

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

Detecção de DNA de micobacterias dos Complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* em amostras parafinadas de pacientes transplantados renais

Natália Oliveira Belgate

**Botucatu - SP
2012**

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

Detecção de DNA de micobacterias dos Complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* em amostras parafinadas de pacientes transplantados renais

Natália Oliveira Belgate

Orientadora: Prof.^a Dr^a Edna Sadayo Miazato Iwamura

Co-orientadora: Msc. Denise Barcelos

Supervisor: Prof.^a Dr^a Vera Lúcia Rall

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**Botucatu - SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Belgate, Natália Oliveira.

Detecção de DNA de micobactérias dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* em amostras parafinadas de pacientes transplantados renais / Natália Oliveira
Belgate. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Edna Sadayo Miazato Iwamura

Coorientador: Denise Barcelos

Capes: 20804008

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Rins - Transplantes. 3. Tuberculose. 4.
Biologia molecular. 5. Micobactérias.

Palavras-chave: Biologia molecular; *M. avium*; *M. tuberculosis*; Transplante renal; Tuberculose.

Dedicatória

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais, Rosângela e Cezar, que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse a esta etapa de minha vida. Ao meu irmão, Bruno, pelo carinho, força e amizade. À minha avó, Ermantina, pela força e incentivo.

Agradecimento

A Deus, pela força e coragem durante esta longa caminhada.

À minha família, por todo o incentivo.

Aos meus amigos e amigas que foram minha família em Botucatu, pelo apoio, alegria e amizade.

Sentirei saudade.

À minha querida amiga Niele "Lady", por ter me suportado e apoiado por todo este tempo.

Às meninas do laboratório, Karina, Denise e Andréia, pelos ensinamentos, paciência e amizade. Não teria conseguido sem vocês.

À professora Edna, pela orientação deste trabalho.

À Dr^a Fria, Visoná por todo seu tempo e colaboração.

À Universidade Federal de São Paulo, ao Departamento de Patologia e seus funcionários pela oportunidade de realizar este estágio, atenção e disponibilidade.

À Dra Rosângela Siqueira de Oliveira, pesquisadora científica do Instituto Adolfo Lutz - Centro de Bacteriologia Núcleo de Tuberculose e Micobacteriose pela colaboração.

*"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades;
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível."*

Charles Chaplin

Sumário

1. RESUMO.....	5
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUÇÃO	8
4. OBJETIVOS	15
5. MATERIAIS E MÉTODO	16
5.1. Procedimentos de rotina do departamento de patologia	16
5.1.1. Obtenção das amostras	17
5.1.2. Grupos estudados.....	17
5.2. Microtomia.....	17
5.3. Extração de DNA	18
5.3.1. Método de Extração	18
5.4. Amplificação PCR	19
5.4.1. Condições para PCR <i>β-actina</i> humana.....	19
5.4.2. Condições para PCR da sequência de inserção <i>IS6110</i>	20
5.4.3. Condições para PCR da seqüência de inserção <i>IS1245</i>	20
5.5. Avaliação do DNA extraído	21
5.5.1. Pureza e rendimento do DNA	21
5.6. Análise do DNA extraído	21
6. Resultados	22
7. Discussão.....	26
8. Conclusão	30
9. Bibliografia.....	31

Índice de Figuras

Figura 1. Desenho Experimental	15
Figura 2. Blocos de Parafinade Biópsia de Pulmão	16
Figura 3. Lâminas de Ziehl Neelsen de Biópsias Sinoviais de Joelho (menores) e de Pulmão (maiores)	16
Figura 4. Tubos com cortes dos blocos.....	18
Figura 5. Gel de Agarose para Análise de PCR - <i>M. avium</i> . Padrão de peso molecular (PPM) 50pb, amostras 8,29,38,50,52,53,54,55,56,57,59,60,62,63,64, controle positivo: DNA purificado de colônia de <i>M. avium</i> – PCR de fragmento de 106 pb – primer <i>IS1245</i> . A seta vertical indica reação positiva da amostra 59 e controle positivo e sugestivo da amostra 52.....	24
Figura 6. Gel de Agarose para Análise de PCR - <i>M. tuberculosis</i> . Amostras 24,25,35 (em duplicata), 26,27,36, controle positivo: DNA purificado de colônia	

de *M. tuberculosis*–PCR de fragmento de 126 pb – primer *IS6110*. A seta vertical indica reação positiva da amostra 25,35 e controle positivo. 24

Figura 7. Gel de Agarose para Análise de PCR - β -actina. Amostras 10,14,20,22,39,44,45, controle positivo:..... 25

Índice de Tabelas

Tabela 1. Primers utilizados para detecção do gene da <i>B-actina</i> humana.....	19
Tabela 2. Condições e volume dos reagentes utilizados na reação de PCR para <i>B-actina</i> humana	19
Tabela 3. Primers utilizados para detecção da sequência de inserção <i>IS 6110</i>	20
Tabela 4. Condições e volume dos reagentes utilizados na reação de PCR para <i>IS 6110</i>	20
Tabela 5. Primers utilizados para detecção da sequência de inserção <i>IS1245</i>	21
Tabela 6. Condições e volume dos reagentes utilizados na reação de PCR para <i>IS 1245</i>	21
Tabela 7. Tipos de tecidos das amostras.	22
Tabela 8. Resultados de PCR para <i>β-actina</i> , <i>IS6110</i> e <i>IS1245</i>	23
Tabela 9. Detalhes das Reações de PCR	23

1. RESUMO

Introdução: A Tuberculose (TB) é uma doença granulomatosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. O gênero *Mycobacterium* possui dois complexos diferenciados: Complexo *M. tuberculosis* e Complexo *M. avium*. Esta é uma epidemia de saúde global e continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, sendo a gravidade clínica da TB significativamente maior nos doentes transplantados. A detecção de micobacterias desses Complexos em pacientes transplantados, por métodos moleculares, é fundamental para o rápido tratamento destes pacientes e pode contribuir cada vez mais para a rapidez e precisão destes exames. **Objetivo:** Detectar o DNA de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* e *M. avium* em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFIP) de pacientes de dois grupos: não transplantados e transplantados renais. **Materiais e Métodos:** Foram utilizadas 40 biópsias FFIP divididas em quatro grupos: NTP - presença de granuloma epitelióide e coloração ZN “positiva”, pacientes não transplantados- 9 amostras; NTN - presença de granuloma epitelióide e coloração ZN “negativa”, pacientes não transplantados - 10 amostras; TP - coloração ZN “positiva” de pacientes transplantados – 9 amostras; TN - coloração ZN “negativa” de pacientes transplantados – 7 amostras. Cortes foram obtidos para extração de DNA. Foi realizada PCR para: a) β -actina, b) inserção *IS6110* e c) inserção *IS1245*. Avaliação do DNA foi realizada através de espectrofotometria e rendimento (Nanodrop). A análise de PCR dos primers de inserção *IS6110* e *IS1245* foi avaliada em gel de agarose sob luz UV. **Resultados:** Em 97,1% do total de amostras foram positivas para o gene β -actina humana. Em 22,2% das amostras do grupo NTP foi encontrado a Sequência de Inserção *IS6110* e não foi encontrado a *IS1245*. No grupo NTN não foram encontrados nenhuma das sequências. No grupo TP, 11,1% das amostras apresentaram positividade para *IS6110* e, também, 11,1% positivo para *IS1245*. No grupo TN, 14,3% das amostras foram positivas para *IS6110* e para *IS1245*, 14,3% também foi positivo. **Conclusão:** Apesar de fatores como fragmentação de DNA após fixação em formalina e inclusão em parafina, foi possível a detecção de DNA do gene β -actina humana, da Sequência de Inserção *IS6110* de *M. tuberculosis*

e de Sequência de Inserção *IS1245* de *M. avium* em pacientes transplantados renais.

2. ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis (TB) is a granulomatous disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. The genus *Mycobacterium* has two different complexes: *M. tuberculosis* Complex and *M. avium* Complex. This is a global health epidemic and remains a major global health problem, besides, the clinical severity of TB is significantly higher in transplanted patients. The detection of these mycobacteria complexes in transplanted patients, by molecular methods, is fundamental for quick treatment of patients and can contribute for rapid and accuracy of diagnosis. **Objective:** To detect mycobacteria DNA of *M. tuberculosis* and *M. avium* Complexes in formalin fixed paraffin-embedded samples (FFPE) of two patients groups: non transplanted and transplanted. **Materials and Methods:** The study includes 40 FFPE biopsies separated in four groups: NTP – presence of epithelioid granuloma and positive ZN, non-transplanted patients – 9 samples; NTN - presence of epithelioid granuloma and negative ZN, non-transplanted patients – 10 samples; TP – positive ZN, transplanted patients – 9 samples; TN – negative ZN, transplanted patients – 7 samples. Sections were cut for DNA extraction. Samples were submitted to PCR for amplification of: a) β -actin, b) *IS6110* insertion and c) *IS1245* insertion. DNA evaluation was made by spectrophotometry and efficiency and PCR analysis was made by agarose gels under UV light. **Results:** In all samples processed, 97.1% were positive for human β -actin gene. In 22.2% of NTP group were found the *IS6110* insertion sequence but the *IS1245* wasn't. In the NTN group was not found any sequence. In the TP group, 11.1% of the samples were positive for *IS6110* and also 11.1% were positive for *IS1245*. In the TN group, 14.3% of the samples were positive for *IS6110* and for *IS1245*, 14.3% was also positive. **Conclusion:** Although factors such as DNA degradation after formalin fixation and paraffin embedding, were possible to detect DNA from the human gene β -actin, the insertion sequence *IS6110* from *M. tuberculosis* and insertion sequence *IS1245* from *M. avium* in renal transplant patients.

3. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença granulomatosa crônica causada pela bactéria chamada *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecida como bacilo de Koch, e ocasionalmente por outras espécies como *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum* (1). O gênero *Mycobacterium* possui dois Complexos diferenciados: Complexo *M. tuberculosis* e Complexo *M. avium*(2).O complexo de *M. tuberculosis* inclui, entre outros, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*; já o complexo *M. avium* inclui: *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. Hominissuis*, *M. avium subsp. paratuberculosis* e *M. intracellulare*(3).

Esta é uma epidemia de saúde global e continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Em 2010 a estimativa existente era de 8.8 milhões de casos incidentes de TB em todo mundo e este número absoluto de casos continua com ligeiro aumento de ano para ano devido à redução lenta nas taxas de incidência ser compensada pelo aumento da população (4). Outra causa conhecida para tal aumento de incidência é a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV), que além da TB também agrava os números de infecções por micobactérias atípicas(5).

Neste mesmo ano, estabeleceu-se uma estimativa de 1,1 milhões de mortes entre os casos de TB em HIV negativos e cerca de 650.000 casos dos 12 milhões de casos prevalentes foram devidos à resistência a antibióticos (4).Infelizmente, mesmo com a existência de métodos diagnósticos eficientes, que deveriam ser rápidos e confiáveis para se dar início a um correto tratamento, aproximadamente dois milhões de pessoas morrem por ano devido à TB(6).

Apesar de 90% da incidência de tuberculose em humanos ser pulmonar existem outros sítios que apresentam a doença, principalmente em pacientes imunossuprimidos. O quadro clínico de tuberculose pulmonar é bastante conhecido e muitas vezes inespecífico, pois, o paciente apresenta quadro febril persistente, tosse, sudorese noturna, acompanhado por raios-X do tórax sombreados ou aumento de linfonodo(7).

Para o diagnóstico de tuberculose é necessária a observação de alguns indícios histopatológicos como, por exemplo, a presença de inflamação crônica, muitas vezes com presença de granuloma epitelióide. O granuloma epitelióide é indicativo de tuberculose, mas em casos de pacientes imunossuprimidos, onde a resposta imunológica é ausente ou falha ele pode não se formar dificultando assim a suspeita da doença(8)(9).

Os doentes transplantados apresentam a deficiência adquirida da imunidade celular que condiciona um aumento da susceptibilidade às infecções. Em pacientes transplantados renais, a TB pode surgir nos primeiros 12 meses pós-transplante. A maioria dos casos de tuberculose nesses pacientes ocorre devido à reativação de um foco infeccioso latente de micobactéria, que persistiu após um contágio prévio (TB latente); raramente é transmitida através do enxerto renal ou do contato com pessoas infectadas (10). Cerca de 4,5% dos pacientes transplantados renais acabam por desenvolver quadros de TB(11).

A TB nesses casos poderá envolver vários órgãos além do pulmão, como o trato gastrointestinal (TGI), pele e mucosas, peritônio, linfonodos, ossos, rins e órgãos sólidos(12), sendo mais frequentes a TB pleuro-pulmonar e disseminada. Isto dificulta muitas vezes o seu diagnóstico, em virtude das manifestações clínicas serem frequentemente diversas e atípicas. A gravidade clínica da TB é significativamente maior nos doentes transplantados representando, neste grupo de doentes, uma taxa de mortalidade entre 20 e 30% (10).

A TB em pacientes imunocomprometidos geralmente é causada por espécies de micobactéria que não o *M. tuberculosis*. Portanto, a detecção e diferenciação entre *M. tuberculosis* e não-tuberculosis são necessárias nesses casos(13).

Diagnóstico

Até o final dos anos 80, o diagnóstico microbiológico de TB era somente realizado através de microscopia e cultura(6).

A microscopia é um método rápido e barato, mas apresenta baixa sensibilidade se comparado com técnicas moleculares. Através da técnica de Ziehl Neelsen, que é altamente específica para BAAR (bacilo álcool ácido resistente), pode-se dar o diagnóstico de TB, mas além de não fazer distinção entre as diferentes espécies de *M. tuberculosis*(14), é necessário um grande número de micobactérias na amostra para sua detecção(15).

Técnicas de cultura oferecem melhor sensibilidade, e continuam sendo o padrão ouro, mas o tempo necessário para se obter resultados positivos varia entre duas e seis semanas, pois as micobactérias crescem em velocidade lenta. Mesmo se utilizados métodos para diminuir esse tempo, ainda é necessária de uma a duas semanas para obtenção do resultado final(6)(15)(16).

Quando se analisa material de biópsia é preciso considerar o tamanho do fragmento, pois, em amostras muito pequenas, a quantidade de material e, portanto, de bacilos é insuficiente para a detecção. Por exemplo, quando o material analisado é a pele, essas técnicas convencionais de laboratório geralmente falham na obtenção de resultados positivos, devido à falta de bacilos na maioria das lesões de pele(17). Tais métodos também podem não ser opções se as amostras são fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFIP) para exame histopatológico(6).

A identificação rápida e precisa da espécie de micobactéria é importante para um tratamento de sucesso, através de antibióticos, uma vez que o tratamento difere para *M. tuberculosis* e não-tuberculosis, e para a implementação de medidas de saúde pública, já que devido à gravidade clínica, faz-se necessário o rápido isolamento do paciente(18)(19).

Outro agravante é o fato das espécies que compõem o complexo *M. tuberculosis* serem muito semelhantes entre si, dificultando a identificação da tuberculose pulmonar por métodos tradicionais(20).

