

Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes

Comparative Analysis of Genomic DNA Extraction Methods from Small Ruminant Blood and Milk Cells

Eloiza Teles Caldart*, Catarina Marcon Chiappetta, Eliana Franco Lopes & Ana Paula Ravazzolo

ABSTRACT

Background: Genomic DNA (gDNA) extraction allows genetic material accessible to apply molecular techniques for diagnostic and/or genomic characterization. The main goal of this work was to analyze comparatively three manual methods of genomic DNA extraction - DNAzol, FTA and Silica - evaluating quality and yield of the nucleic acids obtained.

Materials, Methods & Results: Small ruminant blood and milk samples were submitted to the three extraction methods and maintained at -20°C for different periods of time: four to twelve months. DNA sample purity was estimated by spectrophotometric determination through the ratio between the optical density values obtained at wavelengths of 260 nm and 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀), and, indirectly, by the PCR amplification of the GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) housekeeping gene. DNA concentration was also determined by spectrophotometry. In order to validate the comparison, statistical analysis were performed with the variables purity, concentration and PCR from the three different methods to both samples blood and milk. The cost and the time consumed to each method were estimated considering the reagents used. The results obtained have showed a great purity level (mean values of 1.61 to 1.88) in the samples extracted by DNAzol and Silica, maintained during 4 months at -20°C. Percentage of PCR positive results were greater to the samples extracted by DNAzol from blood as well as from milk. Although the highest DNA concentrations were detected in the samples extracted by FTA, this method has presented the lowest values of purity and the lowest percentage of PCR positive results. When comparing the two types of samples, the average of all PCR positive results was greater to the samples extracted from blood. In the same way, when analyzing the mean purity value all samples included, blood samples presented a better ratio than the milk counterparts, suggesting the presence of PCR inhibitors in the latter.

Discussion: The results obtained did not permit to establish a relationship among sample time of maintenance at -20°C and variables of purity and concentration. On the other hand, PCR positive results were significantly greater to the samples extracted by DNAzol and FTA maintained frozen for 12 and 9 months than to those maintained for 4 months. The DNAzol extraction cost was slightly superior to the other two methods which presented similar results. The time consumed by the three methods was equally similar for both samples analyzed. Statistical analysis has permitted to confirm the results obtained, as well as show the reproducibility of the extraction methods. In the conditions used in this work, the method that presented the best performance was DNAzol followed by Silica, regardless of the sample type. Genomic DNA samples from milk have showed the lowest percentage of PCR positive results which suggest the need to include additional protocol steps in order to eliminate putative inhibitors of PCR. In conclusion, the variables analyzed have permitted determining the best extraction method to obtain gDNA to be used in PCR.

Keywords: genomic DNA extraction, blood, milk, small ruminants, PCR.

Descritores: extração de DNA genômico, sangue, leite, pequenos ruminantes, PCR.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, avanços na biologia molecular têm possibilitado o uso rotineiro de técnicas como PCR e seqüenciamento de DNA no diagnóstico [12], na vigilância e na epidemiologia de doenças infecciosas [22], além de estudos de mapeamento do genoma [13].

DNA genômico (DNAg) pode ser obtido a partir de sangue total, leite, coágulo, bulbo piloso, saliva, urina, entre outros. O sangue total de origem venosa é o mais comumente utilizado, por conter grandes quantidades de DNA e por ser um material com baixa incidência de contaminação [7]. O uso do leite, como fonte de DNAg, reduziria o estresse causado aos animais, além de possibilitar o uso de *pools* de amostra para diagnóstico em nível de rebanho [16].

Tradicionalmente, antes do advento de *kits*, a extração do DNAg consistia de três etapas principais: lise das células, purificação e precipitação. As metodologias atuais empregam os mesmos princípios básicos, mas podem apresentar diferenças que residem, principalmente, na etapa de purificação e precipitação. Estas podem ser substituídas e/ou acrescidas de etapas de afinidade do DNA em “suportes específicos” como colunas de sílica, esferas magnéticas e papéis filtro [7].

