



COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium tuberculosis* DE AMOSTRA CLÍNICA

Franciele C.L. Morais¹
Graziele Lima Bello²
Maria Lúcia Rossetti³

Resumo

A tuberculose (TB) é uma doença crônica, infecciosa e transmissível, com altos índices de mortalidade. É estimado um número de 4.400 mortes por dia no mundo por TB (OMS, 2015). A extração do DNA deve ser condizente para amostra em análise, a padronização da técnica de extração de DNA tem grande importância, auxiliando no desenvolvimento e padronização de um teste. A técnica de extração através de beads-magnéticas é fundamentada na interação do DNA com partículas magnéticas revestidas de sílica. A técnica de extração por resina de sílica é baseada na interação da sílica com grupamentos do DNA que causam ligações reversíveis que permitem a separação do mesmo de outras moléculas. A extração de DNA por ultrassom consiste no rompimento da parede celular bacteriana pela emissão de vibrações ultrassônicas. O método selecionado para extrair DNA presente na amostra clínica é um fator relevante, podendo influenciar na acurácia das técnicas de amplificação. Este trabalho foi realizado visando à comparação de três técnicas de extração de DNA, para isolar DNA de *M. tuberculosis* de amostras clínicas. Foram analisadas 10 amostras positivas com cada técnica. Todos os 30 DNAs extraídos foram amplificados e a intensidade do produto de DNA amplificado foi comparado. A extração do DNA de amostras clínicas de pacientes com tuberculose foi mais eficaz pela utilização de sílica do kit DETECT-TB.

Palavras-chave: tuberculose; PCR; extração de DNA; diagnóstico.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença crônica, infecciosa e transmissível, com altos índices de mortalidade. Ocasionalmente por uma bactéria que afeta principalmente os pulmões. Mas podendo afetar outros órgãos como ossos, rins e meninges. Esta doença tem origem devido a uma infecção por *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK) (UJVARIA, 2008; ROZALES, 2013).

A doença é curável, porém está classificada como uma das mais importantes, dentre as que afetam a saúde pública. É estimado um número de 4.400 mortes por dia no mundo por TB (OMS, 2015). Isso mostra uma deficiência no controle da doença, podendo ser aperfeiçoada inclusive com um diagnóstico precoce, onde uma melhora nos níveis de detecção da doença, e

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

2 Aluno de mestrado do programa PPGBiosaúde – Bolsista CNPq – grazibello@gmail.com

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

da resistência aos fármacos utilizados no tratamento, poderia proporcionar um tratamento mais eficaz (MACIEL et al, 2013; BARBOSA et al, 2013).

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

A detecção precoce do bacilo, assim como da resistência aos fármacos do tratamento, é essencial para um tratamento adequado e eficaz, evitando assim cepas resistentes, e sua propagação, fornecendo benefícios a saúde pública (ACOSTA; BASSANESI, 2014). Técnicas que utilizam a amplificação de DNA por PCR (reação em cadeia de polimerase) têm sido descritas como as mais sensíveis para realizar o diagnóstico da tuberculose (OLIVEIRA et al, 2015). Contudo, a extração do DNA deve ser condizente para amostra em análise, uma vez que pode alterar significativamente o desempenho do método. Sendo assim, a padronização da técnica de extração de DNA tem grande importância no desenvolvimento e padronização de um teste minimizando os erros no resultado dos testes (DALCOLMO; ANDRADE; PINCON, 2007).

Os métodos de extração de DNA variam quanto à forma de isolar e purificar o DNA dos demais componentes celulares da amostra. Quanto maior a pureza, integridade e quantidade, melhor será o desempenho de um teste molecular facilitando o diagnóstico (DHALIWAL, 2013).

A técnica de extração através de beads-magnéticas é fundamentada na interação do DNA com partículas magnéticas revestidas de sílica. O método evita a contaminação cruzada de amostras e permite um manuseio seguro de amostras potencialmente contaminadas. O DNA extraído dispõe de alta pureza. O material genético isolado fica pronto para uso ou pode ser armazenado para uso subsequente (PILLO, 2010).