Entre os cerca de nove milhões de novos casos anuais de TB, a resistência de *M. tuberculosis* a antibióticos tem se tornado um problema crescente. O surgimento de tuberculose resistente a múltiplas drogas, (MDR)-TB e, mais recentemente, de tuberculose extensivamente resistente a drogas, (XDR)-TB é uma grande ameaça no controle e eliminação desta doença (21).

A rápida detecção de resistência a medicamentos de primeira linha é essencial para um controle eficiente de tuberculose multirresistente, como é o caso da rifampicina, que é um importante marcador para a descoberta de multirresistência a drogas em isolados de *M. tuberculosis*(16).

Sabe-se que diferentes famílias genotípicas de *M. tuberculosis* têm diferentes graus de virulência provocando diferentes respostas imunológicas, que podem se manifestar como aumento da habilidade de certos tipos genéticos em adquirirem resistência a drogas. Isto pode também afetar os resultados de testes diagnósticos (21).

Em meio a essas dificuldades, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) surge como uma ferramenta promissora para o diagnóstico de TB, principalmente quando o Ziehl Neelsen (BAAR) apresenta-se negativo, sendo um método altamente específico e sensível se comparado à outra técnica(22)(14)(5). Em material fresco, são utilizadas as reações de PCR tradicional e PCR real time em vários laboratórios em todo mundo, e, para isso, amplificam sequências específicas de DNA do Complexo *M. tuberculosis* e do Complexo *M. avium*.

Uma vantagem da PCR tradicional é que possibilita um diagnóstico imediato para o início adequado do tratamento, também por possuir alta sensibilidade, podendo detectar a bactéria em uma amostra contendo menos de 10 organismos(5). Quanto ao PCR real time, a vantagem é que pode ainda quantificar a carga de bactéria presente, sendo, portanto uma ferramenta poderosa(23). É recomendado o uso da PCR especialmente em casos com pequenas amostras de biopsia ou casos de pacientes imunossuprimidos, mesmo quando só há inflamação crônica, sem uma evidencia definitiva de inflamação granulomatosa(24).

Apesar das vantagens na utilização destes métodos deve-se considerar a sua alta sensibilidade e, portanto o risco de contaminação da amostra durante o manuseio. Considerando esse aspecto, PCR em tempo real (RT-PCR) serve como alternativa, uma vez que PCR e análise do fragmento são realizadas em um único tubo fechado, diminuindo, portanto o risco de contaminação.

Consequentemente, um grande número de métodos para amplificação por PCR foram desenvolvidos para detecção de tuberculose em escarro, material de cultura e tecidos não processados. Muitos pesquisadores acreditam que a PCR é um método adequado em amostras cutâneas frescas e congeladas, amostras respiratórias não fixadas (que são naturalmente contaminadas por muitas espécies diferentes de microrganismos comensais e patogênicos e, portanto necessitam de um alto grau de especificidade para o reconhecimento de *M. tuberculosis*) e fluidos, assim como em uma variedade de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, com sensibilidade e especificidade atingindo valores entre 90-100% e 92-100% respectivamente, quando comparados com cultura(17)(25). Apesar de muitos estudos sobre o uso dessa técnica nenhum deles avaliou cuidadosamente um protocolo mais confiável que pode superar os problemas de amplificação de DNA de *M. tuberculosis* de material FFIP.

Complexo M. tuberculosis

A Sequência de Inserção usada na detecção de *M. tuberculosis* para o diagnóstico de TB é a IS6110. Este é o elemento mais abundante no genoma do complexo *M. tuberculosis* e varia entre zero e vinte e cinco cópias, e, aparentemente, é ausente em outras espécies de micobactéria. Entretanto, existem algumas cepas de *M. tuberculosis* que não contém essa sequência, explicando dessa forma a redução de sensibilidade da PCR(12)(26)(14)(25)(24).

Complexo M. avium

Para a detecção de *M. avium* diversas Sequências de Inserção podem ser utilizadas, dependendo da subespécie ou da patogenia. A sequência de Inserção IS1245, por exemplo, pode conter entre sete e vinte e sete cópias desta inserção em seu genoma(27)(28). Outras Sequências também relatadas são IS90 e IS901(29)(30)(31).

Qualidade das amostras

Para investigações histopatológicas, amostras de tecido humano são, em sua maioria, arquivadas através de fixação em formol e inclusão em parafina (FFIP)(32). Porém, a sensibilidade e especificidade dos exames utilizados nestas amostras, como coloração Ziehl Neelsen (ZN) e até Imunohistoquímica é baixa(33). Assim, a análise molecular e genotípica desses tecidos FFIP se tornou de grande interesse nos últimos anos(8), pois ácidos nucleicos de amostras FFIP poderiam ser usados no desenvolvimento e validação de biomarcadores uma vez que o material obtido da fixação permite a preservação de DNA, RNA e proteínas(34).

Considerando que é grande o número de amostras arquivadas, estas constituiriam uma valiosa fonte para a investigação de diagnósticos, prognósticos ou fatores preditivos de doenças. Além do que, os blocos de parafina geralmente representam o único material diagnóstico disponível(35). Outra vantagem na preservação dos blocos é que a repetição da coleta, além de ser inconveniente é em muitos casos impossível(6).

A qualidade de amostras FFIP depende de condições pré-analíticas, incluindo o tempo de isquemia, condições de fixação, assim como a sensibilidade do método de amplificação das amostras depende da duração da fixação, do fixador, do procedimento de extração de DNA, do tamanho dos amplicons e da idade do bloco de parafina, bem como da presença de inibidores da reação, endógenos ou exógenos(36)(6)(14)(32)(37).

A sensibilidade é considerada baixa nas amostras arquivadas de três até cinco anos, o que pode ser explicado pelo dano causado ao DNA. Sabe-se que amostras FFIP arquivadas por longo tempo não são tão adequadas quanto amostras frescas. Para uma amplificação de sucesso de DNA humano proveniente de amostras arquivadas de quatro a seis anos é necessário gerar, na PCR, fragmentos de tamanho menor que dos fragmentos que seriam amplificados a partir de amostras arquivadas a menos de dois anos(6).

Infelizmente, a qualidade dos ácidos nucleicos obtidos de amostras FFIP são inferiores àquelas obtidas de tecido congelado, mas com a utilização e adequação de controles apropriados, tal utilidade pode ser obtida e validada(34)(38).

Desse modo, a detecção de micobacterias dos Complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*, em pacientes transplantados, por métodos moleculares, é fundamental para que o tratamento destes pacientes seja iniciado rapidamente. Além disso, a possibilidade da utilização de amostras parafinadas arquivadas no Departamento de Patologia em colaboração com o Hospital do Rim pode propiciar a implantação deste tipo de análise diagnóstica no Departamento contribuindo para rapidez e precisão destes exames.

4. OBJETIVOS

Detectar o DNA de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* e *M. avium* em amostras FFIP de pacientes de dois grupos: não transplantados e transplantados renais.

