas não apresentou diferença estatística entre si (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados qualitativos e quantitativos da extração de DNA genômico de amostras de leite contaminado

Método de Extração	N ^o amostras	Pureza ¹ (A260/A280)	Concentração (ng/ul) ¹	PCR (% de positividade / n ^o amostras positivas)
Protocolo 1	23	1,90 ^c	52,66 ^a	4,35 / 1
Protocolo 2	23	0,93 ^a	354,92 ^b	34,78 / 8
Protocolo 3	20	0,86 ^a	106,12 ^a	95 / 19
Protocolo 4	23	1,34 ^b	33,72 ^a	39,13 / 9

¹Média aritmética dos valores individuais obtidos nas amostras. ²Percentuais de amostras analisadas positivas para a amplificação do gene femA. a,b,c Comparação entre os valores de cada coluna, valores com a mesma letra sobrescrita não diferem estatisticamente.

Um dos aspectos essenciais para obter resultados de testes moleculares com a reprodutibilidade adequada é a integridade do DNA extraído. Diversos fatores necessitam ser analisados e comparados a fim de definir os pontos cruciais para a obtenção de um extraído íntegro e puro. A utilização da PCR, bem como suas variações, necessita ter garantida a ausência de fatores inibidores na amostra. Fatores que inibem a amplificação de ácidos nucléicos por PCR podem estar presentes em uma ou mais etapas essenciais do processo: na obtenção do DNA por lise celular, na atividade da DNA polimerase e na degradação ou captura dos ácidos nucléicos (WILSON, 1997).

Alguns pesquisadores realizaram extração de DNA bacteriano diretamente do leite, como no caso de Ramesh et al. (2005) conseguiram um limite de detecção de 10³UFC/mL individualmente e de 10⁴ UFC/mL simultaneamente para *S. aureus* e *Yersinia enterocolitica* em uma reação multiplex com dois pares de iniciadores, utilizando a combinação de solventes orgânicos, detergentes e álcalis no método de extração. Silva (2008) obteve um limite de detecção de microrganismos a partir da extração diretamente do leite de 10² UFC/mL pela técnica de PCR individual e 10³ UFC/mL pela técnica de PCR multiplex.

Ao analisar os resultados obtidos na PCR (gene FemA) foi encontrado que o melhor desempenho foi obtido no protocolo 3 com 95 % de positividade e o pior desempenho foi o protocolo 1 que apresentou apenas 4,35% de positividade. Os protocolos 2 e 4 apresentaram desempenho similar.

Na Figura 1, é possível visualizar o resultado da PCR nos diferentes protocolos e observar que no protocolo 3 das 20 amostras analisadas apenas 1 foi negativa. Comparando os protocolos 2 e 4 é possível verificar que os seus resultados são bem semelhantes porém o protocolo 4 apresentou bandas bem nítidas.

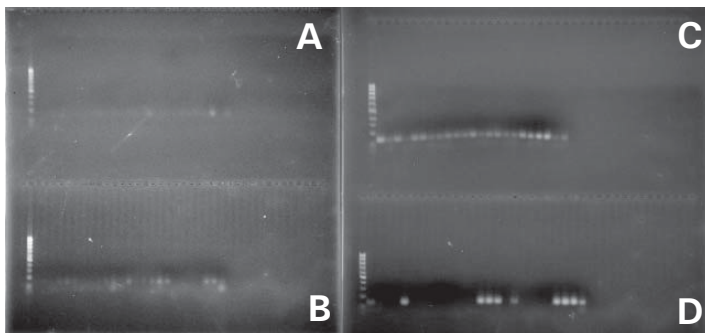


Figura 1. Gel de agarose mostrando fragmento de 132bp amplificado pela PCR em amostras de leite UHT contaminado com *Staphylococcus aureus* utilizando quatro protocolos de extração. a. Protocolo 1. b. Protocolo 2. c. Protocolo 3. d. Protocolo 4. – DNA ladder 100bp, isolado *S. aureus*, leite não infectado, amostras de 1 a 23 de leite contaminado.

O protocolo três utilizou solução tamponada e remoção da gordura mecanicamente o que pode ter influenciado no melhor desempenho para a extração de DNA visto que gordura interfere no processo de extração. No quatro que apresentou bandas bem nítidas, o leite foi submetido a incubação com tampão NET e solução desnaturante e a choque térmico. Esse procedimento pode ter purificado mais o DNA permitindo uma visualização melhor das bandas.

Alguns tipos de amostras como leite, carne, queijo, esporos, tem inibidores específicos de PCR, fazendo com que etapas adicionais devam ser realizadas nas extrações a fim de atenuar o efeito de inibidores (CECILIA et al., 2007). Diversos trabalhos apontam para a falha da amplificação por presença de gorduras e proteínas do leite no sedimento (MURPH et al., 2002, PSIFIDI, DOVAS; BANOS, 2009, WILSON, 1997), o que pode ser resolvido tratando previamente as células com detergente Tween 20 e/ou EDTA (CALDART et al., 2011).

Conclusões

Com os resultados obtidos pode-se concluir que o protocolo três apresentou o melhor desempenho na extração de DNA do *Staphylococcus aureus* diretamente do leite e o protocolo quatro apesar da menor porcentagem de positividade na PCR, apresentou bandas mais nítidas.

Concluindo que o protocolo número três pode ser utilizado para a extração de DNA de *Staphylococcus aureus* diretamente do leite contaminado.

Referências

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 1, n. 2, p. 1-10, 1999.

CALDART, E. T., CHIAPPETTA, C. M., LOPES E. F.; RAVAZZOLO. A. P. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n.1, p.945, 2011.

CECILIA S. M.; ESTRADA L.; VELÁZQUEZ L. C.; GENARO S.D.; GUZMÁN A.M.S. Comparison of DNA extraction methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection from meat food by nested PCR. **Food Research International**, v. 40,n. 5, p. 637-642, 2007.

COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 299-305, 2005.

DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta veterinária Brasilica**, v. 1, p. 23-27, 2007.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3. p. 1032-1035, 2000.

MILLAR, B. C.; JIRU, X.; MOORE, J. E. EARLE, J. A. P. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, p. 139-147, 2000.

MURPHY M. A.; SHARIFLOU M. R.; MORAN C. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 645-649, 2002.

PSIFIDI A., DOVAS C. I.; BANOS G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 24, n. 2, p. 93-98. 2009.

RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B. P.; CHANDRASHEKAR, A. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, p. 307-314, 2005.

ROXO, E. et al. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA de *Mycobacterium bovis* a partir de leite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p.46, 2002. Suplemento.

SAMBROOK, J., RUSSEL. D. W. **Molecular cloning: a Laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, CSHL, 2001.

SILVA, E.R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 260-264, 2005.

SILVA, M.A. **Utilização de PCR Multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina**. 2008. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.A. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.