

## AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE PROTOCOLOS *in house* PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium tuberculosis* EM CEPAS DE REFERÊNCIA H37RA

João Guilherme Souza Oliveira<sup>1,2</sup>; Romário Martins Araújo<sup>1</sup>; Haiana Charifker Schindler<sup>1</sup>; Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel<sup>1</sup>; Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Departamento de Imunologia, Recife, Pernambuco.

<sup>2</sup>Instituto Keizo Asami, Recife, Pernambuco.

<sup>3</sup>Centro Acadêmico do Agreste (CAA-UFPE), Núcleo de Ciências da Vida, Caruaru, Pernambuco.

joao.gsoliveira@ufpe.br

Área temática: Biotecnologia aplicada à genética humana.

**DOI: 10.47094/978-65-284-0218-2/1**

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é responsável por causar a tuberculose (TB), uma das maiores causas de morbimortalidade do mundo, que em 2023, ultrapassando a COVID-19, voltou a ser a principal causa de morte por um único agente infeccioso<sup>1</sup>. O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico molecular, apresentam-se como uma alternativa promissora para a detecção do Mtb, como a PCR em tempo real (qPCR)<sup>2,3</sup>. Sabe-se que o desempenho da qPCR depende diretamente do método de extração de DNA escolhido, que deve ser rápido, metodologicamente simples e capaz de garantir boa quantidade e qualidade do DNA<sup>4</sup>. **OBJETIVO:** O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar o desempenho de três protocolos *in house* de extração de DNA de Mtb: Mini Salting Out (MSO), Fenol-Clorofórmio (FC) e Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB). **METODOLOGIA:** A partir da cultura, colônias das cepas de referência H37Ra foram isoladas usando alças bacteriológicas e ressuspensas em 500µL de água ultrapura (n=18). Para a análise quantitativa e qualitativa do DNA genômico extraído, foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop 2000, considerando as razões 260/280 (R1) e 260/230 (R2). A eletroforese em gel de agarose a 1,0% foi utilizada para análise da integridade do DNA. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism8. A confirmação da presença de DNA do Mtb foi realizada por qPCR, utilizando o *IS6110* como gene alvo. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A média de concentração de DNA em ng/µL foi de 201,15, 48,65 e 116,4 para MSO, FC e CTAB, respectivamente. Em relação às médias das razões, R1=1,95 e R2=1,91 para MSO, R1=1,40 e R2=1,8 para FC e R1=1,8 e R2=1,36 para CTAB. O MSO apresentou concentração significativamente maior em comparação ao FC (p=0,0061), mas não diferiu de forma significativa do CTAB (p=0,6797). Já o FC apresentou estatisticamente desempenho inferior ao CTAB (p=0,0328). FC foi superior em relação à integridade do DNA na eletroforese, quando comparado ao MSO e ao CTAB. Dessa forma,

os achados reforçam que o MSO e CTAB destacaram-se em relação à concentração do DNA obtido, enquanto FC apresentou limitação nesse parâmetro. Tanto R1 quanto R2 destacaram-se no protocolo MSO em relação à CTAB e FC, demonstrando ser a melhor escolha em relação à pureza do material genômico obtido. **CONCLUSÃO:** Foi possível concluir que o MSO comparativamente se demonstrou ser a melhor metodologia *in house* para extração de DNA genômico em cepas de referência H37Ra, apresentando índices quantitativos e qualitativos adequados. Esses achados destacam a importância de validar metodologias de extração em cepas de referência, pois permitem estabelecer protocolos otimizados mais confiáveis para a aplicação no diagnóstico molecular da TB.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diagnóstico molecular. qPCR. Tuberculose

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. WHO. **GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2024**. Geneva: World Health Organization, 2024.
2. ACHARYA, B. et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 4065–4075, 1 maio 2020.
3. MUKHERJEE, S. et al. Evolution of tuberculosis diagnostics: From molecular strategies to nanodiagnosics. **Tuberculosis**, v. 140, p. 102340, 1 maio 2023.
4. KOENTJORO, M. P.; DONASTIN, A.; PRASETYO, E. N. A SIMPLE METHOD OF DNA EXTRACTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* FROM SPUTUM CULTURES FOR SEQUENCING ANALYSIS. **African Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2 Suppl, p. 19–22, 1 set. 2021.