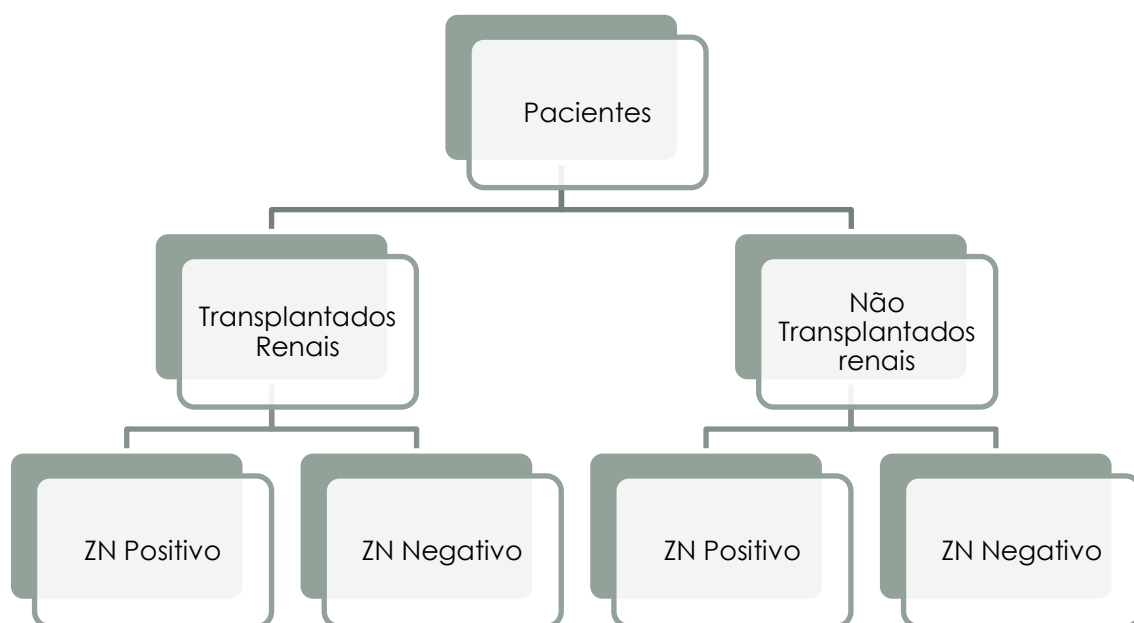


Figura 1. Desenho Experimental

5. MATERIAIS E MÉTODO

Casuística

5.1. Procedimentos de rotina do departamento de patologia

O material do paciente, ao ser obtido, é fixado em formalina e incluído em parafina. Dos blocos são retiradas fatias do tecido parafinado e são montadas lâminas que serão posteriormente coradas pelo método de HE (hematoxilina eosina) que permite ao patologista a visualização da morfologia celular, seus agrupamentos e variações de acordo com a lesão investigada. Casos haja lesão indicativa de tuberculose (granuloma epitelióide) é solicitada a coloração Ziehl Neelsen (ZN) que permite a visualização de micobactérias causadoras da tuberculose quando presentes. Os blocos são então encaminhados para o acervo da escola e arquivados.



Figura 2. Blocos de Parafinade Biópsia de Pulmão

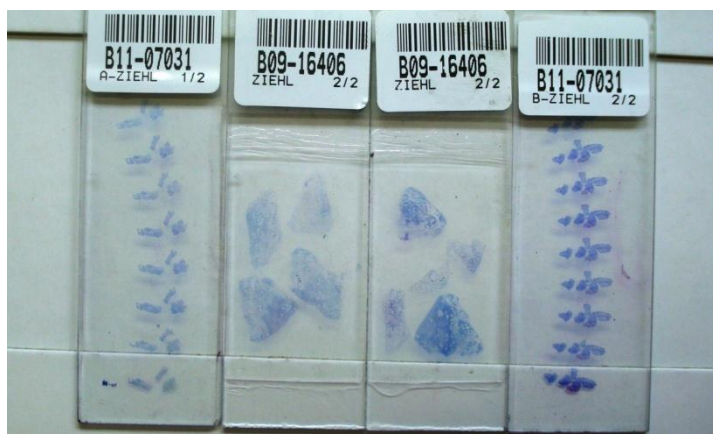


Figura 3. Lâminas de Ziehl Neelsen de Biópsias Sinoviais de Joelho (menores) e de Pulmão (maiores)

5.1.1. Obtenção das amostras

As amostras foram selecionadas por pesquisa de laudos gerados pelo departamento.

5.1.2. Grupos estudados

Neste estudo foram utilizados 50 blocos de biópsias fixadas em formalina 10% e incluídas em parafina procedentes do arquivo do Departamento de Patologia da UNIFESP.

As amostras foram distribuídas de acordo com os seguintes grupos:

- Não Transplantado Positivo - NTP - Biópsias de pacientes não transplantados renais com presença de granuloma epitelióide e coloração ZN positivas (controle positivo) - 9 amostras
- Não Transplantado Negativo - NTN - Biópsias de pacientes não transplantados renais com presença de granuloma epitelióide e coloração ZN negativas (grupo teste) - 10 amostras
- Transplantados Positivos - TP - Biópsias de pacientes transplantados renais com coloração ZN positivas (controle positivo) - 9 amostras
- Transplantados Negativos - TN - Biópsias de pacientes transplantados renais e coloração ZN negativas (grupo teste) - 7 amostras

5.2. Microtomia

Em nosso trabalho, tivemos o cuidado de separar as amostras mais representativas da lesão selecionando as áreas de interesse. Para tal, a lâmina de microscopia óptica, já analisada pelo patologista, foi sobreposta ao bloco de parafina.

Em seguida, três cortes com aproximadamente 10 µm de espessura, de cada amostra, foram obtidos em micrótomo do tipo *Minot* (Leica, Modelo RM 2035) e armazenados em microtubos de 1,5 ml para posterior extração de DNA.



Figura 4. Tubos com cortes dos blocos

5.3. Extração de DNA

5.3.1. Método de Extração

Kit comercial (QiagenQIAamp DNA Mini kit)

Os procedimentos de extração foram realizados de acordo com as instruções do manual do kit, lote 133218101.

Um mililitro (1 ml) de xilol, pré-aquecido a 60°C, é adicionado ao tubo contendo as secções de tecido parafinado e vortexado vigorosamente. Em seguida o tubo é centrifugado em velocidade máxima durante 5 minutos, o sobrenadante é descartado.

Adiciona-se 1 ml de etanol absoluto ao tubo. Este é vortexado gentilmente e em seguida centrifugado em velocidade máxima por 5 minutos. Este processo é repetido por mais uma vez. A seguir, o tubo é incubado aberto a 37°C por 10-15 minutos até o etanol ter evaporado.

O pellet é ressuspendido em 180µL de Buffer ATL e são adicionados 20µL de proteinase K (30mg/µl), vortexado e incubado a 56°C por 2 horas. Após digestão pela proteinase K, são adicionados 200µL de Buffer AL, vortexados por 15 segundos e incubados a 70°C por 10 minutos.

Em seguida são adicionados 200µL de etanol absoluto, vortexado por 15 segundos e a mistura é transferida para a coluna do kit, sem encostar-se à membrana. O tubo é então centrifugado a 8000rpm por 1 minuto e a coluna é transferida para um novo tubo coletor.

São adicionados 500µL de Buffer AW1, o tubo é centrifugado a 8000rpm por 1 minuto e a coluna é transferida para um novo tubo coletor. Em seguida são adicionados 500µL de Buffer AW2 e o tubo é centrifugado a 14000rpm por 3 minutos.

A coluna é transferida para um tubo eppendorf limpo de 1,5mL e são adicionados 200µL de Buffer AE. O tubo é incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida centrifugado a 8000rpm por 1 minuto. A coluna é descartada e o material é armazenado a -20°C até sua utilização.

5.4. Amplificação PCR

5.4.1. Condições para PCR *β-actina* humana

Em todas as amostras foi realizada uma reação de amplificação do gene de *β-actina* humana para controle de qualidade da extração e viabilidade do DNA extraído. Para tal, foram utilizados primers que amplificam um fragmento de 135bp, com concentração de 0,4µM na reação.