Um método de extração eficiente que nos forneça DNAg livre de inibidores, íntegro e em quantidade

suficiente é crucial para garantir a sensibilidade das técnicas moleculares [20]. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise comparativa de três métodos de extração: DNAzol®¹, FTA®² e Sílica, a partir de leite e sangue de pequenos ruminantes. Avaliou-se a qualidade e quantidade dos ácidos nucleicos obtidos e submetidos a diferentes tempos de estocagem.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais e amostras

Amostras de sangue e leite de caprinos (n=12) e ovinos (n=36) foram coletadas em duas propriedades leiteiras do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O sangue foi coletado da veia jugular com anticoagulante (heparina) e mantido sob refrigeração por 12 h. As amostras de leite foram coletadas minutos antes da ordenha, em tubos estéreis, diretamente do teto higienizado e mantidas sob refrigeração por 24 h.

Após extração do DNAg pelos diferentes métodos (item 2), as amostras foram submetidas a diferentes tempos de estocagem antes da avaliação da pureza, concentração e reação de PCR (ver abaixo). O número de amostras de sangue e leite analisadas em cada método e nos diferentes tempos de estocagem é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados qualitativos e quantitativos da extração de DNA genômico de amostras de sangue total e leite por três métodos manuais, analisados em dois diferentes tempos de estocagem.

Método de Extração	Nº de amostras	Tempo ¹ de estocagem	Sangue			Leite				
			Pureza ² (A260/A280)	Concentração ² (ng/ml)	PCR ⁴ (%)	Nº de amostras	Tempo ¹ de estocagem	Pureza ² (A260/A280)	Concentração ² (ng/ml)	PCR ⁴ (%)
DNAzol	27	4	1,83 ^b	55,37 ^a	62,90	32	4	1,62 ^b	72,19 ^b	31,25 ^b
	12	12	1,50 ^b	58,33 ^a	91,66	10	9	1,42 ^b	115,00 ^b	90,00 ^b
FTA	36	4	0,91 ^a	161,11 ^b	8,33	36	4	0,86 ^a	70,42 ^b	19,44 ^c
	12	12	0,95 ^a	205,00 ^{3b}	75,00	10	9	1,08 ^a	487,00 ^{3c}	50,00 ^b
Sílica	30	4	1,88 ^b	64,17 ^a	83,33	26	4	1,61 ^b	64,42 ^b	38,46 ^b
	12	12	1,33 ^b	40,00 ^a	41,70	10	9	1,33 ^b	48,50 ^a	60,00 ^b

¹Tempo de estocagem do DNA extraído a -20°C, em meses, antes da realização da PCR. ²Média aritmética dos valores individuais obtidos nas amostras. ³Concentração corrigida devido ao maior volume de eluição (200 mL) do DNA. ⁴Percentuais de amostras analisadas positivas para a amplificação do gene GAPDH. ^{a,b,c} Comparação entre os valores de cada coluna, valores com a mesma letra sobrescrita não diferem estatisticamente.

2. Extração de DNA

Com a finalidade de obter um número maior de células mononucleares do sangue periférico para a extração, 1 mL de sangue heparinizado foi submetido à centrifugação a 600 g (Eppendorf Centrifuge 5415 C) por 6 min. Após, foram coletados 100 µL do anel leucocitário para cada método de extração.

Alíquotas de 10 mL de leite foram diluídas 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) e submetidas à centrifugação a 1000 g (Hettich Zentrifugen Rotofix 32) por 10 min. Após a centrifugação, a gordura foi mecanicamente retirada com o auxílio de uma bucha de algodão 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, sendo destinado 1 mL da suspensão para cada um dos métodos de extração: DNAzol, FTA e extração por Sílica [2]. Cada suspensão de células foi centrifugada a 600 g por 5 min (Eppendorf Centrifuge 5415 C), sendo o sobrenadante descartado e o sedimento congelado a -20°C. O sedimento foi diluído em 100 µL de PBS antes do início da extração.

2.1 FTA

Quinze microlitros dos 100 µL obtidos a partir de células do leite e do anel leucocitário, conforme descrito acima, foram aplicadas em cartões FTA de 6 mm de diâmetro, os quais foram utilizados para a extração do DNAg utilizando o Reagente de Purificação FTA, segundo instruções do fabricante. O DNAg foi eluído do cartão FTA conforme instruções de eluição do fabricante. Brevemente, para um volume final de 200 µL, foram adicionados o cartão FTA e 70 µL de solução alcalina (0,1 N NaOH; 0,3 mM EDTA, pH 13) a um microtubo de 1,5 mL, permanecendo a temperatura ambiente por 5 min. Após, 130 µL de solução neutra (0,1 M Tris-HCl, pH 7) foi acrescentada e homogeneizada em vórtex. A solução resultante foi incubada a temperatura ambiente por 10 min e homogeneizada novamente. O cartão foi removido e o DNA eluído, congelado a -20°C.

