

# Comparação de métodos de extração de DNA para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em tempo real

Soares, T.S.<sup>1</sup> e Bello, G.L.<sup>2</sup>  
Rossetti, M.L.<sup>3</sup>  
ULBRA, Canoas-RS

## Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de problema de saúde pública mundial, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de ser uma doença tratável e prevenível, ainda apresenta altos índices de mortalidade. Uma das principais formas de contenção da doença é o diagnóstico precoce. Dentre as metodologias mais eficazes estão as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN), que são altamente dependentes do método de extração de DNA. Dentre estas, a técnica de extração por sonicação promove uma ruptura intensa na parede celular, causada por ondas sonoras de alta frequência. Já a técnica de extração de DNA utilizando cartão FTA é de simples manuseio, de fácil transporte e armazenamento e, ainda faz com que o material se mantenha intacto para análise durante anos.

## Objetivo

Avaliar a técnica de extração de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* diretamente de amostras clínicas de escarro fixadas em papel filtro (FTA<sup>®</sup> Elute Micro card), pela comparação da mesma com a técnica de extração de DNA por sonicação (método já padronizado) a partir da detecção do DNA do patógeno por PCR em tempo real.

## Materiais e Métodos

Foram utilizadas 29 amostras de escarro de pacientes com diagnóstico de TB pelo GeneXpertMTB/RIF (duas alíquotas de cada amostra, totalizando 58 alíquotas), A extração de DNA por sonicação utilizou protocolo adaptado de Bello et al., 2020. A extração de DNA por cartão FTA utilizou protocolo de Ali et al., 2017. O DNA foi amplificado por PCR em tempo real utilizando Step One real Time PCR Systems (AB Applied), os primers utilizados corresponderam ao do alvo genômico da sequência de inserção 6110. O sistema de detecção utilizado foi TaqMan .

## Resultados

		GeneXpert		Cultura (padrão-ouro)		Comparação com Cultura		
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Sensibilidade	Especificidade	Kappa
Protocolo 1 (sonicação)	Positivo	10	0	9	1	80% (95% IC: 63-96)	89% (95% IC: 76-102)	0,7 (95% IC: 0,6-0,79)
	Negativo	4	15	2	17			
Protocolo 2 (CartãoFTA)	Positivo	11	0	11	0	100% (95% IC: 98-101)	100% (95% IC: 98-101)	1,0 (95% IC: 0,98-1,01)
	Negativo	3	15	0	18			
GeneXpert	Positivo			11	3	100% (95% IC: 98-101)	79% (95% IC: 60-95)	0,7 (95% IC: 0,6-0,79)
	Negativo			0	15			

## Conclusão

A técnica de extração de DNA utilizando o Cartão FTA elute a partir de amostras clínicas de escarro, mostrou-se mais eficiente e adequada para a identificação do *M. tuberculosis* por PCR em tempo real (ensaio TaqMan).

## Referências bibliográficas

- BRASIL. Ministério da Saúde, 2019. **Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/28/manual-recomendacoes.pdf>. Acessado em 7 de Agosto de 2020.
- Bello GL, et al. **Improvement of Mycobacterium tuberculosis detection in sputum using DNA extracted by sonication**. Braz J Infect Dis. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867020301215?via%3Dihub>
- ALI N, et al. **Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics**, 2011 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785592>. Acessado em 5 de Agosto de 2020.