	Sequência de Inserção	Tamanho
<i>β-actina</i> F (5'-3')	AGC GGG AAA TCG TGC GTG	135 pb
<i>β-actina</i> R (5'-3')	GGT GAT GAC CTG GCC GTC	

Tabela 1. Primers utilizados para detecção do gene da *B-actina* humana

Componentes	Volume Amostra (µL)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
H ₂ O	8,5	40 Ciclos	96	5
Primer <i>β-actina</i> F	1,25		96	2
Primer <i>β-actina</i> R	1,25		60	2
Master Mix (Quiagen®)	12		72	2
DNA	2		72	7
TOTAL	25		4∞	

Tabela 2. Condições e volume dos reagentes utilizados na reação de PCR para *B-actina* humana

Como controle negativo e positivo da amplificação foram utilizados água MilliQ e K562 (Promega®), respectivamente.

5.4.2. Condições para PCR da sequência de inserção *IS6110*

Para se demonstrar a presença de DNA de micobactéria do Complexo *M. tuberculosis* será amplificada uma região da sequência de inserção *IS6110*. Esta reação conterà 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1.5 mM MgCl₂, 100µM dNTPs, e 1 U de TaqPolymerase. O primer está na concentração de 0,4µM por reação.

	Sequência de Inserção	Tamanho
<i>IS6110</i> F (5'-3')	CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG	126 pb
<i>IS6110</i> R (5'-3')	CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG	

Tabela 3. Primers utilizados para detecção da sequência de inserção *IS 6110*

Componentes	Volume Amostra (µL)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
H ₂ O	8,5	40 Ciclos	96	5
Primer <i>IS6110</i> F	1,25		96	1
Primer <i>IS6110</i> R	1,25		65	1
Master Mix (Quiagen®)	12		72	1
DNA	2		72	7
TOTAL	25		4∞	

Tabela 4. Condições e volume dos reagentes utilizados na reação de PCR para *IS 6110*

Como controle negativo e positivo da amplificação foram utilizados água MilliQ e DNA purificado de *M. tuberculosis*, bem como amostra parafinada de *TB miliar sabidamente positiva*, respectivamente.

5.4.3. Condições para PCR da sequência de inserção *IS1245*

Para se demonstrar a presença de DNA de micobactéria do Complexo *M. avium* será amplificada uma região da sequência de inserção *IS1245*. Esta reação conterà 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1.5 mM MgCl₂, 100µM dNTPs, e 1 U de TaqPolymerase. O primer utilizado provem da Biosearch Technologies®, lote55195481-39/40, e está na concentração de 5µM.

	Sequência de Inserção	Tamanho
<i>IS1245</i> F (5'-3')	TGG ACC AGT CTG CCT T	106 pb
<i>IS1245</i> R (5'-3')	CGT CGT AAG GCT TGG TAG	

Tabela 5. Primers utilizados para detecção da sequência de inserção *IS1245*

Componentes	Volume Amostra (μL)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
H ₂ O	8,5	40 Ciclos	96	5
Primer <i>IS1245</i> F	1,25		96	2
Primer <i>IS1245</i> R	1,25		60	2
Master Mix (Quiagen®)	12		72	2
DNA	2		72	7
TOTAL	25		4∞	

Tabela 6. Condições e volume dos reagentes utilizados na reação de PCR para *IS 1245*

Como controle negativo e positivo da amplificação foram utilizados água MilliQ e DNA purificado de *M. avium*, respectivamente.

5.5. Avaliação do DNA extraído

5.5.1. Pureza e rendimento do DNA

A pureza do DNA foi avaliada por espectrofotometria, através do aparelho Nanodrop (ThermoScientific®), calculando a taxa A_{260}/A_{280} para as impurezas das proteínas. A concentração de DNA presente nas amostras foi calculada em ng/μl/cm². O rendimento do DNA foi calculado pelas amostras limpas em A_{260} .

5.6. Análise do DNA extraído

As amostras são analisadas por eletroforese, o gel de agarose a 2% é corado com Gel Red (Biotium®) para visualização dos *amplicons*.

6.Resultados

As amostras utilizadas provinham de diferentes pacientes e eram compostas por diversos tecidos, como demonstrado na tabela abaixo.

Tecido	Nº amostras
Linfonodo	6
Pulmão	6
Rim	5
Cólon-ceco	3
Pleura	2
Fígado	2
Mama	1
Sinóvia de Joelho	1
Nódulo Pleural	1
Brônquios	1
Esvaziamento Cervical	1
Mucosa Nasal	1
Pericárdio	1
Região Axilar	1
Pele	1
Vértebra	1
Necropsia	1
TOTAL	35

Tabela 7. Tipos de tecidos das amostras.

A extração de DNA e as PCRs do gene *β-actina humana*, Sequência de Inserção *IS6110* e *IS1245* foram realizada em todas as 35 amostras. Apenas uma amostra das 35 (2,8%) não foi positiva para a PCR do gene da *β-actina humana*, isso demonstrou a viabilidade da grande maioria das amostras, como mostra a tabela 9.

No grupo NTP (Não Transplantado Positivo), em apenas 22,2% das amostras confirmou-se a presença de *M. tuberculosis* através da amplificação da Sequência de Inserção *IS6110*. Como esperado, nenhuma amostra foi positiva para a Sequência de Inserção *IS1245* de *M. avium*.

No grupo NTN (Não Transplantado Negativo), não foi encontrada nenhuma amostra com a Sequência de Inserção *IS6110* ou *IS1245*, como já era esperado.

No grupo TP (Transplantado Positivo), 11,1% das amostras mostraram-se positivas para Sequência de Inserção *IS6110* de *M. tuberculosis*. Outros 11,1% das amostras apresentaram-se positivas para *M. avium*.

No grupo TN (Transplantado Negativo), 14,3% das amostras, inesperadamente, apresentaram positividade para a sequência *IS6110*, enquanto em outros 14,3% foram detectados a sequência de *IS1245*.

Grupos	Nº de Amostras	<i>B-actina humana</i>	<i>IS6110</i>	<i>IS1245</i>
NTP	9	9 (100%)	2 (22,2%)	0 (0%)
NTN	10	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
TP	9	9 (100%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)
TN	7	6 (85,71%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)
TOTAL	35	34 (97,1%)	4 (11,5%)	2 (5,71%)

Tabela 8. Resultados de PCR para *B-actina*, *IS6110* e *IS1245*

Amostras	Grupo	PCR <i>B-actina humana</i>	PCR <i>IS6110</i>	PCR <i>IS1245</i>
B090004812 (8)	NTP	+	-	-
B090016406 (13)	NTP	+	+	-
B100003777 (24)	NTP	+	-	-
B100008858 (25)	NTP	+	+	-
B110014679 (29)	NTP	+	-	-
B110017057 (38)	NTP	+	-	-
B120012106 (53)	NTP	+	-	-
N1212 (54)	NTP	+	-	-
B070018778 (55)	NTP	+	-	-
B080031768 (9)	NTN	+	-	-
B090016898 (14)	NTN	+	-	-
B090015702 (15)	NTN	+	-	-
B090025125 (17)	NTN	+	-	-
B090028549 (18)	NTN	+	-	-
B090032107 (20)	NTN	+	-	-
B100018329 (27)	NTN	+	-	-
B090003649 (39)	NTN	+	-	-
B090003964 (40)	NTN	+	-	-
B110002644 (42)	NTN	+	-	-
B090010945 (11)	TP	+	-	-
B090014518 (12)	TP	+	-	-
B100002888 (23)	TP	+	-	-
B100021304 (41)	TP	+	-	-
B120002183 (50)	TP	+	-	-
B100020363 (52)	TP	+	-	+
B050017867 (60)	TP	+	+	-
B120004009 (62)	TP	+	-	-
B060030226 (63)	TP	+	-	-
B100009155 (26)	TN	+	-	-
B110019448 (35)	TN	+	+	-
B110003623 (43)	TN	+	-	-
B050001040 (56)	TN	-	-	-
B080002166 (57)	TN	+	-	-
B120000763 (59)	TN	+	-	+
B110019755 (64)	TN	+	-	-

