

DETECÇÃO DE DNA 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 PPGBiosaúde; ³Professora do curso de graduação de Biomedicina/Farmácia e PPGBiosaúde.

Introdução

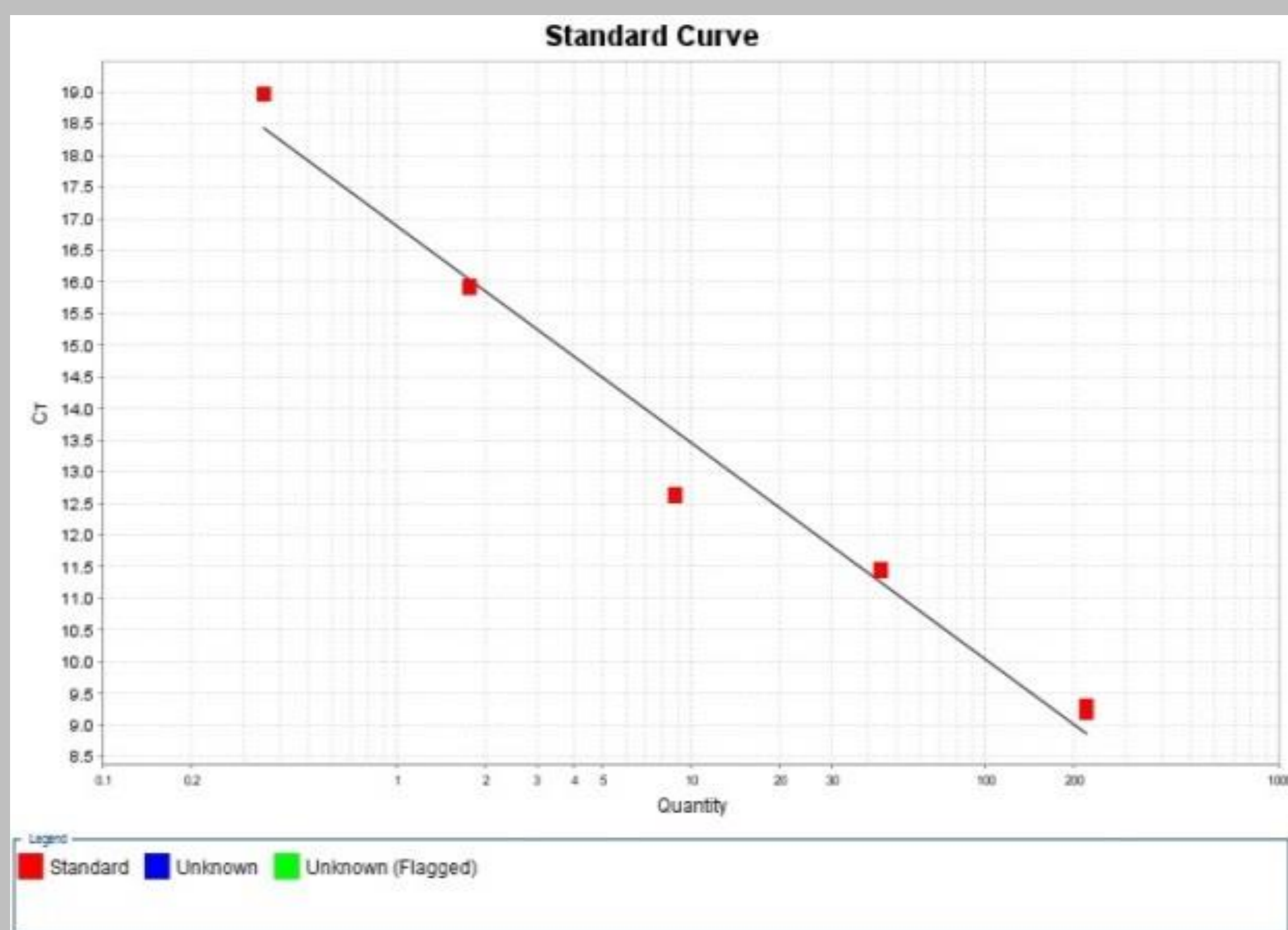
A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa (UJVARIA, 2008). Segundo o Ministério da Saúde, foram registrados 66.796 casos novos de tuberculose em 2016. As técnicas que utilizam a amplificação de DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR) são descritas como as mais sensíveis para o diagnóstico de tuberculose (OLIVEIRA et al., 2015). Os atrasos no diagnóstico da tuberculose, 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 (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

Foram utilizadas 30 amostras clínicas de escarro. Vinte delas, de pacientes com diagnóstico de TB confirmados por baciloscopia e cultura (10 positivas e 10 negativas). Dez amostras negativas utilizadas para padronizar a técnica, foram 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* marcadas (fluoróforo) SYBR® Green. Para definir a sensibilidade analítica do teste, foi realizado o PCR com 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

O teste detectou o DNA de *M. tuberculosis* até o limite de detecção de 14 UFC com uma média de CT de 27 ciclos. As amostras negativas não tiveram amplificação. 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).