Os extraídos de sangue e leite por FTA estocados por 12 e por 9 meses foram eluídos em 200 µL, conforme instruções do fabricante. Os DNAg extraídos estocados por 4 meses foram eluídos em 50 µL com a finalidade de padronizar o volume de eluição dos

métodos. Nos casos em que o DNA presente no cartão FTA foi eluído em 50 µL, foram usados 17 µL de solução alcalina e 33 µL de solução neutra.

2.2 DNAzol e Sílica

As extrações de DNAg a partir dos sedimentos de 100 µL obtidos das amostras de sangue e leite realizadas por DNAzol seguiram as instruções do fabricante e, quando utilizado o método de Sílica foram conforme Boom *et al.* [2]. Os volumes finais dos eluídos foram de 50 µL.

Os extraídos resultantes dos métodos DNAzol e Sílica foram diluídos em água ultra pura (Milli-Q, Millipore) na proporção 1:6,6 antes da PCR com a finalidade de equiparar as quantidades iniciais de células utilizadas em cada método, considerando que, para Sílica e DNAzol usamos 100 µL de amostra de células do leite/sangue e para FTA usamos 15 µL.

3. Pureza e concentração do DNA

A concentração e a pureza de cada extraído foram determinadas por espectrofotômetro (GE Gene Quant 1300). A razão entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm foi usada para aferir a pureza do DNA, sendo que razões entre 1,6 e 2 foram consideradas aceitáveis para amplificação por PCR [11]. A concentração foi calculada como descrito anteriormente [19].

4. Inibição da PCR e integridade do DNA extraído

A presença de possíveis inibidores da PCR e a integridade das amostras de DNAg foram aferidas através de amplificação do gene constitutivo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) [18]. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 50 ng de cada oligonucleotídeo, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1,25 U de Taq DNA polymerase³ e 1 µL de DNA, dos 50 µL do eluído. Para efeitos comparativos foram utilizados 4 µL de DNA das amostras extraídas por FTA eluídas em 200 µL. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador sob luz UV.

5. Estimativa de custo e de tempo

O valor estimado da extração de DNA, por amostra, em cada protocolo, considerou os preços dos reagentes e materiais utilizados. No entanto, o custo da mão-de-obra e o desgaste dos equipamentos não foram incluídos. O tempo de execução de cada método foi calculado pelos minutos necessários para processar um grupo de, no máximo, dez amostras.

6. Análise estatística

Foi realizada análise estatística com base no banco de dados completo utilizando o software SPSS 16⁴ [5]. As variáveis não-paramétricas (pureza, concentração e resultado da PCR nos diferentes métodos de extração de DNAG) foram analisadas por Anova complementado pelo Teste de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5%. Para verificar os grupos estatísticos formados pelos diferentes métodos utilizou-se o teste de complementação de análise não-paramétrico, utilizando a ordenação (*ranks*) de ANOVA não-paramétrica.

RESULTADOS

Pureza

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), os métodos que resultaram em DNAG com maior grau de pureza correspondem às extrações de sangue e leite por DNAzol e Sílica, analisadas após 4 meses de estocagem. Formando o grupo de menor grau de pureza estão as amostras extraídas por FTA. Analisando-se quanto ao maior tempo de estocagem, as amostras de sangue e leite extraídos por DNAzol e Sílica estocadas por 12 e por 9 meses, respectivamente, apresentaram razões de pureza entre 1,1 e 2. Comparando os tipos de amostra (sangue e leite) notamos que as melhores razões de pureza foram encontradas em amostras obtidas a partir do sangue. Os extraídos de FTA foram submetidos a dois diferentes volumes de eluição (200 e 50 μ L, item 2.1), no entanto, essa variação não afetou significativamente a pureza dos extraídos.

Concentração

Verificamos, na Tabela 1, que as mais altas concentrações de DNA encontradas nos extraídos de sangue correspondem ao método FTA (amostras apresentando concentrações entre 10 e 780 ng/ μ L), enquanto que os demais métodos apresentaram concentrações variando de 5 a 410 ng de DNA por μ L de eluído, não apresentando diferença estatística entre si.

