

## COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA A DETECÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* POR PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

Yago Brandão de LIMA<sup>1</sup>; Mauricio Morishi OGUSKU<sup>2</sup>; Julia Iñez SALEM<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Co-Orientador INPA/CPCS; <sup>3</sup>Orientadora INPA/CPCS

### 1. Introdução

A Tuberculose (TB) está caracterizada como a doença infecciosa que mais provoca mortes no mundo (Raviglione 2003), sendo 1,1 a 1,7 milhões de mortes entre as pessoas HIV-negativas, mais um adicional de 0,45 a 0,62 milhões de mortes dentre os indivíduos HIV-positivos, conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o ano de 2008 (WHO 2010). Além do exposto, ocorreram cerca de 8,9-9,9 milhões de casos novos de TB no mundo, com prevalência de 9,6 a 13,3 milhões. Os cinco países com maior incidência de TB são: Índia (1,6-2,4 milhões), China (1,0-1,6 milhões), África do Sul (0,38-0,57 milhões), Nigéria (0,37-0,55 milhões) e Indonésia (0,34-0,52 milhões). Estima-se que a Índia e China sejam responsáveis por 35% de todos os casos de TB em nível mundial (WHO 2010). Atualmente, 22 países são responsáveis por 90% dos casos mundiais de TB, e desses, o Brasil é o único país sul-americano (SBPT 2009). No Brasil, a média anual de casos novos de TB nos últimos cinco anos é de aproximadamente 72 mil notificações, com cerca de 4,7 mil mortes anuais (Brasil 2010). O país apresenta 70% de índice de cura dos casos diagnosticados, 12% de abandono do tratamento e 7% de óbitos. Os coeficientes ideais seriam de pelo menos 85% para o índice de cura e de no máximo 5% para as taxas de abandono de tratamento e óbito (Brasil 2009). Em relação à região Norte, em 2009, foram notificados 7.250 casos novos de TB refletindo uma incidência de 47,2/100.000 habitantes, enquanto a média brasileira foi de 37,41/100.000. Dos 7.250 casos da região Norte, o estado do Amazonas notificou 2.273, ou seja, um coeficiente de incidência de 66,98/100.000. Isto representa o maior coeficiente da região norte e o segundo do país – o Rio de Janeiro é o primeiro com índice de 70,78/100.000 (Brasil 2010).

*Mycobacterium tuberculosis* é uma das espécies micobacterianas que causa a TB no homem e em animais. Esta espécie pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, no qual estão incluídas também as espécies *M. bovis*, *M. bovis* (BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (Brasil 2008).

A técnica preconizada pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico laboratorial da TB é a baciloscopia direta. Por esta técnica é pesquisada a presença de BAAR (bacilos álcool ácido-resistentes) em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado pela técnica de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun, que segue um modo padronizado de observação ao microscópio de campo claro. É uma técnica simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo, por isso continua sendo importante no controle da TB, já que pode detectar casos bacilíferos, ou seja, os casos infecciosos da forma pulmonar responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (Brasil 2008). Embora seja uma técnica rápida, possui um limite mínimo de detecção entre 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro e sensibilidade que varia de 22 a 78% nos casos em que o cultivo está positivo (Pfaller 1994; Brasil 2008). A especificidade da baciloscopia é alta, entre 84 e 100%, porém pode estar reduzida em zonas endêmicas de infecções pelas bactérias do Complexo *M. avium-intracellulare* (Daniel 1990) ou por outras MNT (micobactérias não causadoras de TB). O cultivo é um método laboratorial de maior sensibilidade e especificidade, o qual permite o isolamento e a posterior identificação de BAAR a partir da semeadura da amostra clínica, em meios de cultivo específicos para micobactérias. É reconhecido como o "Padrão Ouro" para o diagnóstico das infecções causadas pelo *M. tuberculosis* em casos de TB pulmonar e extrapulmonar ou para avaliar um novo método diagnóstico (Butcher *et al.* 1996; Brasil 2008). Este método bacteriológico pode detectar 100 bacilos por mL de escarro, mas quando realizada com alta qualidade técnica pode ser possível

detectar entre 10 e 100 bacilos por mL de escarro (Rieder *et al.* 2007; WHO 2004). Entretanto, pode requerer até oito semanas para o isolamento e identificação da micobactéria, sendo esta sua principal desvantagem.