Curva padrão de cinco pontos.

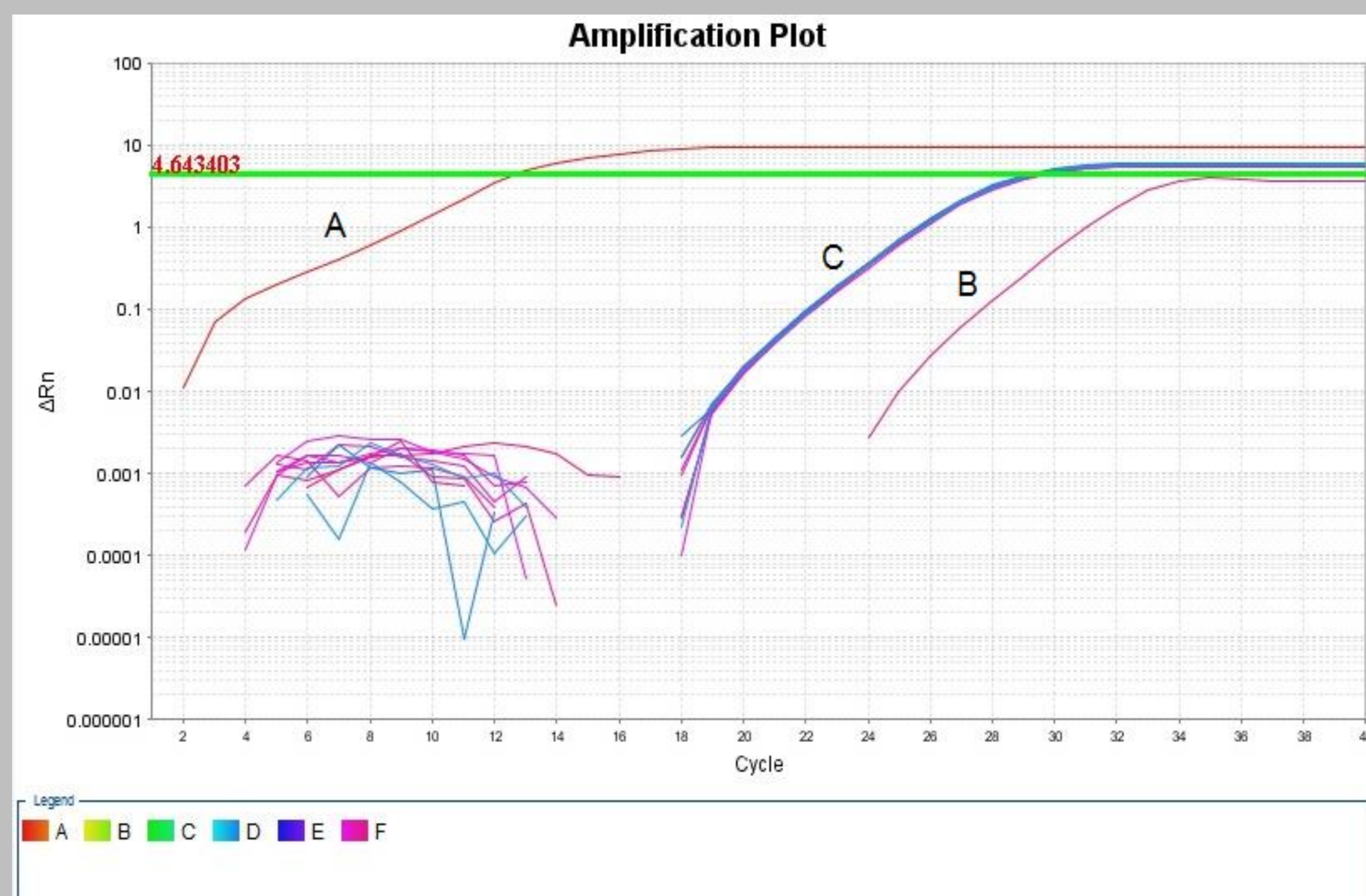


Gráfico de amplificação por PCR em tempo real: A – controle positivo (H37rV); B – controle negativo da reação; C – amostras contaminadas com *M. bovis* de 1 a 10 extraídas pela técnica de Sonicação.

Conclusão

Todas as amostras positivas para tuberculose foram amplificadas e todas as 10 negativas não tiveram amplificação. Assim, a técnica mostrou ser promissora para uso na rotina laboratorial possuindo 100% de sensibilidade e especificidade.

Referências

- ACOSTA, L.M.W.; BASSANESI, S.L. **The Porto Alegre paradox: social determinants and tuberculosis incidence.** Revista Brasileira de Epidemiologia. Vol.17, 2014.
- 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.