



## PADRONIZAÇÃO DE DETECÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium tuberculosis* EM AMOSTRAS CLÍNICAS POR PCR EM TEMPO REAL

Franciele C. Leite Morais<sup>1</sup>  
Graziele Lima Bello<sup>2</sup>  
Maria Lúcia Rossetti<sup>3</sup>

### RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa. 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. Alguns estudos indicam que os resultados da PCR dependem amplamente do método utilizado para extração de DNA. A detecção precoce do bacilo e da resistência aos fármacos do tratamento, é essencial para um tratamento adequado e eficaz. O objetivo do trabalho é detectar DNA de *M. tuberculosis* por PCR em tempo real diretamente de amostras clínicas de escarro. O estudo utilizou 30 amostras clínicas de escarro. 10 positivas para TB, confirmadas pelos métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura) e 10 negativas nos mesmos métodos. Também foram utilizadas 10 amostras clínicas de escarro negativas para TB contaminadas com a cepa de referência de *Mycobacterium bovis*. Todas as amostras tiveram o DNA extraído pela mesma técnica e amplificados por PCR em tempo real através da detecção da sequência de inserção *IS6110*. As amostras positivas foram confirmadas positivas para tuberculose em tempo real.

**Palavras chave:** tuberculose; amplificação; primers.

### INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta principalmente os pulmões, devido a uma infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ou Bacilo de Koch (BK) (UJVARIA, 2008; ROZALES, 2013).

O gênero *Mycobacterium* compreende mais de 150 espécies, sendo que destas, mais de 30 podem causar doenças no gado, animais selvagens e seres humanos (MACHADO et al., 2014). O complexo *M. tuberculosis* inclui o *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M.*

---

1 Aluna do curso de graduação de Biomedicina – Bolsista CNPq – clmorais.fran@gmail.com

2 Aluna de mestrado do programa PPGBiosaúde – Bolsista CNPq – grazilbello@gmail.com

3 Professora do curso de graduação de Biomedicina/Farmácia e PPGBiosaúde – mrossett@terra.com.br

*bovis*, *M. bovis* bacilo de Calmette -Guérin (BCG), *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. mungi*, e *M. suricattae* (DALLA COSTA et al., 2015).

Segundo o boletim epidemiológico de 2017 do Ministério da Saúde, foram registrados 66.796 casos novos de tuberculose e 12.809 casos de retratamento da doença em 2016, no ano de 2015 ocorreram 4.543 óbitos pela tuberculose (BRASIL, 2017).

A presença e a distribuição de sequências de inserção *IS6110* é uma das características do genoma mais estudadas do complexo *M. tuberculosis*. Dezesesseis cópias de *IS6110* foram identificadas no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, a qual é a cepa de referência (PALOMINO et al., 2007).

O diagnóstico laboratorial da tuberculose é baseado em metodologias bacteriológicas, que inclui a baciloscopia e a cultura do bacilo em um meio seletivo para micobactérias, a cultura é considerada padrão ouro no diagnóstico da doença (BOJANG et al, 2015).

O rendimento da baciloscopia e da cultura dependem da qualidade do material enviado ao laboratório (SOARES et al, 2012). A baciloscopia possui uma sensibilidade consideravelmente baixa, sendo necessários 10 mil bacilos/ml de expectoração para que o resultado seja considerado positivo (WHO, 2015).

Os atrasos no diagnóstico da TB, ocasionados pela restrição das técnicas de diagnóstico, afetam a incidência do bacilo na sociedade e influenciam o prognóstico dos indivíduos adoecidos, podendo levar à ocorrência de resistência a drogas e à morte (VILLA et al., 2013).

A detecção por técnicas moleculares do bacilo causador de TB, e a detecção das principais resistências, baseiam-se na amplificação e na detecção de sequências específicas de ácidos nucléicos (MELLO, 2012), estão sendo estudadas e aplicadas em vários centros de saúde, um exemplo é o método Gene-Xpert, que consiste em um PCR em tempo real que detecta a tuberculose e a resistência a rifampicina (SEIFERT et al., 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). Portanto, a extração do DNA dever ser apropriada para amostra em análise, pois pode alterar o desempenho do método de forma significativa (DALCOLMO; ANDRADE; PINCON, 2007).