A técnica de extração por resina de sílica é também baseada na interação da sílica com grupamentos do DNA que causam ligações reversíveis que permitem a separação do mesmo de outras moléculas (MICHELON et al, 2011).

A extração de DNA por ultrassom consiste no rompimento da parede celular bacteriana pela emissão de vibrações ultrassônicas. Permite uma extração rápida, simplificada em vista dos outros métodos de extração. Diminui a contaminação da amostra e evita a perda de analito (LUZ, 1998).

Considerando que o método selecionado para extrair DNA presente na amostra clínica é um fator relevante, podendo influenciar na acurácia das técnicas de amplificação. Este

trabalho foi realizado visando à comparação das três técnicas de DNA descritas acima para isolar DNA de *M. tuberculosis* de amostras de escarro.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 10 amostras de escarro de pacientes com tuberculose, provenientes de um banco de amostras do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA-RS).

As amostras foram centrifugadas e ressuspensas em TE 1X até atingir o volume de 1,5 mL. Após foram divididas em três alíquotas de volume igual. Cada alíquota foi processada pelas três técnicas.

A extração de DNA por sílica foi realizada com os reagentes componentes do kit DETECT-TB (Labtest. MG).

A extração de DNA através de BEADS-MAGNÉTICAS foi realizada utilizando reagentes que compõem um protótipo de kit de extração de DNA da empresa Ampligenix (MG).

Ambas as técnicas utilizam uma fervura de 10 minutos para rompimento da parede celular bacteriana.

A extração de DNA por ULTRASSOM utilizou o protocolo adaptado de SCHIMID, 2014. As amostras após serem submetidas à temperatura de 95°C eram colocadas em um ultrasonicador por 15 minutos.

O DNA purificado das amostras foi amplificado por PCR convencional, utilizando o kit DETECT-TB (MICHELON et al, 2011) que amplifica um fragmento de 245 pb com primers específicos da região de DNA (IS6110).

Posteriormente foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 1,5%. Após a migração no gel, foi visualizado em um transiluminador para a análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 10 amostras positivas com cada técnica. Todos os 30 DNAs extraídos foram amplificados e a intensidade do produto de DNA amplificado foi comparado.

Os produtos de amplificação do DNA extraído por sílica foram visualizados como uma banda forte em todas as amostras.

Os produtos de amplificação dos DNAs extraído pelo método de BEADS-MAGNÉTICAS apareceram como bandas no gel de agarose, porém em uma amostra a banda estava fraca (conforme figura abaixo).

Os produtos amplificados dos DNAs extraídos pelo método de ULTRASSOM, também apareceram como bandas no gel de agarose, porém em uma amostra a banda estava bem fraca, em comparação com o método das BEADS-MAGNÉTICAS, e a outra amostra não apareceu banda (conforme figura abaixo).