As maiores concentrações foram encontradas quando o DNA foi extraído do leite, sendo que o método em que se obteve os maiores valores foi o FTA em amostras estocadas por 9 meses (100 a 2.040 ng/ μ L). Os métodos de extração Sílica e DNAzol, apresentaram concentrações entre 5 e 590 ng/ μ L com diferença estatística entre si quando usados para extrair DNAG de leite. Analisando os diferentes volumes de eluição

dos extraídos por FTA, observou-se que a quantidade de DNA recuperado do cartão aumentou em ambos os tipos de amostras para o maior volume de eluição (200 μ L).

Inibição da PCR e integridade do DNA extraído

Os resultados positivos para a amplificação do gene GAPDH mostraram a efetiva extração dos ácidos nucleicos, a presença de DNAG íntegro, a não inibição total da PCR por substâncias presentes inicialmente na amostra ou em resíduos do método de extração.

Ao analisar os resultados obtidos (Tabela 1) verificamos que, dentre as amostras de sangue e leite estocadas por menor período de tempo (4 meses), o melhor desempenho foi apresentado pelo método de Sílica seguido pelo método DNAzol. Embora, para ambas as amostras, os dois métodos não apresentem diferenças significativas na PCR. Para o mesmo período de estocagem, o percentual de amplificação de extraídos de leite foi inferior ao de sangue, com exceção do método FTA que apresentou 19,44% das amostras de leite positivas e apenas 8,33% das de sangue.

Dentre as amostras extraídas de sangue estocadas por maior período de tempo (12 meses), o melhor desempenho foi apresentado pelo método de DNAzol (91,66%) seguido pelo método FTA (75%). As amostras de leite estocadas por maior período de tempo (9 meses) apresentaram percentual de amplificação entre 50% e 90%, sendo que o método DNAzol continuou apresentando o melhor desempenho, seguido, dessa vez, pelo método de Sílica. De um modo geral, o percentual de amplificação das amostras de sangue foi superior ao percentual das de leite, com exceção do método de Sílica, que apresentou 60% das amostras de leite positivas e apenas 41,70% das de sangue.

Estimativa de custo e de tempo

As estimativas de custo e tempo para cada método de extração de DNA estão apresentadas na Tabela 2. A extração por FTA foi a mais rápida, enquanto que as extrações por DNAzol e Sílica apresentaram tempos similares. Além disso, verificamos que as extrações de DNAG a partir de leite apresentaram acréscimo de uma hora quando comparadas às extrações realizadas a partir de sangue.

O custo por amostra foi similar entre os métodos, sendo a extração pelo método DNAzol a mais onerosa, tanto para amostras de sangue quanto de leite.

Tabela 2. Análise de custo e tempo necessário para extração de DNA genômico a partir de sangue e leite de acordo com o método utilizado.

Método de extração	Amostra	Custo ³ (R\$)	Tempo ⁴ (min)
DNAzol ¹	leite	6,36	140
	sangue total	6,30	80
FTA ²	leite	5,55	118
	sangue total	5,49	57
Sílica	leite	5,83	132
	sangue total	5,77	71

¹Conforme protocolo, são necessários dois dias para a solubilização do DNAg.

²Não foi considerada uma hora de espera para secagem dos cartões, após a aplicação das amostras. ³Custos de mão-de-obra e desgaste de equipamentos não foram contabilizados. ⁴Minutos necessários para processar, no máximo, dez amostras.

Análise estatística

A análise estatística descritiva permitiu verificar que a variável concentração apresentou coeficiente de variabilidade maior do que 50%. Além disso, os dados não apresentaram distribuição normal nas três variáveis, nem puderam ser transformados, fazendo com que fosse utilizada uma análise não-paramétrica. Devido à natureza do teste, as características dos dados supracitados e o diferente número de amostras analisadas em cada método (Tabela 1) não influenciaram nos resultados. Os valores de *p* encontrados na comparação das amostras de sangue dentro de cada uma das três variáveis, pureza ($P < 0,001$), concentração ($P = 0,001$) e PCR ($P < 0,001$) confirma que elas diferem estatisticamente, o que também ocorreu nas amostras de leite, pureza ($P = 0,003$), concentração ($P = 0,001$) e PCR ($P < 0,001$).

DISCUSSÃO

Um dos aspectos essenciais para obter resultados de testes moleculares com a reprodutibilidade adequada é a integridade do DNA extraído a partir de diferentes fontes. Diversos fatores necessitam ser analisados e comparados a fim de definir os pontos cruciais para a obtenção de um extraído íntegro, puro e que permita a estocagem, sem que haja degradação do DNA. A utilização da PCR, bem como suas variações como a PCR em tempo real (qPCR), necessitam ter garantida a ausência de fatores inibidores na amostra. Fatores que inibem a amplificação de ácidos nucleicos 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 nucleicos [23].

