

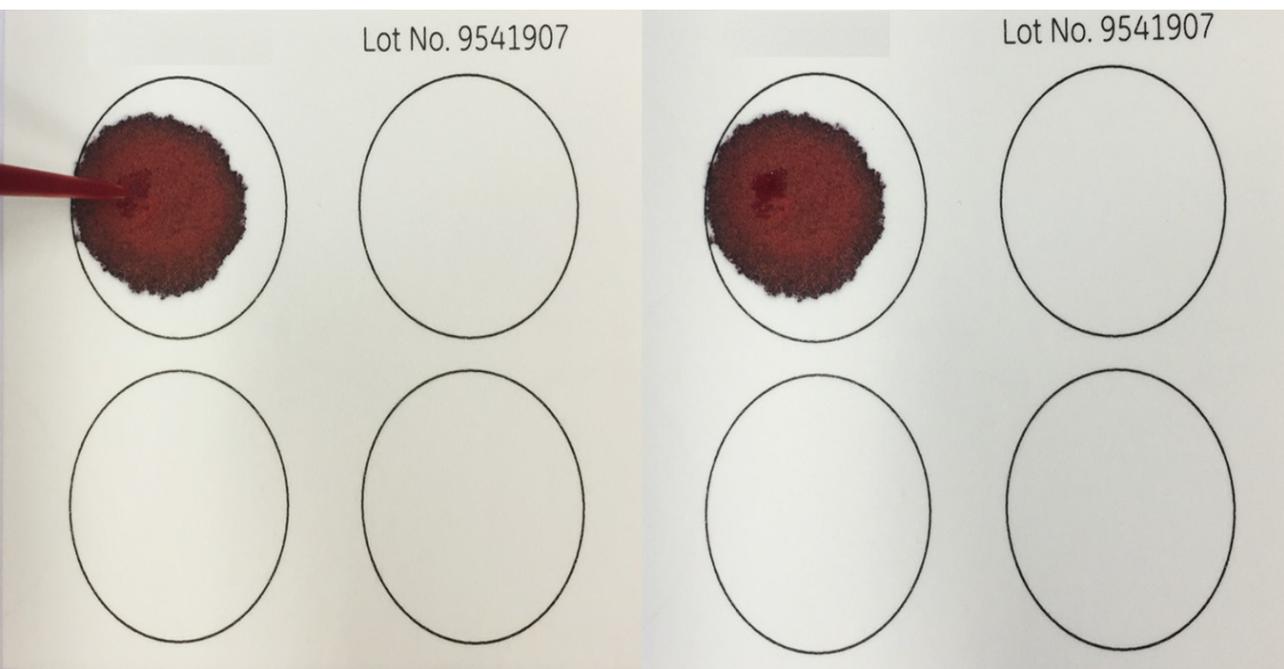
CIRCULAR TÉCNICA

78

São Carlos, SP
Agosto, 2018

Avaliação de métodos de extração de DNA de amostras de sangue de bovinos colhidas em papel filtro (cartões FTA)

Márcia Cristina de Sena Oliveira
Cintia Hiromi Okino
Pamella Cristina Silva
César Cristiano Bassetto
Rodrigo Giglioti



Avaliação de métodos de extração de DNA de amostras de sangue de bovinos colhidas em papel filtro (cartões FTA)¹

Atualmente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é usada de maneira sistemática em uma grande variedade de experimentos que envolvem detecção de micro-organismos e parasitas, estudos genômicos, sequenciamento, diversidade genética de populações, paternidade, entre outros. A extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de amostras de sangue é amplamente usada na pesquisa agropecuária. No entanto, a colheita dessas amostras em tubos a vácuo pode gerar um grande volume de material. Associada a esse problema, a necessidade de resfriamento dificulta o transporte até o laboratório, principalmente em estudos desenvolvidos em áreas rurais, de difícil acesso. A técnica de colheita de sangue em papel de filtro (cartão FTA) apresenta muitas vantagens, por ser simples, reduzir o volume e peso, e também por preservar as amostras sem a necessidade de refrigeração. Os cartões FTA são fabricados na forma de envelopes que contêm o papel de filtro com áreas delimitadas para aplicação das amostras. Essas áreas contêm reagentes que inativam e inibem o crescimento de micro-organismos, lisam as células sanguíneas e liberam o DNA, que é preservado contra a ação de nucleases, oxidação e raios ultravioleta. No papel, podem ser colocadas amostras de sangue em volume de até 500 µl, que devem ser expostas ao ar até secarem completamente e podem ser armazenadas sem refrigeração por até 17 anos (MERCK, 2018).