A detecção precoce do bacilo e da resistência aos fármacos do tratamento, é essencial para um tratamento adequado e eficaz, evitando cepas resistentes, a sua propagação e fornecendo benefícios a saúde pública (ACOSTA; BASSANESI, 2014).

Contudo, o trabalho teve por objetivo detectar DNA de *M. tuberculosis* por PCR em tempo real diretamente de amostras clínicas de escarro.

## **METODOLOGIA**

Foram utilizadas para este estudo amostras clínicas de um banco de amostras do Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA-Canoas.

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, com um protocolo adaptado de SCHIMID, 2014.

A detecção de DNA de *M. 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<sup>®</sup> Green. A reação foi padronizada em um volume final de 20 µL, contendo 15 µL de Fast SYBR<sup>®</sup> Green master mix, 04 pmol de cada primer e 5 µL de DNA extraído de amostras de escarro. As condições da amplificação foram a ativação da enzima a 95°C por 20 segundos, desnaturação a 95°C por 1 segundo e, por fim, anelamento e extensão a 62°C por 20 segundos. As curvas de amplificação e dissociação foram analisadas pelo software StepOne versão 2.3. 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 E DISCUSSÃO**

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.

Psiefidi et al., 2015, em seu estudo comparou onze protocolos diferentes para extração de DNA, concluindo que o melhor método de extração de DNA com menor custo e tempo de execução foi o protocolo *in house*, no nosso estudo utilizamos o método de sonicação, o qual não utiliza kit comercial onde demonstrou elevada quantidade de DNA extraído, alta concentração de DNA e perfis de banda uniformes quando visualizados em eletroforese.

Com a análise da eficiência dos primers foi visto que conforme a concentração de primers utilizada, obtínhamos 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 R<sup>2</sup> (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).

## **CONCLUSÕES**

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**, v.17, p. 1-14, 2014.

BOJANG , A. L.; et. al. Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in The Gambia. **J. Infect**, v.1, p. 332-337, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Secretária de Vigilância em Saúde**, v.48, p. 1-11, 2007.

DALCOLMO, M.P.; ANDRADE, M.K.N.; PINCON, P.D. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.41, p. 1-9, 2007.

DALLA COSTA, E.R., et al. Multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis of the Latin American Mediterranean lineage wrongly identified as Mycobacterium pinnipiedi (ST863)

causing active tuberculosis in south Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.1, p. 1-11, 2015.

DE ALMEIDA, C.P.B. **Tuberculose em Unidade de Referência: Diagnóstico, Tratamento e Perspectiva do Paciente**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, p. 13-37, 2013.

MACHADO, R.J.D., et al. Assessment of the BD MGIT TBc Identification Test for the Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in Network of Mycobacteriology Laboratories Hindawi Publishing. **Biomed Res Ind. Lisboa**, v.1, p. 1-6, 2014.

MELLO, F.C.Q. Abordagem Diagnóstica da Tuberculose Pulmonar - Diagnostic Approach to Pulmonary Tuberculosis. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v.1, p. 1-5, 2012.

OLIVEIRA, L.G.L.D. et al. Proposed tuberculosis investigation and management protocol in complex and recurrent fistula-in-ano. **J. Coloproctol**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 1-7, 2015.

PALOMINO, J.R.; LEAO, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007 from basic science to patient care**. 1. ed. Rio de Janeiro: Tuberculosis Textbook, 2007. p. 57-60.

ROZALES, F.P. **Real Time-PCR e NESTED-PCR no diagnóstico da tuberculose pulmonar**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, p. 12-50, 2013.

SEIFERT, M. et al. A performance evaluation of MTBDR plus version 2 for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. **Int J tuberc Lung Dis**, v. 20, p. 631-637, 2016.

SOARES, J.L.M.F. et al. **Métodos de Diagnóstico: Consulta Rápida**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 10.

UJVARIA, S.C. História da disseminação dos microrganismos. **Estudos avançados**, v.22, p. 171-178, 2008.

VILLA, C. T. S. et al. Diagnóstico oportuno da tuberculose nos serviços de saúde de diversas. **Rev. Latino – Am. Enfermagem**, v.1, p. 1-8, 2013.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for the programmatic management of multidrug-resistant tuberculosis**. 1. ed. Genebra: World Heal Organ, 2011. p. 11-26.