Para a detecção e identificação rápida de *M. tuberculosis*, a técnica molecular de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vem sendo utilizada como alternativa de alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, a acurácia da PCR é dependente da escolha da região genômica ou do DNA alvo, da definição dos *primers* dentro da seqüência do DNA (Ogusku e Salem 2004) e da eficiência da técnica de extração de DNA (Aldous *et al.* 2005; Amaro *et al.* 2008). Uma característica importante da micobactéria que influencia diretamente nos procedimentos de extração de DNA é a constituição de sua parede celular. Esta é uma estrutura complexa composta de moléculas lipofílicas e polissacarídeos que resultam em uma forte barreira física protetora, dentre outras propriedades biológicas (Brenan 2003). Isto faz com que a parede celular micobacteriana seja resistente à lise pelas técnicas convencionais de extração de DNA utilizadas para outros grupos bacterianos (Amaro *et al.* 2008). A lise da parede celular pode ser alcançada de várias maneiras: por lise mecânica, uso de enzimas proteolíticas, detergentes, mudanças de temperatura ou por combinação destes vários procedimentos (Afghani e Stutman 1996; Aldous *et al.* 2005). Entretanto, ainda não há um consenso sobre a indicação de um determinado protocolo ou kit comercial para a extração de DNA de micobactérias.

Diante do exposto, o presente estudo tem por objetivos: 1) Determinar o rendimento da extração de DNA de três métodos a partir de uma suspensão bacilar de *M. tuberculosis*; 2) Verificar a menor concentração bacilar detectável por PCR em amostras de secreção pulmonar adicionadas de *M. tuberculosis*; 3) Definir o melhor método de extração de DNA para diagnóstico da Tuberculose por PCR.

## 2. Materiais e métodos

Para se determinar o rendimento da extração de DNA em cada método, uma suspensão ( $30 \times 10^8$  bacilos/mL) da cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv (**objetivo 1**) foi preparada com turbidez equivalente a escala 10 de McFarland (Lennette *et al.* 1985) e dividida em 15 alíquotas de 1 mL. Para cada método de extração foi destinada um grupo de 5 alíquotas da suspensão bacilar. Considerando que o genoma de um bacilo equivale a 3 fentogramas, fg, (Santos *et al.* 2009) foi possível estimar o quantitativo de DNA na alíquota de suspensão micobacteriana antes do início dos procedimentos de extração, ou seja, 9.000 nanogramas (ng) de DNA.

Após a extração, o DNA de cada alíquota foi quantificado em espectrofotômetro de luz ultravioleta (GeneQuant pro DNA/RNA Calculator) e a média de cada grupo de alíquotas foi utilizado para o cálculo de rendimento (Tabela 1).

O rendimento de cada método de extração foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{Rendimento}_{\text{Método}} = \frac{\text{Quantidade de DNA obtida}}{\text{Quantidade de DNA estimada}} \times 100$$

As alíquotas de DNA extraídas pelos três protocolos de extração também foram submetidas à PCR com iniciadores para a seqüência IS6110, específicos para o Complexo *M. tuberculosis*. Um volume de 10  $\mu$ L do DNA extraído foi adicionado a 15  $\mu$ L de uma mistura de reagentes da PCR, contendo 2U de *Taq* DNA Polimerase; 200  $\mu$ M de cada dNTP; Buffer PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  e 0,01% gelatina) e 0,2  $\mu$ M de cada iniciador (*primer*) IS-1 (CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG) e IS-2 (CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG). As amostras foram amplificadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems) com a seguinte programação: 94,0°C por 4 minutos; 35 ciclos a 94,0°C por 1 minuto, 68,0°C por 1 minuto e 72,0°C por 1 minuto e, 72,0°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Posteriormente, o gel de agarose foi corado com Sybr Green e visualizado em transiluminador de luz azul, Safe Imager (Invitrogen).