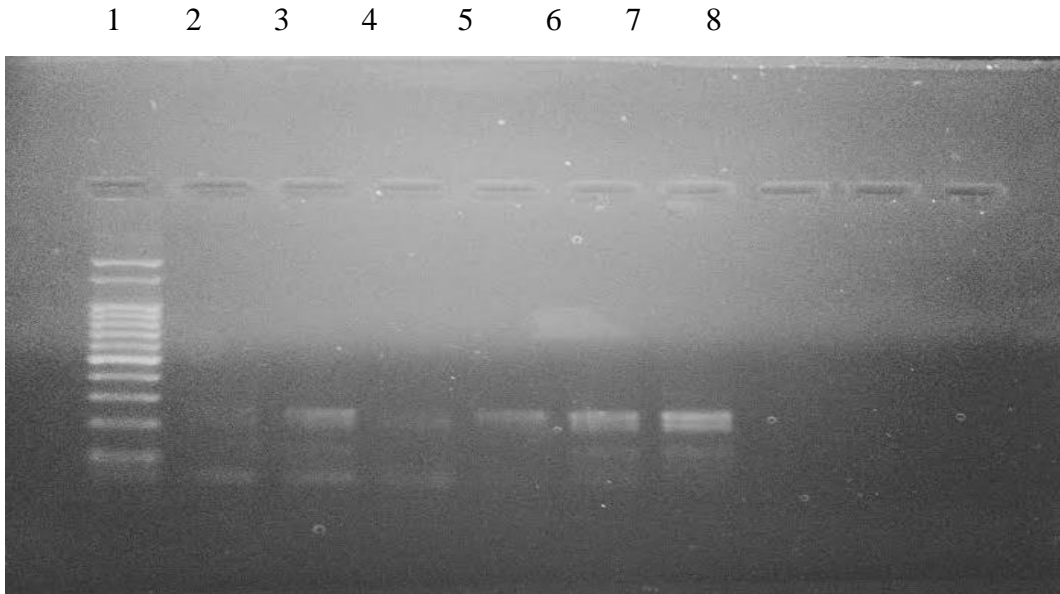


Figura. Eletroforese em gel de agarose 1,5% - de produto amplificado de duas amostras. 1 – Marcador 100pb. 2 – Controle Positivo (DNA de BCG). 3 e 6 – Amostras extraídas por sílica, com o kit DETECT-TB. 4 e 7 – Amostras extraídas através de beads-magnéticas. 5 e 8 – Amostras extraídas por ultrassom.

Através da análise dos resultados obtidos, foi possível verificar que a extração do DNA de amostras de escarro de pacientes com tuberculose foi mais eficaz pela utilização de sílica do kit DETECT-TB, demonstrando uma sensibilidade maior em relação as outras técnicas testadas que também deram positivas, apareceram bandas no gel de agarose, porém de forma mais fraca comparado com o método do DETECT-TB.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados iniciais mostraram que o método de extração que utiliza fervura para romper a parede bacteriana e a sílica para purificar o DNA foi o que recuperou uma concentração de DNA maior em todas as mostras. Ainda será realizado o teste com outras amostras com concentração conhecida e amostras negativas a fim de confirmar a técnica mais adequada.

REFERÊNCIAS

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

BARBOSA, D.R.M. et al. **Aspectos sócio- culturais da tuberculose e do diálogo com as políticas de saúde pública no Brasil**. Revista Eletrônica Gestão & Saúde. Edição Especial. 2013.

BOJANG , A. L. et al. **Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in The Gambia, 2015**. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016344531500403X>>. Acessado em 24/05/2016>. Acessado em: 24 de maio de 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde, 2015. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11045&Itemid=674>. Acessado em: 25 de maio de 2016.

DALCOLMO, M.P.; ANDRADE, M.K.N.; PINCON, P.D. **Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e controle, 2007**. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003489102007000800006&script=sci_arttext∓lng=en>. Acessado em 15 de maio de 2016.

DHALIWAL, A. **Extração e purificação de DNA**. Rutgers University, New Jersey, United States, 2013. Disponível em: <<http://www.labome.com.br/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>> Acessado em: 23 de maio de 2016.

LUZ, L.P.D. **Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/27641/000221742.pdf?sequence=1>>. Acessado em: 24 de maio de 2016.

MACIEL, M.S. et al. **A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria**. Revista Brasileira Clinica Medica. Vol.10(3), p.226-30, 2013.

MICHELON, C.T. et al. **Colorimetric Microwell Plate Reverse-Hybridization assay for mycobacterium tuberculosis detection, 2011**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537680>>. Acessado em: 28 de maio de 2016.

OLIVEIRA, L.G.L.D. et al. **Proposta de investigação e tratamento da tuberculose em fístulas anorretais complexas e recorrentes, 2015**. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2237936315000283>>. Acessado em: 29 de maio de 2016.

PILLO, F. D. **Imunocaptura do vírus de influenza aviária para diagnóstico em RT-PCR em tempo real**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/micro/m/78361.pdf>>. Acessado em: 23 de maio de 2016.

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, 2013.

SCHMID, K.B. **Comparação de suas metodologias moleculares para o diagnóstico de tuberculose**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2014.

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 2016.