Nesse experimento, amostras colhidas em cartões FTA e da forma tradicional, em tubos a vácuo com anticoagulante EDTA, foram usadas para extrair DNA. O DNA obtido foi analisado quanto à sua pureza e quantidade, por espectrometria. Todas as amostras foram submetidas a um mesmo ensaio de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para detecção e quantificação do número de cópias de DNA de *Babesia bovis*, importante hemoparasita de bovinos, com a finalidade de validar a técnica de extração.

¹ Márcia Cristina de Sena Oliveira, Dra., Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste; Cintia Hiromi Okino, Analista da Embrapa Pecuária Sudeste; Pamella Cristina Silva, Centro Universitário Central Paulista; César Cristiano Bassetto, Unesp Jaboticabal; Rodrigo Giglioti, Unesp Jaboticabal.

Amostras de sangue

Foram usadas amostras de sangue colhidas de 32 bezerros criados na Fazenda Experimental da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos (21°57'42" S, 47°50'28" W e 860 m de altitude), SP. Essa região é considerada endêmica para a ocorrência do carrapato *Rhipicephalus microplus* e, conseqüentemente, para os agentes da babesiose bovina. As amostras de sangue foram colhidas de cada animal em sistema a vácuo, para preparar os quatro tipos de amostras: 30 µl de sangue da ponta da cauda (SPC) e da veia jugular (SVJ); essas mesmas amostras foram medidas e colocadas no cartão FTA (SPCFTA e SVJFTA). Todas essas amostras foram submetidas a protocolo de qPCR para a quantificação absoluta do número de cópias do DNA de *B. bovis*.

Extração de DNA

O protocolo #1 para pequenas amostras de sangue do kit Easy – DNA™ kit (Invitrogen™, Cat. n. K1800-01) foi usado nas extrações de DNA. Resumidamente, 30 µL de sangue e 100 µL de Solução A foram colocados em microtubos, homogeneizados com a ajuda do vórtex e incubados a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 40 µL de Solução B e uma nova homogeneização foi feita; posteriormente, foram adicionados 140 µL de clorofórmio, misturados com a ajuda do vórtex até a completa homogeneização das amostras. Os tubos foram então centrifugados a 5.000 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante (fase aquosa) foi cuidadosamente retirado com auxílio de uma pipeta e colocado em um microtubo limpo, com 445 µL de tampão TRIS-EDTA (TRIS HCl pH 8,0 10 mM, EDTA pH 8,0 1mM) e 5 µL de Mussel Glycogen. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado por inversão e o DNA foi precipitado com 1 mL de Etanol 100% gelado, a -20°C. As amostras foram mantidas em freezer por 12 a 14 horas, centrifugadas a 5.000 g por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi retirado com cuidado. O DNA foi novamente suspenso em 500 µL de etanol 80% (-20°C), homogeneizado por inversão e centrifugado a 5.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o etanol residual foi removido com ajuda de uma pipeta. Os tubos abertos foram colocados em fluxo laminar estéril até a completa secagem (cerca de uma hora) e os *pellets* foram adicionados de 30

μL de TE e armazenados a -20°C até o momento das quantificações. Para a extração a partir das amostras de sangue colhidas em cartão FTA, foi usado o mesmo protocolo com a inclusão do seguinte tratamento prévio: dois discos de papel impregnados com cada amostra foram colocados em microtubos de 1,5 mL e adicionados de 200 μL de solução tampão fosfato salina (PBS) pH 7,8 e 20 μL (20mg/mL) de proteinase K, e incubados a 65°C por 4 horas. Após esse período, os discos foram removidos com auxílio de uma ponteira e o conteúdo do tubo foi submetido ao mesmo protocolo usado para a extração de sangue total. Controles negativos foram preparados para cada lote de extração, com o uso de PBS no lugar das amostras de sangue, e de cartão FTA sem a amostra de sangue.