Para se verificar qual a menor concentração bacilar detectável por PCR em amostras de secreção pulmonar adicionadas de *M. tuberculosis* H37Rv (**objetivo 2**), foram preparadas alíquotas de 100 µL contendo 10.000, 1.000, 100, 10 e 1 bacilo. Para cada alíquota da suspensão bacilar foi adicionado um volume de 100 µL de secreção pulmonar (doador anônimo) previamente descontaminada e desmucolizada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% estéril e sabidamente negativa para a presença do agente causador da TB. Estas alíquotas de secreção pulmonar adicionadas das suspensões de *M. tuberculosis* H37Rv tiveram o DNA extraído pelos métodos propostos. A quantificação de DNA foi realizada em espectrofotômetro de luz UV e as amostras foram submetidas à PCR de acordo com o protocolo citado anteriormente.

### 3. Resultados e Discussão

Os rendimentos dos três protocolos de extração de DNA estão apresentados na Tabela 1.

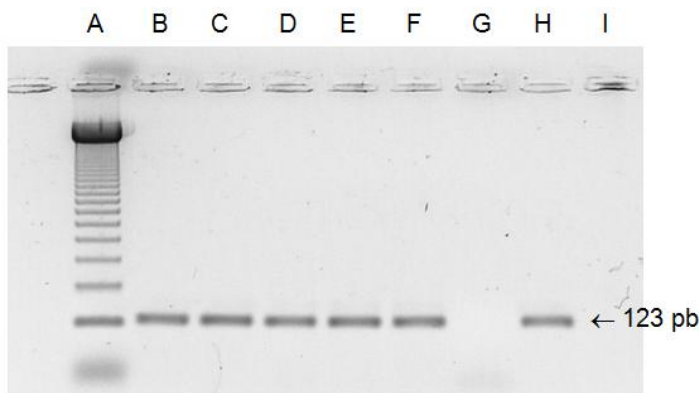
**Tabela 1** – Rendimento dos protocolos de extração de DNA a partir de suspensão contendo  $30 \times 10^8$  bacilos/mL.

Protocolos	Quantidade de DNA (ng) obtida <sup>1</sup>	Pureza	Rendimento (%)
Kit NucleoSpin <sup>®</sup> Tissue (MN)	250 ± 61,2	0,8	2,8
Lise enzimática com Proteinase K	1.680 + 460,4	1,6	18,7
Lise química com Triton X-100	740 + 348,9	1,5	8,2

1 = Média ± Desvio Padrão

Pode-se observar que o DNA extraído pelo protocolo *in house* de lise enzimática com Proteinase K apresentou rendimento superior aos demais protocolos, ou seja, foi 6,6 e 2,3 vezes superior aos protocolos do Kit NucleoSpin Tissue e lise química com Triton X-100, respectivamente.

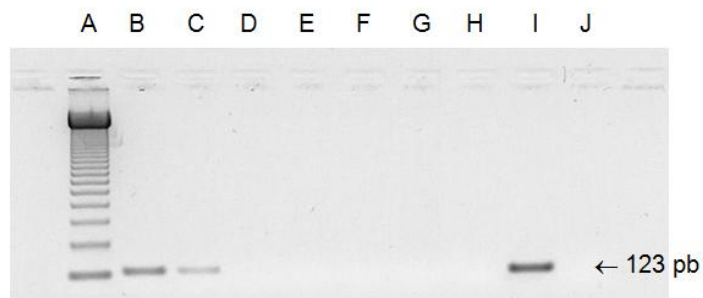
Todas as alíquotas de DNA extraídas pelos 3 protocolos apresentaram positividade na PCR (Figura 1) com iniciadores específicos para o Complexo *M. tuberculosis*. Este fato já esperado devido à alta concentração bacilar das alíquotas utilizadas na extração de DNA, apesar dos rendimentos dos protocolos de extração serem inferiores a 20%.



**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A = ladder 123 bp; B a F = Alíquotas da suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv; G = Controle negativo de extração de DNA; H = Controle positivo (DNA de *M. tuberculosis* H37Rv); I = Controle negativo de amplificação de DNA.