Tabela 9. Detalhes das Reações de PCR

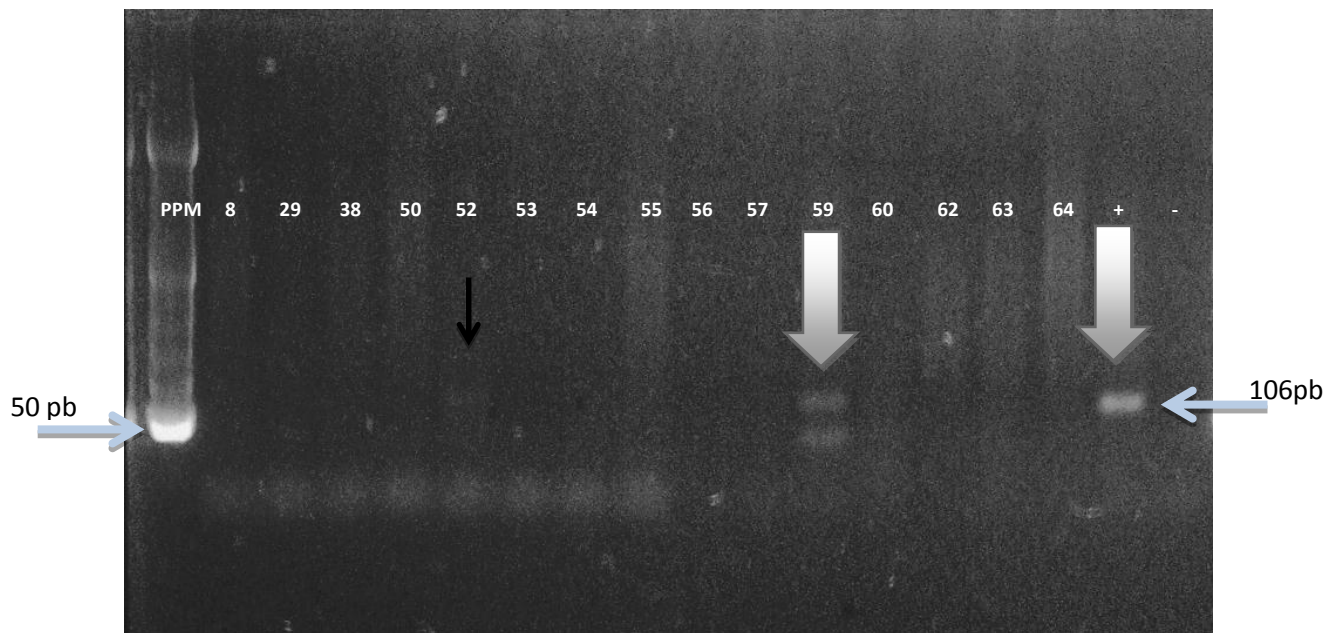


Figura 5. Gel de Agarose para Análise de PCR - *M. avium*. Padrão de peso molecular (PPM) 50pb, amostras 8,29,38,50,52,53,54,55,56,57,59,60,62,63,64, controle positivo: DNA purificado de colônia de *M. avium* – PCR de fragmento de 106 pb – primer *IS1245*. A seta vertical indica reação positiva da amostra 59 e controle positivo e sugestivo da amostra 52.

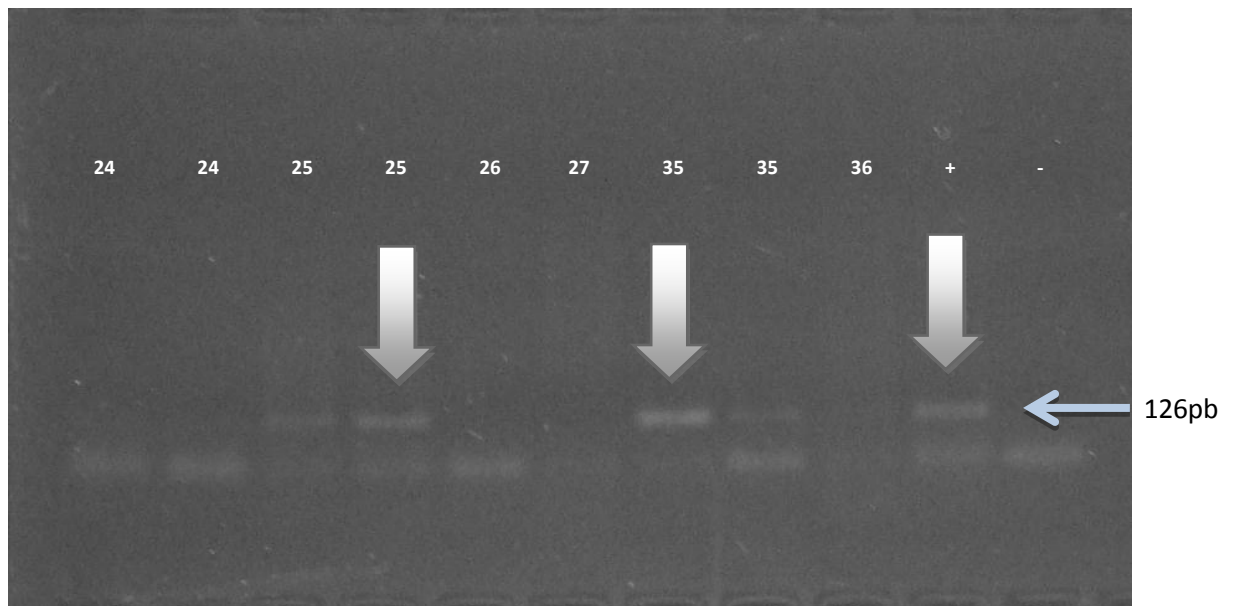


Figura 6. Gel de Agarose para Análise de PCR - *M. tuberculosis*. Amostras 24,25,35 (em duplicata), 26,27,36, controle positivo: DNA purificado de colônia de *M. tuberculosis*–PCR de fragmento de 126 pb – primer *IS6110*. A seta vertical indica reação positiva da amostra 25,35 e controle positivo.

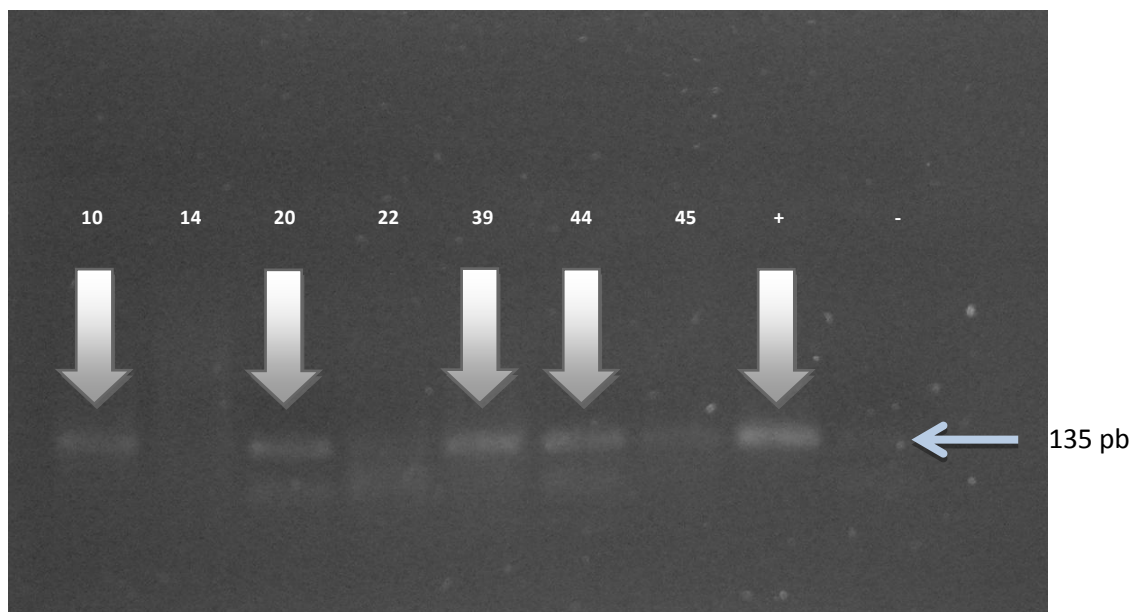


Figura 7. Gel de Agarose para Análise de PCR - β -actina. Amostras 10,14,20,22,39,44,45, controle positivo: DNA K562 – PCR de fragmento de 135 pb – primer β -actina. A seta vertical indica reação positiva da amostra 10,20,39,44 e controle positivo.