No presente estudo, foram avaliados dois tipos de amostra, sangue e leite, e três métodos de extração, FTA, DNAzol e Sílica. Comparando-se os resultados dos dois tipos de amostras, considerando-se o total de analisadas pelos três métodos, o DNAg extraído a partir do sangue foi o que apresentou melhores resultados. A média de reações positivas de PCR das amostras de sangue foi de 60,48%, enquanto que para as amostras de leite foi de 48,19%. Embora as amostras de leite tenham apresentado um menor percentual de positividade na PCR, as concentrações de DNAg seriam suficientes para a amplificação. No entanto, o valor de pureza foi inferior, o que seria indicativo da presença de fatores inibidores que nenhum dos três métodos foi capaz de eliminar.

Além das análises já descritas, foram avaliados diferentes tempos de estocagem do extraído até a realização da PCR. Com exceção das amostras de sangue extraídas pelo método da Sílica, todas as outras amostras apresentaram maiores percentuais na PCR quando mantidas à -20° C por maior período de tempo. Este fato poderia ser explicado pela inativação de nucleases presentes, as quais teriam sido inativadas pelo período de congelamento maior. Salientando-se, ainda, que nas amostras de sangue extraídas por Sílica e estocadas por 12 meses foi onde se obteve a menor média na concentração de DNA, o que poderia explicar a exceção citada acima. Outras justificativas poderiam ser a

maior solubilização da amostra e a precipitação de fatores inibidores, que não teriam sido carregados na PCR.

Na comparação entre os métodos de extração, o DNAzol mostrou ser o mais eficiente em conservar íntegro o DNA extraído de amostras de leite por 9 meses e de sangue por 12 meses, com percentual de amplificação de 90% e 91,66%, respectivamente, sendo o mais indicado nos casos em que se deseja estocar DNA. Alguns trabalhos avaliaram o tempo de estocagem como fator de interferência na integridade do DNA [1,21], enquanto que outros ainda verificaram o quanto os ciclos de congelamento e descongelamento podem levar a degradação do mesmo [10]. Trabalhos anteriores afirmam que DNA extraído e mantido à temperatura de - 20°C permanece viável à amplificação durante o período mínimo de um ano [21]; além disso, indicam o uso de β -mercaptoetanol para prevenir danos oxidativos em ácidos nucleicos estocados por longos períodos [9]. As amostras analisadas no presente estudo sofreram descongelamentos durante o período de estocagem devido à necessidade de manipulação, o que poderia explicar a perda de integridade de alguns dos extraídos. Considerando que, a determinadas temperaturas, as endonucleases que não tivessem sido retiradas ou inativadas durante o processo de extração poderiam atuar.

Em relação ao método FTA, quando usado o protocolo de eluição indicado pelo fabricante (200 μ L) obtivemos percentuais de amplificação e concentrações de DNA significativamente maiores aos obtidos nas amostras em que o DNAg foi eluído em 50 μ L. Embora tenhamos obtido concentrações suficientes para realização da PCR, o grau de impureza apresentado pelo método FTA foi maior do que o observado nos outros métodos. Observou-se durante o procedimento de extração de sangue com FTA que, mesmo aumentando o número de lavagens do cartão, o eluído permanecia avermelhado, indicando a presença de hemoglobina, reconhecido fator de inibição da PCR [23]. Este fato explicaria porque as amostras de leite apresentaram maiores percentuais de amplificação do que as de sangue, quando estocadas por 4 meses. Alguns autores analisaram esse método de extração e concluíram que não é a melhor alternativa, pois apenas pequenos volumes de amostra podem ser aplicados no cartão [17] ou, é a melhor alternativa nos casos em que se necessita inativação dos patógenos [15]. Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa [4] mostraram que, em casos de grandes concentrações de DNA-alvo, o método FTA pode ser empregado gerando bons

resultados, o que também é sugerido por outros autores [3].