Análise do DNA extraído

A quantidade e a qualidade do DNA extraído das amostras de sangue foram estimadas em espectrofotômetro Nanodrop (Thermofisher) cujos limites de detecção encontram-se entre 2 e 15.000 ng/ μL . Foram medidas as absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, com 2 μL das amostras de DNA e TE como o branco (eluidor do DNA). As amostras de DNA obtidas em todos os protocolos, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose.

qPCR para *B. bovis*

As reações de qPCR foram processadas no equipamento CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), com o uso de oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam o gene que codifica o citocromo b de *B. bovis*. As reações foram preparadas para o volume final de 10 μL com os seguintes reagentes: 5,0 μL de SsoFast™ EvaGreen® Supermix; 0,3 μL de cada primer (Tabela 1) diluído a 10 μM ; 2,4 μL de água ultra pura e 2,0 μL de DNA da amostra teste. Foram utilizados tubos brancos em tiras (Low-Profile 0,2 ml 8-Tube Strips without Caps ref. TLS-0851, BioRad) e tampas óticas (Optical Flat 8-Cap Strips, ref. TCS-0803, BioRad). Para cálculo do número de cópias, curvas-padrão foram preparadas, com diluições seriadas de razão constante igual a 10, de DNA sintético – gBlocks® Gene

Fragments, contendo a sequencia alvo da qPCR (nt 88-279 – número de acesso: GQ214235.1).

Tabela 1. Sequência dos nucleotídeos dos *primers* utilizados na amplificação do DNA de *Babesia bovis* e o comprimento dos produtos de amplificação.

| Nome | Sequências 3' - 5' | Produto amplificado (bp) | Localização (nt) | Referência |
|-------------|------------------------|--------------------------|------------------|----------------------|
| Cbosg 1 (F) | TG TTCCTGGAAGCGTTGATTC | 88 | 135-222a | Buling et al. (2007) |
| Cbosg 2 (R) | AGCGTGAAAATAACGCATTGC | | | |

*Número de acesso: GQ214235.1

Todas as amostras de DNA e os controles foram testados em duplicata. As amostras que apresentaram desvio padrão > 0,5 foram testadas novamente, e, aquelas cujo número de cópias foi > 0, com a temperatura de *melting* (Tm) específica de 77,5 ± 0,5, foram consideradas positivas. Os ciclos adotados para as reações estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Ciclos adotados para as reações de qPCR.

| Etapa do Ciclo | Ciclos | Temperatura | Tempo |
|----------------------|--------|--------------------------------------|-------------------|
| Ativação enzimática | 1 | 98°C | 2 minutos |
| Desnaturação | 40 | 98°C | 10 segundos |
| Anelamento/extensão | | 60°C | 30 segundos |
| Curva de dissociação | 1 | 65°C a 95°C (incremento de 0,5°C) | 5 segundos/passos |

Todas as corridas atenderam aos padrões de eficiência da reação (E=95% a 105%), controle negativo da extração de DNA e da qPCR (NTC) sem amplificação, controle positivo da extração com o ciclo quantitativo (Cq) ≅ 25 ± 1,0.

Análise estatística dos dados

Os dados obtidos para o número de cópias (NC) do DNA de *B. bovis* foram transformados em $\log(n + 1)$ e analisados por meio de modelos mistos, por meio do procedimento PROC MIXED. Nesse modelo, foi incluído o efeito fixo de tipo de amostra (cauda e jugular a vácuo e em papel FTA), e o efeito aleatório de animal (amostra). As variáveis dependentes analisadas foram NC, concentração do DNA (ng/uL) e a razão de pureza do DNA (260/280nm). As médias foram comparadas pelo teste de *tukey* ($P < 0.05$). Todas as análises foram feitas com o uso do pacote estatístico SAS®.