Para o **objetivo 2**, foi possível detectar *M. tuberculosis* por PCR em uma alíquota de escarro contendo 1000 bacilos, a partir dos protocolos de extração de DNA NucleoSpin Tissue e Lise enzimática com Proteinase K. A sensibilidade da PCR foi inferior ao que pode ser detectado pelo

método bacteriológico de cultivo, provavelmente pela presença de DNA de outros microrganismos ou das células do próprio indivíduo que podem estar interferindo na amplificação específica do DNA de *M. tuberculosis*.



**Figura 2** – Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A = ladder 123 bp; B = Alíquota de escarro com 10000 bacilos; C = Alíquota de escarro com 1000 bacilos; D = Alíquota de escarro com 100 bacilos; E = Alíquota de escarro com 10 bacilos; F = Alíquota de escarro com 1 bacilo; G = Alíquota de escarro; H = Controle negativo de extração de DNA; I = Controle positivo (DNA de *M. tuberculosis* H37Rv); J = Controle negativo de amplificação de DNA.

#### 4. Conclusão

O Kit NucleoSpin Tissue e o protocolo de lise enzimática com Proteinase K foram equivalentes na detecção de *M. tuberculosis* a partir de amostra de escarro. O NucleoSpin Tissue apresenta a vantagem de ser um protocolo mais rápido e com menos etapas de manipulação da amostra clínica, o que reduz a probabilidade de contaminação cruzada entre as amostras.

Neste estudo, o método utilizado para o cálculo de rendimento nos diferentes protocolos de extração de DNA possibilitou a real visualização do desempenho desses protocolos. Consequentemente poderá ser proposto como modelo para avaliação de novos métodos de extração de DNA, seja *in house* ou na forma de kits comerciais.

#### 5. Referências

- Afghani, B.; Stutman H.R. 1996. Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of *M. Tuberculosis*: Comparison of Simple Boiling and a Conventional Method for DNA Extraction. *Biochemical and Molecular Medicine*, 57: 14-18.
- Aldous, W.K.; Pounder, J.I.; Cloud, J.L.; Woods, G.L. 2005. Comparison of Six Methods of Extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 2471-2473.
- Amaro, A.; Duarte, E.; Amado, A.; Ferronha, H.; Botelho, A. 2008. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 8-11.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias*. Brasília, DF, Brasil, 436 pp.
- Brasil. 2009. Incidência de tuberculose cai 27,58% em 10 anos. ([http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=1450&CO\\_NOTICIA=10504](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=1450&CO_NOTICIA=10504)). Acesso em 28/04/10.

Brasil, Ministério da Saúde. 2010. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Série Histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose. ([http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1527](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527)). Acesso em 03/09/10.

Brenan, J.P. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83: 91–97.

Butcher, P.D.; Hutchinson, N.A.; Doran, T.J.; Dale, J.W. 1996. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. in: Mycobacterial disease - old problems, new solutions. (Suplement). *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 53S-71S.

Daniel, T.M. 1990. The rapid diagnosis of Tuberculosis: a selective review. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 116:277-282.

Lenette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J.; Shodomy, H.J. 1985. Manual of Clinical Microbiology. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.

Ogusku, M.M.; Salem, J.I. 2004. Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no Estado do Amazonas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30: 223-228.

Pfäller, M.A. 1994. Application of new technology to the detection, identification and antimicrobial susceptibility testing by mycobacteria. *Clinical Microbiological Infectious Diseases*, 101: 329-37.

Raviglione, M.C. 2003. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis*, 83: 4-14.

Rieder, H.L.; van Deun, A.; Kam, K.M.; Kim, S.J.; Chond, T.M.; Trébucq, A.; Urbanczik, R. 2007. Priorities for Tuberculosis bacteriology services in low-income countries. *Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 150.

Santos, A.; Cremades, R.; Rodriguez, J.C.; García-Pachón, E.; Ruiz, M.; Royo, G. 2009. Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 118: 60–65.

SBPT. 2009. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35: 1018-48.

WHO. 2004. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO Report, Geneva.

WHO. 2010. Global tuberculosis control: a short update to the 2009. WHO Report, Geneva.