Analisando os valores de pureza e concentração da totalidade de amostras extraídas de sangue, independente do tempo de estocagem, observamos que para cada método isoladamente não houve diferença significativa. Este fato indicaria a reprodutibilidade dos métodos de extração. Por outro lado, nas amostras extraídas de leite, a reprodutibilidade dos métodos foi observada apenas nos dados referentes à pureza. Quanto à concentração, apenas o método DNAzol não apresentou diferença significativa. A diferença de concentração observada entre os tipos de amostras, sangue e leite, poderia ter sido influenciada pelo número de células presentes na amostra de leite, que apresentaria maior variabilidade que no sangue [18]. Ainda, os métodos analisados no presente estudo não foram desenvolvidos para extração de DNAg de leite, o que poderia justificar a falta de reprodutibilidade nesse tipo de amostra.

Em média, obtivemos nesse trabalho um baixo percentual de reações positivas para a amplificação do gene GAPDH (54,34%) [7]. O baixo índice de pureza (<1,6) encontrado em grande parte das amostras analisadas provavelmente contribuiu para a inibição da PCR. Os índices observados podem ser decorrentes da contaminação por proteínas e/ou resíduos de reagentes dos métodos de extração. O método que apresentou maior percentual de PCR positiva foi o DNAzol, que também atingiu os maiores índices de pureza. Autores que analisaram o uso de DNAzol como alternativa para extração de DNAg de fungos altamente inibidores da reação de PCR também encontraram melhores resultados com esse reagente [8] quando comparado aos demais estudados. Em determinadas situações, a diluição de amostras com inibidores é uma saída rápida para que haja amplificação [23].

Com base nos dados gerados nesse estudo verificamos que os melhores resultados de amplificação foram obtidos a partir das amostras de sangue. A explicação para um menor percentual de amplificação em amostras de leite quando comparadas às de sangue não seria a concentração, pois todos os métodos apresentaram DNAg suficiente para tal. 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 [6]. Diversos trabalhos apontam para a falha da amplificação por presença de gorduras e proteínas do leite no sedimento [14,16,23], o que pode

ser resolvido tratando previamente as células com detergente Tween 20⁵ e/ou EDTA⁶.

Finalmente, na análise de custo e tempo despendidos para extração de DNAg, observou-se que a partir do leite obtivemos valores maiores quando comparados ao sangue. Entretanto, a possibilidade do uso de *pools* de amostra para diagnóstico em nível de rebanho [14] tornaria essas diferenças irrelevantes. O custo dos reagentes para extração por DNazol foi um pouco mais alto que os outros; no entanto, considerando-se a necessidade de estocagem do DNA, esse seria um investimento essencial.

CONCLUSÕES

Mesmo que o desempenho analítico seja o primeiro critério observado para a escolha do método de extração de DNAg, outros fatores devem ser levados em conta: necessidades do usuário, tipo de amostra, custo, flexibilidade do método, facilidade e tempo de manuseio, infra-estrutura do laboratório, entre outros. Neste estudo, dentre os métodos analisados, o DNazol seria o de escolha no caso de necessidade de estocagem de DNA extraído de sangue e leite. Nas amostras de leite, os resultados obtidos indicari-

am a necessidade de inclusão de etapas adicionais para remoção dos prováveis inibidores. No caso de necessidade de extração de DNA para uso imediato, a extração por Sílica poderia ser indicada. A extração de DNA a partir de cartões FTA utilizando Reagente de Purificação FTA e posterior eluição não apresentou bons resultados sob as condições desse estudo quando comparados aos outros dois métodos.

NOTAS INFORMATIVAS

¹Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA.

²Whatman - Flinders Technology Associates filter paper, Maidstone, Inglaterra.

³Centro de Biotecnologia (CENBIOT), Porto Alegre, Brasil.

⁴Software SPSS (*Statistical Package for Social Science*) Incorporation - IBM Company, Chicago, EUA.

⁵Reagen, Boqueirão, Brasil.

⁶Merck, Darmstadt, Germany.

Agradecimentos. Os autores agradecem à professora Verônica Schmidt pelo auxílio na coleta de amostras caprinas e ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo fornecimento dos *kits* de extração por Sílica.

