



PADRONIZAÇÃO DE DETECÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* POR PCR EM TEMPO REAL

Morais C.L, Franciele¹; Bello L., Grazielle ²; Rossetti, Maria Lúcia³.

¹Graduação de Biomedicina; ²Mestrado do programa PPGBiosauúde; ³Professora do curso de graduação de Biomedicina/Farmácia e PPGBiosauúde.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa (UJVARIA, 2008). Segundo o Ministério da Saúde, foram registrados 66.796 casos novos de tuberculose em 2016. As técnicas que utilizam a amplificação de DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR) são descritas como as mais sensíveis para o diagnóstico de tuberculose (OLIVEIRA et al., 2015). Alguns estudos indicam que os resultados da PCR dependem amplamente do método utilizado para extração de DNA (DE ALMEIDA et al., 2013). A detecção precoce do bacilo e da resistência aos fármacos do tratamento, é essencial para um tratamento adequado e eficaz (ACOSTA; BASSANESI, 2014). O objetivo do trabalho é detectar DNA de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em tempo real diretamente de amostras clínicas de escarro.

Metodologia

O estudo utilizou 20 amostras clínicas de escarro (10 positivas para TB e 10 negativas), confirmadas pelos métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura). Para a padronização da técnica de PCR em tempo real, foram utilizadas 10 amostras clínicas de escarro negativas para TB, contaminadas com a cepa de referência de *Mycobacterium bovis* inativada.

As extrações de DNA de *M. tuberculosis* foram realizadas pelo método de SONICAÇÃO, utilizamos o protocolo adaptado de SCHIMID, 2014. A detecção do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* foi feita pela técnica de PCR em Tempo Real com o equipamento Step One Real Time PCR Systems (AB Applied Biosystems) e os produtos amplificados utilizam os primers do IS6110 detectados por meio do marcador (fluoróforo) SYBR® Green. Para a padronização da concentração ideal de primers a 4 pmol, foi utilizada a análise da curva dissociação de amostras conhecidas. A construção da curva padrão foi feita conforme a recomendação do fabricante, e foi realizada com cinco pontos e em duplicata. A partir do DNA quantificado da cepa de referência do MTB (H37rv) foram feitas diluições seriadas de 1:10. A mistura de PCR foi feita em duplicata, contendo 5 µL de DNA de cada diluição em cada reação e 15 µL de master mix, totalizando o volume final de 20 µL por reação. A eficiência foi calculada pelo software StepOne versão 2.3.

Resultados

As amostras positivas para tuberculose e as contaminadas com *M. bovis* tiveram o DNA amplificado por PCR em tempo real através da detecção da sequência de inserção IS6110 confirmando serem positivas para tuberculose. As amostras negativas ainda estão sendo realizadas, até o momento não temos os resultados. Com a análise da eficiência dos primers foi visto que conforme a concentração de primers utilizada, obtinhamos resultados inespecífico, conforme análise da curva de melting. Alteramos a temperatura de anelamento para 62°C, ao ajustar a concentração para 4 pmol de primers foi visto que o grau (intensidade) de inespecificidade diminui. Portanto foi padronizado a concentração de 4 pmol de primers.

A curva padrão obteve a eficiência de 96,15%, 0,97 de R² (indica a proximidade de encaixe entre a linha de regressão linear da curva padrão e os dados de pontos individuais do CT), -3,418 de Slope (indica a eficiência da amplificação por ensaio de PCR) e Y- inter de 16, 87 (indica o CT esperado para a amostra).

Figura 1.