7.Discussão

As taxas de cura da tuberculose caíram de 73,5% em 2009 para 70,3% em 2010, estando abaixo dos 85% recomendados pela OMS (4).

O Brasil ocupa a 17ª posição na lista de 22 países de alta carga da doença, sendo que ela ainda é a 4ª causa de morte por doenças infecciosas no país. Rio e Manaus são as capitais com maior registro da doença. No mundo, a tuberculose é a 2ª causa de morte por doenças infecciosas, perdendo apenas para a AIDS e em 2010 apenas 65% dos casos de tuberculose foram detectados (4).

O número de doenças causadas por micobactérias do tipo não-tuberculosis têm crescido devido à epidemia de HIV e vários tratamentos imunossupressivos.

Até o momento, literatura descrevendo diagnósticos de TB através de ácidos nucleicos com os kits comerciais disponíveis é limitada, e a capacidade de diferenciar o complexo *M. tuberculosis* em nível de espécie também(39). Além disso, em laboratórios de Patologia as amostras utilizadas para estudo são fragmentos de tecidos (FFIP).

Isto se deve, na maioria dos casos, à falta de DNA viável para estudo deste tipo de amostra FFIP. A dificuldade de análise de DNA é decorrente do processo de parafinização e de preparação da amostra para amplificação, resulta frequentemente em DNA fragmentado de baixa qualidade para aplicações moleculares(34)(38)(6).

A natureza precisa das modificações químicas induzidas pelo processo de fixação é parcialmente compreendida. Sabe-se que a extensa rede de ligações covalentes proteína – proteína e proteína – ácido nucleico gerada pelo formol apresenta um desafio significativo para a recuperação do DNA para aplicações posteriores. Formol também induz a formação de pontes de metileno entre os grupos amino das bases purínicas e pirimidínicas assim como entre esses nucleotídeos e as histonas. Tais modificações podem bloquear o alongamento da polimerase ou produzir mutações *in vitro*(40)(17). Contudo, a fixação é conhecida por permitir a reversibilidade das modificações nos ácidos nucleicos e de alterações mais permanentes(7).

Em contraste com o formol, fixadores baseados em álcool, como o etanol e metanol, têm se mostrado muito eficientes como agentes de preservação. A questão é a inabilidade dessas formulações em preservar detalhes histológicos(40).

Para se obter tal DNA dessas amostras, purificação e várias etapas de preparação são necessárias. A sensibilidade do diagnóstico molecular é dependente da eficiência dos métodos de extração de DNA(6)(41), uma vez que a extração de ácidos nucleicos é um importante passo inicial, uma variedade de métodos tornou-se disponível para tal.

A PCR requer um eficiente procedimento de extração e purificação para o DNA, que é ainda mais complicado pela peculiaridade física do escarro e pela alta concentração de lipídios da parede celular de micobactérias. Assim, todas as técnicas disponíveis para extração de DNA das micobactérias necessitam de etapas de manipulação que resulta em perda de material(25).

As micobactérias possuem um revestimento que é resistente a procedimentos simples de rompimento e dificulta a liberação do ácido nucleico. Tal parede celular é uma estrutura complexa composta por moléculas lipofílicas e polissacarídeos que constituem uma barreira protetora forte. A presença desta parede celular, que é resistente a lise, prejudica os métodos convencionais de extração de DNA aplicados a outras bactérias(7)(41). O rompimento da parede celular pode ser alcançado por diversas maneiras: rompimento mecânico, lise enzimática, lise química ou por combinação de tais métodos(41).

A rápida identificação do microrganismo não somente diminui o tempo de exposição desnecessária ao antibiótico como também previne custos financeiros e emocionais, uma vez que o indivíduo permanece em isolamento por menos tempo. Além de que qualquer atraso para iniciar o tratamento pode causar sua falha ou desenvolvimento de resistência ao antibiótico(18)(12).

Todos os métodos possuem vantagens e limitações. Apesar dos avanços no diagnóstico molecular, a habilidade de diagnosticar rapidamente infecções por *M. tuberculosis* através de PCR ainda é inadequada por causa de possíveis falsos negativos e contaminações.

Neste trabalho foi possível detectar, em 34 das 35 amostras, DNA humano através da PCR do gene *β-actina humana* com a utilização do Kit de extração *QiagenQIAamp DNA Mini kit* que garante um rendimento adequado e DNA de qualidade. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Barcelos D, 2008, onde também foram obtidos resultados positivos das amostras de DNA FFIP.

O DNA da amostra que não sofreu amplificação poderia estar fragmentado, desse modo, a região a ser amplificada não foi reconhecida, nestes casos alguns fatores podem contribuir como tempo de ação do fixador, tempo de exposição do tecido ao ambiente. Outros trabalhos também mostram que algumas amostras FFIP são impróprias para utilização em Biologia Molecular(37).

A análise dos grupos formados neste estudo mostrou que o grupo NTP- Não Transplantado Positivo (coloração Ziehl Neelsen positiva e presença de granuloma epitelióide), em apenas 2 das 10 amostras incluídas, foi possível a detecção da presença de *M. tuberculosis* através da amplificação da Sequência de Inserção *IS6110*.

Apesar de se esperar que todas as amostras fossem positivas, este fato pode ser explicado pela diferença na quantidade de DNA humano e DNA do bacilo encontrado na amostra. Mesmo sendo utilizado aproximadamente 10ng/μl por reação, esta concentração é de DNA total, ou seja, humano e de bacilo, por isso poderia existir competição entre estes dois tipos de DNA, além do que, provavelmente a quantidade de DNA humano era muito maior. Além disso, talvez a presença de granuloma epitelióide com necrose caseosa pudesse ter agido de maneira a degradar o DNA das micobactérias presentes no tecido impedindo a sua amplificação.

As amostras deste grupo foram submetidas também a PCR para a Sequência de Inserção *IS1245* de *M. avium* e como esperado em paciente sem imunossupressão, nenhuma amostra foi positiva.

O grupo NTN (Não Transplantado Negativo), não apresentou amplificação positiva para nenhuma das sequências de inserção utilizadas e isto indica que os controles de qualidade para contaminação foram eficientes.

Em pacientes transplantados pode-se esperar contaminação por tuberculose ou outras micobacterioses pela incapacidade de defensiva que estes pacientes têm. No grupo TP (Transplantado Positivo), em apenas uma amostra foi possível detectar a Sequência de Inserção *IS6110* de *M. tuberculosis* e em outra amostra o DNA de *M. avium*, de novo a insuficiência de DNA viável de micobacterias ou a presença de outras que não as estudadas poderiam explicar este resultado.

No grupo TN (Transplantado Negativo para coloração Ziehl Neelsen), apenas uma das seis incluídas no estudo apresentaram positividade para a sequência *IS6110*, e em outra positividade para *IS1245* mostrando que apesar das dificuldades envolvidas com os processos de fixação e parafinização é possível a detecção de DNA de micobactérias em biópsias de material parafinado.