REFERÊNCIAS

- 1 Bitencourt J.V.T., Roratto P.A., Bartholomei-Santos L.M. & Santos S. 2007. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(6): 989-994.
- 2 Boom R., Sol C.J., Saliman M.M., Jansen C.L., Wertheim-Van Dillen P.M. & Noorda V.D. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(3): 495-503.
- 3 Brassard J., Lamoureux L., Gagné M.J., Poitras E., Trottier Y.L. & Houde A. 2009. Comparison of commercial viral genomic extraction kits for the molecular detection of foodborne viruses. *Canadian Journal Microbiology*. 55(8): 1016-1019.
- 4 Caldart E.T., Gonçalves K.R., Campesato L.F.L., Junior N.S.S., Lopes E.F. & Ravazzolo A.P. Comparação entre Métodos de Extração de DNA para Determinação de Carga Viral de PCV2. In: *Resumos dos XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS* (Porto Alegre, Brasil). p.139.
- 5 Campos H. 1983. *Estatística Experimental Não-Paramétrica*. 4th edn. Piracicaba: ESALQ/USP, 230p.
- 6 Cecilia S.M., Estrada L., Velázquez L.C., Genaro S.D. & Guzmán A.M.S. 2007. Comparison of DNA extraction methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection from meat food by nested PCR. *Food Research International*. 40(5): 637-642.
- 7 Clements D.N., Wood S., Carter S.D. & Ollier W.E.R. 2008. Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. *Research in Veterinary Science*. 85(1): 74-79.
- 8 Guo J.R., Schnieder F., Abd-Elsalam K.A. & Verreet J.A. 2005. Rapid and efficient extraction of genomic DNA from different phytopathogenic fungi using DNazol reagent. *Biotechnology Letters*. 27(1): 3-6.
- 9 Herzer S. 2001. DNA Purification. In: *Molecular Biology Problem Solver: a laboratory guide*. New York: Wiley-Liss, pp.167-196.
- 10 Lahiri D.K. & Schnabel B. 1993. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl₂, EDTA, storage time and temperature on DNA yield and quality. *Biochemical Genetics*. 31(7-8): 321-328.

- 11 Lee J.H., Park Y., Choi J.R., Lee E.K., & Kim H.S. 2010. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Medical Journal*. 51(1): 104-110.
- 12 Leginagoikoa I., Minguijón E., Berriatua E. & Justea R.A. 2009. Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *Journal of Virological Methods*. 146(1-2): 145-149.
- 13 Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S., Karlsson E.K., Jaffe D.B., Kamal M., Clamp M., Chang J.L., Kulbokas E.J., Zody M.C., Mauceli E., Xie X., Breen M., Wayne R.K., Otrander E.A., Ponting C.P., Galibert F., Smith D.R., deJong P.J., Kirkness E., Alvarez P., Biagi T., Brockman W., Butler J., Chin C.W., Cook A., Cuff J., Daly M.J., DeCaprio D., Gnerre S., Grabherr M., Kellis M., Kleber M., Bardleben C., Goodstadt L., Heger A., Hitte C., Kim L., Koepfli K.P., Parker H.G., Pollinger J.P., Searle S.M.J., Sutter N.B., Thomas R., Webber C. & Lander E.S., 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438(7069): 803-819.
- 14 Murphy M.A., Shariflou M.R. & Moran C. 2002. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *Journal of Dairy Research*. 69(4): 645-649.
- 15 Perozo F., Villegas P., Estevez C., Alvarado I. & Purvis L.B. 2006. Use of FTA® filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. *Avian Pathology*. 35(2): 93-98.
- 16 Psifidi A., Dovas C.I. & Banos G. 2009. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Molecular and cellular probes*. 24(2): 93-98.
- 17 Purvis L.B., Villegas P. & Perozo F. 2006. Evaluation of FTA® paper and phenol for storage, extraction and molecular characterization of infectious bursal disease virus. *Journal of Virological Methods*. 138(1-2) 66-69.
- 18 Ravazzolo A.P., Nenci C., Vogt H.R., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhans E. & Bertoni G. 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*. 350(1): 116-127.
- 19 Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning - A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 626p.
- 20 Santos A., Cremades R., Rodriguez J.C., García-Pachón E., Ruiz M. & Roy G. 2009. Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 118(1): 60-65.
- 21 Schuurman T., Boer R., Patty R., Kooistra-Smid M. & Zwet A. 2007. Comparative evaluation of in-house manual, and commercial semi-automated and automated DNA extraction platforms in the sample preparation of human stool specimens for a *Salmonella enterica* 5'-nuclease assay. *Journal of Microbiological Methods*. 71(3): 238-245.
- 22 Smith G.J.D., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S.J., Worobey M., Pybus O.G., Ma I S.K., Cheung C.L., Raghvani J., Bhatt S., Peiris J.S.M., Guan Y. & Rambaut A. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 459(7250): 1122-1126.
- 23 Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(10): 3741-3751.