Resultados

Todas as amostras de DNA foram avaliadas qualitativamente por meio de eletroforese em gel de agarose 2%, e se apresentaram íntegras (Figura 1).

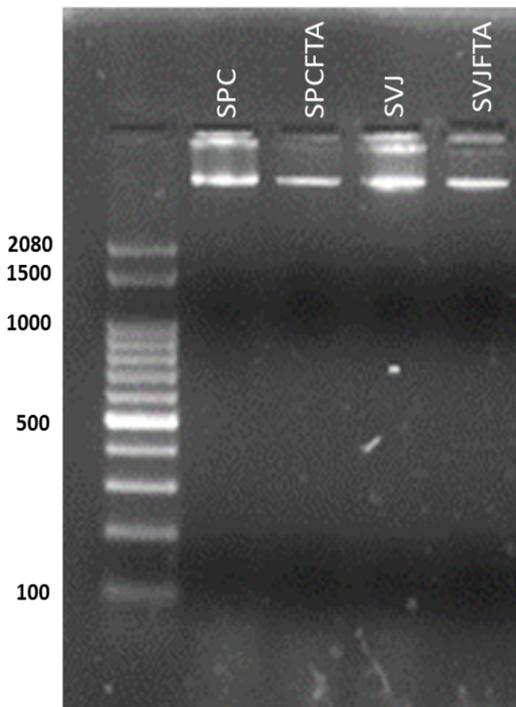


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 2% de DNA extraídos a partir de sangue da ponta da cauda (SPC), sangue da ponta da cauda em cartão FTA (SPCFTA), sangue da veia jugular (SVJ) e sangue da veia jugular em cartão FTA. À esquerda, o padrão de 1kb.

A Tabela 3 mostra as concentrações de DNA genômico, as relações 260/280 nm, os resultados qualitativos e as quantificações por qPCR para *B. bovis* das diferentes amostras testadas. As maiores e menores concentrações de DNA foram obtidas para as amostras de sangue da veia jugular (SVJ) e sangue da ponta da cauda (SPC), respectivamente ($P \leq 0.05$). Com relação à pureza do DNA, valores mais altos foram observados para as amostras SPCFTA e SVJ (Tabela 3), que alcançaram médias próximas do ideal ($\pm 1,80$) e não diferiram entre si ($P \leq 0.05$), enquanto as menores médias foram observadas para as amostras SPC. As amostras colhidas da ponta da cauda apresentaram os valores mais elevados de NC, diferindo significativamente dos valores obtidos para as amostras da veia jugular ($P \leq 0.05$). Apesar disso, as frequências de infecção determinadas pelo resultado positivo obtido nas amplificações por qPCR não diferiram entre todas as amostras testadas.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão da concentração de DNA genômico (ng/ μ L), relação 260/280 nm obtidas pela espectrometria, médias com desvios-padrão do número de cópias do DNA de *B. bovis* e frequência de resultados positivos estimados por qPCR.

| Tipos de amostras ^a | Espectrometria | | qPCR para <i>B. bovis</i> | |
|--------------------------------|--|---|---|---|
| | Médias (\pm desvio padrão) da concentração de DNA (ng/ μ L) | Médias (\pm desvio padrão) da pureza do DNA (relação 260/280 nm) | Médias (\pm desvio padrão) do número de cópias (log10) | Resultado qualitativo (% de amostras positivas) |
| SPC | 24,68 \pm 13,52cd | 1,43 \pm 0,16c | 1,69 \pm 0,93a | 100 (32/32) a |
| SPCFTA | 37,45 \pm 14,43b | 1,78 \pm 0,40a | 1,66 \pm 1,06a | 93,75 (30/32) a |
| SVJ | 72,16 \pm 41,64a | 1,75 \pm 0,06a | 1,15 \pm 0,83b | 84,37 (27/32) a |
| SVJFTA | 28,03 \pm 15,68bc | 1,62 \pm 0,30b | 1,02 \pm 0,75b | 87,50 (28/32) a |

aSPC = sangue da ponta da cauda; SPCFTA= sangue da ponta da cauda em cartão FTA; SVJ = sangue da veia jugular; SVJFTA= sangue da veia jugular em cartão FTA.*Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0.05$).