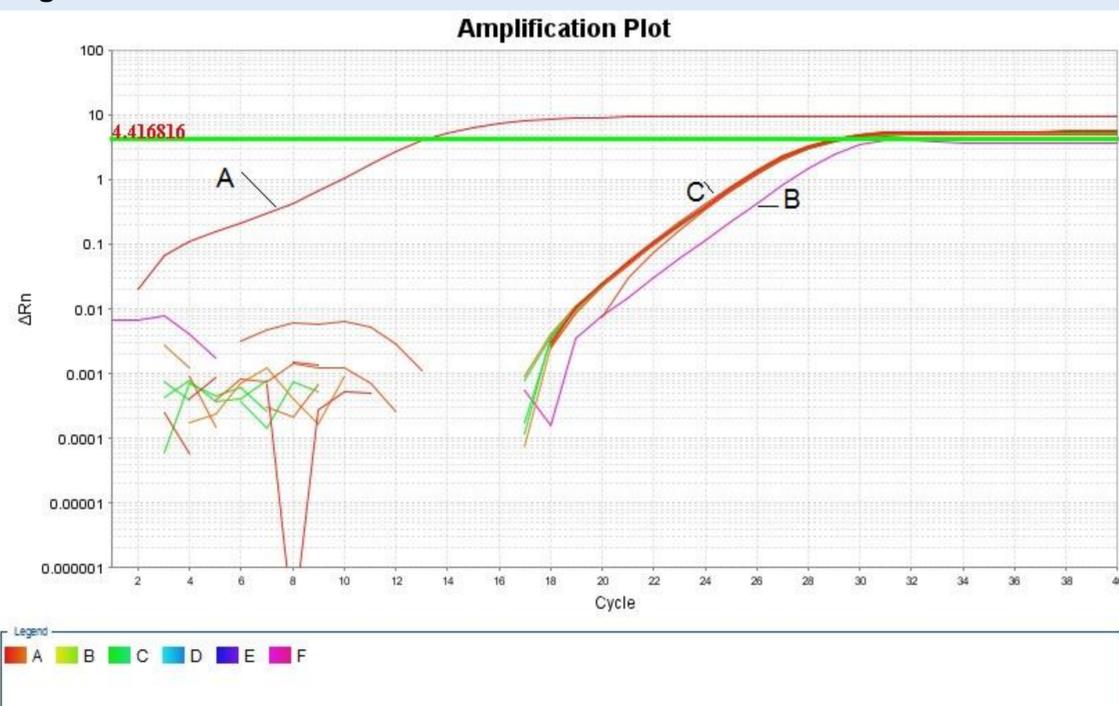


Gráfico de amplificação por PCR em tempo real: A – controle positivo (H37rV); B – controle negativo da reação; C – amostras de 1 a 10 extraídas pela técnica de Sonicação.

Aprovado pelo comitê de ética (CEP ULBRA) sob o nº de registro: 2011-340H.
Apoio financeiro: CNPq, FEPPS e ULBRA.

Conclusão

As amostras positivas para tuberculose foram amplificadas pela técnica de PCR em tempo real detectando sequências de inserções específicas de *M. tuberculosis* de forma rápida, confirmando serem positivas. A eficiência dos primers está relacionada com a concentração do primer, podendo resultar em inespecificidade quando utilizado em concentrações maiores. A curva padrão confirma a eficiência da amplificação. Ainda estamos realizando a amplificação das amostras negativas para verificar a eficiência da técnica.

Referências

- ACOSTA, L.M.W.; BASSANESI, S.L. **The Porto Alegre paradox: social determinants and tuberculosis incidence.** Revista Brasileira de Epidemiologia. Vol.17, 2014.
- DE ALMEIDA, C.P.B. **Tuberculose em Unidade de Referência: Diagnóstico, Tratamento e Perspectiva do Paciente.** Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. Dissertação de mestrado. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/143467/000891831.pdf?sequence=1>>. Acessado em: 23 de maio de 2017.
- OLIVEIRA, L.G.L.D. et al. **Proposed tuberculosis investigation and management protocol in complex and recurrent fistula-in-ano, 2015.** Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2237936315000283>>. Acessado em: 29 de maio de 2016.
- UJVARIA, S.C. **História da disseminação dos microrganismos.** Estudos avançados 22 (64), 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v22n64/a11v2264.pdf>>. Acessado em: 23 de maio de 2017.