

# Análise de Interferentes na Extração, Amplificação e Detecção de *M. Tuberculosis* por Reação de PCR em Amostras de Líquido Pleural, Escarro e Lavado Broncoalveolar

**GABRIELA GASPAR CARNEVALE**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leila Antonangelo  
Programa de Pneumologia

## RESUMO

*Carnevale GG. Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de M. tuberculosis por reação de PCR em amostras de líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.*

**Introdução:** A tuberculose (TB) é uma das infecções mais prevalentes na humanidade, sendo o comprometimento pulmonar a principal causa de morbimortalidade. A cultura é o padrão de referência para diagnóstico, porém apresenta baixa sensibilidade. Das formas extrapulmonares, a TB pleural é a mais comum e apresenta diagnóstico confirmatório difícil por ser paucibacilar e conter interferentes intrínsecos na amostra. A reação em cadeia da polimerase (PCR), por amplificar o DNA da micobactéria, apresenta-se como teste mais sensível que a cultura, sendo positivo em amostras que apresentam a partir de 10<sup>2</sup> UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mL) de *M. tuberculosis* (MTB). Entretanto, quando utilizada em amostras de escarro, lavado broncoalveolar e/ou líquido pleural pode ter seu desempenho comprometido pela presença de inibidores intrínsecos da amostra (variáveis pré-analíticas) e pelas técnicas de amplificação e detecção (variáveis analíticas) utilizadas na reação. **Objetivo:** Avaliar a influência de variáveis pré-analíticas (concentração de células, hemácias e proteínas) na detecção do DNA do *M. tuberculosis* em amostras de escarro, lavado broncoalveolar (LBA) e líquido pleural (LP), utilizando combinações de métodos de extração/detecção. **Métodos:** Amostras de escarro, lavado broncoalveolar e líquido pleural de pacientes não infectados pelo *M. tuberculosis* foram obtidas através de indução à expectoração, broncoscopia

respiratória e/ou toracocentese, respectivamente, em volumes suficientes para o estudo. Para testar o limiar de detecção do M. tuberculosis, as amostras foram preparadas "in vitro" de maneira a conter concentrações variadas dos interferentes pré-analíticos e de UFC/mL da micobactéria. Para a técnica de PCR, o DNA foi extraído pelo método de extração QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e pelo AMPLICOR® Respiratory Specimen Preparation (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) e amplificado e detectado por três métodos: 1) COBAS® TaqMan® MTB Test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA); 2) MTB Q – PCR Alert Kit (Nanogen Advanced Diagnosis, Trezzano, Italy) e 3) "in-house" ou caseiro. Desta maneira, foram testadas as seguintes combinações: Extração Roche/detecção Roche (R/R); Extração Roche/detecção Nanogen (R/N); Extração Roche/detecção "in house" (R/IH); Extração Qiagen/detecção Roche (Q/R); Extração Qiagen/detecção Nanogen (Q/N) e Extração Qiagen/detecção "in house" (Q/IH). **Resultados:** Em amostras de escarro, a quantidade de células e de hemácias não interferiu na detecção do M. tuberculosis, com exceção do método de extração/detecção Roche. Nas amostras de LBA, médias e altas concentrações de células e altas concentrações de hemácias contribuíram para menor detecção do MTB quando utilizado o método de detecção Roche, enquanto que no líquido pleural, a concentração de hemácias foi a variável que mais interferiu na detecção do agente. Em ambas as situações a menor detecção foi obtida com a combinação Q/N. **Conclusão:** A qualidade pré-analítica das amostras biológicas recebidas no laboratório clínico pode interferir no desempenho diagnóstico dos testes moleculares. A escolha dos métodos de extração e detecção é de fundamental importância na sensibilidade analítica do teste, para garantia de melhores resultados, especialmente quando trabalhamos com amostras paucibacilares que contém potenciais inibidores da reação.

**Descritores:** *tuberculose, escarro, líquido da lavagem broncoalveolar, líquidos corporais, líquido extracelular, reação em cadeia da polimerase/métodos.*

