

INTRODUÇÃO

Brucella sp. são os agentes causadores da brucelose, doença que afeta diversas espécies animais e o homem, causando doenças crônicas e perdas econômicas. O gênero tem sido descrito como geneticamente homogêneo, portanto técnicas moleculares têm sido empregadas com o intuito de diferenciar e tipificar esses micro-organismos. O uso de um teste rápido e eficiente é de essencial importância para programas de erradicação da brucelose e rastreamento epidemiológico. García-Yoldi e colaboradores desenvolveram um ensaio PCR-multiplex (Bruce-Ladder), que é capaz de tipificar quase todas as espécies de *Brucella*, entretanto a identificação do biovar ainda não é para algumas espécies.

OBJETIVOS

Reproduzir a PCR-multiplex "Bruce-Ladder" a fim de comprovar a sua reprodutibilidade, confirmar a identificação bacteriológica clássica das cepas de *Brucella* sp. pertencentes à bacterioteca do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia e testar modificações a fim de torná-la eficiente para identificação ao nível de biovar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as condições descritas por Garcia-Yoldi *et al.* (2006). Foi utilizado o DNA extraído da cepa *B. melitensis* (biovar 2, cepa 63/9), para otimizar as concentrações dos diferentes reagentes: i) MgCl₂ (2, 2,5, 3, 3,5 e 4mM); ii) DNA (600, 300 e 150ng) e iii) polimerase (0,5, 1,0 e 1,5U). Após otimizada a reação, utilizamos *B. melitensis* (biovar 2 63/9), *B. suis* (SEA), *B. canis* (RM 6/66), e *B. abortus* (biovar 2 86/08/59), para verificar a reprodutibilidade da técnica testando diferentes temperaturas de anelamento (64, 62, 60, 58, 56, 54, 52 e 50°C). As reações de PCR foram submetidas a eletroforese e observadas em gel de agarose 1,5%.

RESULTADOS

Nos experimentos de otimização foi observado uma melhor visualização dos fragmentos de DNA utilizando 3,5mM MgCl₂, DNA na concentração de 150ng e 1.5U de polimerase.

Nos testes de reprodutibilidade, dois fragmentos esperados (1,682 e 1,071pb) não foram visualizados, mesmo em diferentes temperaturas de anelamento e com enzima polimerase de outros fornecedores.

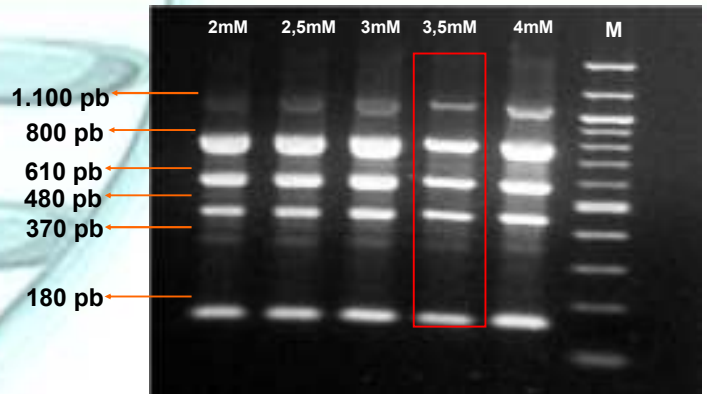


Fig. 1. Gel com diferentes concentrações de MgCl₂.

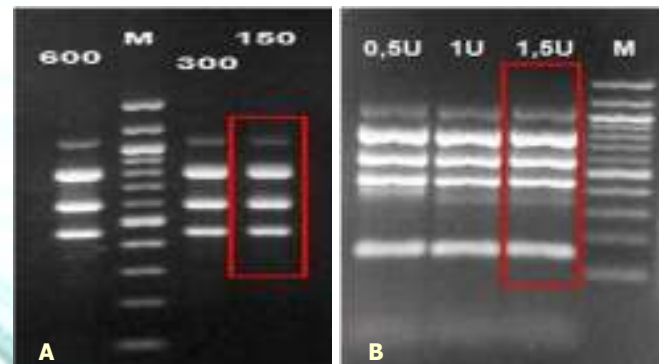


Fig. 2. Géis com diferentes concentrações de (A) DNA molde (em ng), e (B) enzima Taq polimerase.

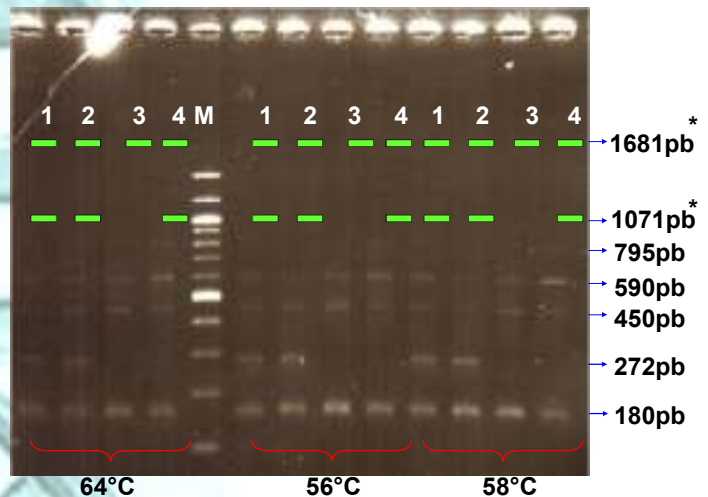


Fig. 3. Gel contendo PCRs de diferentes temperaturas de anelamento (1: *B. canis*; 2: *B. suis*; 3: *B. abortus*; 4: *B. melitensis*). * Fragmentos esperados não visualizados.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Mesmo testando diferentes modificações na metodologia proposta por Garcia-Yoldi *et al.* (2006), desde concentrações de reagentes até temperaturas de anelamento que podem interferir na atividade da reação de PCR, não foi possível reproduzir a técnica "Bruce-Ladder". Novos testes serão realizados utilizando a enzima Immolase DNA polimerase.