Conclusões

Podemos concluir que amostras de sangue colhidas em papel FTA podem ser boas alternativas para a preservação das amostras de sangue de grandes rebanhos, produzindo DNA em concentrações, integridade e pureza adequados, e com sensibilidade de detecção de DNA de hemoparasitas por qPCR equivalente ao método tradicional de extração de DNA. Embora o custo relativo a insumos por amostra seja de aproximadamente R\$ 7,35 a mais para a extração a partir de sangue em cartão FTA (o custo por reação feita com sangue colhido com sistema a vácuo é de cerca de R\$ 15,00), por não necessitar de acondicionamento em temperaturas especiais, esse custo adicional pode ser equivalente ao de manutenção das amostras em freezers e geradores, dependendo do tempo de estocagem. Enfim, em vista da praticidade de transporte e armazenamento de amostras, desempenho similar comparado ao método tradicional de extração de DNA, o que possibilita ainda o transporte nacional e internacional, e em razão da inativação de patógenos, o método aqui apresentado tem potencial para uso em diagnósticos de hemoparasitas de bovinos, estudos de genotipagem e estudos epidemiológicos em geral.

Bibliografia

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBA-CARRETERO, J. C.; FLORIN-CRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *B. bovis* and *B. bigemina*. **Vet. Parasitol.** v.147, n. 1-2, p.16-25, 2007.

CHOI, E.; LEE, S. K.; IHM, C.; SOHN, Y. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potencial applications in biobanking. **Osong Public Health Res. Perspect.**, v.5, n.6, p.351-357, 2014.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N.; IBELLI, A. M. G.; BILHASSI, T. B.; NÉO, T. A.; SANTANA, C. H.; RABELO, M. D.; MACHADO, R. Z.; CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S. Neither quantification by qPCR nor quantitative Elisa can be used to discriminate Angus cattle for resistance/susceptibility to *Babesia bovis*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.8, n.3, p.335–340, 2017.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N.; SANTANA, C. H.; IBELLI, A. M. G.; NÉO, T. A.; BILHASSI, T. B.; RABELO, M. D.; MACHADO, R. Z.; BRITO, L. G.; OLIVEIRA, M. C. S. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, n.5, p.657-662, 2016.

MERCK. Whatman FTA card technology. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/whawb120205?lang=pt®ion=BR&gclid=EAlalQobChMI9rPrmceF3AIVxAeRCh2pmAHdEAAAYASAAEgLGyVD_BwE>. Acesso em: 04 jul. 2018.

MIGUEL, R. B.; COURA, J. R.; SAMUDIO, F.; SUÁREZ-MUTIS, M. C. Evaluation of three different DNA extraction methods from blood samples collected in dried filter paper in *Plasmodium* subpatent infections from the Amazon region in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.55, n.3, p.205-208, 2013.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; LAVINIKI, V.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; NASCIMENTO, V. P. do. Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de *Salmonella* spp. isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.4, pub.1073, 2012.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234, Caixa Postal 339
13560-290, São Carlos, SP
Fone: (16) 3411-5600
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª edição on-line: 2018



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

GOVERNO
FEDERAL

Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável

Presidente

Alexandre Berndt

Secretário-Executivo

Simone Cristina Méo Niciura

Membros

*Emilia Maria Pulcinelli Camarado, Mara
Angélica Pedrochi, Maria Cristina Campanelli
Brito, Milena Ambrosio Telles, Simone Cristina
Méo Niciura*

Revisão de texto

Milena Ambrosio Telles

Normalização bibliográfica

Mara Angélica Pedrochi

Editoração eletrônica

Maria Cristina Campanelli Brito

Foto da capa

Cintia Hiromi Okino