O único caso de biópsia de pele (caso 12) apresenta ZN fortemente positivo e PCR para *IS6110* e *IS1245* negativas. Provavelmente trata-se de *M. leprae*, uma vez que não é possível distinguir através de ZN, confirmando uma das hipóteses do exame anatomopatológico de Hanseníase.

Apesar das dificuldades encontradas em se trabalhar com biologia molecular neste tipo de amostra, alguns estudos comparam a PCR tradicional com a RT-PCR(33). Esta técnica é cara quando comparada com a PCR convencional, mais apresenta resultados consideráveis. O impedimento da utilização desta técnica em tempo real é o custo proibitivo, não do equipamento em si, mas dos reagentes e sondas utilizadas. Em um laboratório que possui baixo número de casos não seria viável financeiramente.

8. Conclusão

Os resultados concordantes de PCR para *IS6110* em amostras de pacientes não transplantados com Ziehl Neelsen negativo, confirmam a eficiência do exame por PCR convencional.

Apesar de fatores como fragmentação de DNA após fixação em formalina e inclusão em parafina, a detecção de DNA do gene *β -actina humana* demonstra a possibilidade de detectar os fragmentos da Sequência de Inserção *IS6110* de *M. tuberculosis* e de Sequência de Inserção *IS1245* de *M. avium* em pacientes transplantados renais.

9. Bibliografia

1. **Silva, Andréia Aparecida da.** Tese: *Estudo da Micobacteriose pulmonar em pacientes autopsiados com e sem AIDS. Avaliação histopatológica, imunohistoquímica e caracterização das espécies de micobactérias por PCR.* 2006.
2. **Laguna, J. G.; Carrasco, L.; Ramis, G.; Quereda, J. J.; Gómez, S.; Pallarés, F. J.** Use of real-time and classic polymerase chain reaction assays for the diagnosis of porcine tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2010, Vol. 22, pp. 123-127.
3. **Mijs W, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, van Soolingen.** Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2002, Vol. 52, 5, pp. 1505-18.
4. **WHO - World Health Organization.** Global Tuberculosis Control 2011. [Online] http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em Setembro de 2012
5. **Abdalla, C. M. Z.; Oliveira, Z. N. P.; Sotto, M. N.; Leite, K. R. M.; Canavez, F. C. C.; Carvalho, C. M.** Polymerase chain reaction compared to other laboratory findings and to clinical evaluation in the diagnosis of cutaneous tuberculosis and atypical mycobacteria skin infection. *International Journal of Dermatology.* 2009, Vol. 48, pp. 27-35.
6. **Johansen, I. S.; Thomsen, V. O.; Forsgren, A.; Hansen, B. F.; Lundgren, B.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Specimens with Necrotizing Granulomatous Inflammation by Strand Displacement Amplification. *Journal of Molecular Diagnostics.* Agosto de 2004, Vol. 6, 3.
7. **Azov, A. G., Koch, J. e Amilton-Dutoit, S. J.** Improved diagnosis of mycobacterial infections in formalin-fixed and paraffin-embedded sections with nested polymerase chain reaction. *APMIS.* 2005, Vol. 113, pp. 586-93.
8. **Steinau, M., Patel, S. S. e Unger, E. R.** Efficient DNA Extraction for HPV Genotyping in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics.* Julho de 2011, Vol. 13, 4.
9. **Varela, Drauzio.** Drauzio varela. [Online] <http://drauziovarela.com.br/doencas-e-sintomas/tuberculose-2/>. Acesso em Setembro de 2012.

10. *Tuberculose em doentes transplantados renais*. **Lopes, J. A.; Guerra, J.; Santana, A.; Neves, F. C.; Mil-Homens, C.; Prata, M. M.** 3, 2005, *Revista Portuguesa de Nefrologia*, Vol. 19, pp. 163-168.
11. **Currie, A. C., Knight, S. R. e Morris, P. J.** Tuberculosis in Renal Transplant Recipients: The Evidence for Prophylaxis. *Transplantation Journal*. Outubro de 2010, Vol. 90, 7.
12. **Mishra, P. K.; Gorantla, V. R.; Bhargava, A.; Varshney, S.; Vashistha, P.; Maudar, K. K.** Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and biopsies of gastrointestinal specimens using real-time polymerase chain reaction system. *Turkish Journal of Gastroenterology*. Julho de 2010, Vol. 21, 2, pp. 129-134.
13. **Beqaj, S. H.; Flesher, R.; Walker, G. R.; Smith, S. A.** Use of the real-time PCR assay in conjunction with MagNA Pure for the detection of mycobacterial DNA from fixed specimens. *Diagnostic Molecular Pathology*. Setembro de 2007, Vol. 16, 3, pp. 169-173.
14. **Barcelos, D., Franco, M. F. e Leão, S. C.** Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Dezembro de 2008, Vol. 50, 6, pp. 321-326.
15. **Mahaisavariya, P.; Chaiprasert, A.; Manonukul, J.; Khemngern, S.; Tingtoy, N.** Detection and Identification of *Mycobacterium* Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) from Paraffin-Embedded Tissue Compare to AFB Staining in Pathological Sections. *Journal of Medical Association of Thailand*. 2005, Vol. 88, 1, pp. 1008-1013.
16. **Negi, S. S.; Singh, U.; Gupta, S.; Khare, S.; Rai, A.; Lal, S.** Characterization of RPO B gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis. *Indian Journal of Medical Microbiology*. Outubro de 2009, Vol. 27, 3, pp. 226-230.
17. **Obieta, M. P. P.; Ang, C. F.; Obieta, M. Y. P.; Monje, V. D.; Montoya, J. C.** Evaluation of a PCR Amplification Method for Detection of Mycobacterial DNA in Formalin-Fixed Paraffin Embedded Skin Tissues. *Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. Junho de 2008, Vol. 37, 1, pp. 33-37.
18. **Richardson, E. T., Samson, D. e Banaei, N.** Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous *Mycobacteria* by Multiplex, Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. Maio de 2009, Vol. 47, 5, pp. 1497-1502.
19. **Lim, S. Y.; Kim, B.-J.; Lee, M.-K.; Kim, K.** Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of *Mycobacterium*

species. *Journal compilation - The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*. Setembro de 2007, Vol. 46, pp. 101-106.

20. **Pinsky, B. A. e Banaei, N.** Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Members to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology*. Maio de 2008, Vol. 46, 7, pp. 2241-2246.

21. **Dymova, M. A.; Liashenko, O. O; Poteiko, P. I.; Krutko, V. S.; Khrapov, E. A.; Filipenko, M. L.** Genetic variation of Mycobacterium tuberculosis circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine. *BMC Infectious Diseases*. 2011, Vol. 77, 11.

22. **Nopvichai, C.; Sanpavat, A.; Sawatdee, R.; Assanasen, T.; Wacharapluesadee, S.; Thorner, P. S.; Shuangshoti, S.** PCR detection of Mycobacterium tuberculosis in necrotising non-granulomatous lymphadenitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue: a study in Thai patients. *Journal of Clinical Pathology*. Abril de 2009, Vol. 62, pp. 812-815.

23. **Baba, K.; Pathak, S.; Sviland, L.; Langeland, N.; Hoosen, A. A.; Asjo, B.; Dyrhol-Riise, A. M.; Mustafa, T.** Real-time quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded pleural tissue in patients from a high HIV endemic area. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2008, Vol. 17, pp. 112-117.

24. **Park, D. Y.; Kim, J. Y.; Choi, K. U.; Lee, J. S.; Chang Hun Lee, C.H.; Sol, M. Y.; Suh, K. S.** Comparison of Polymerase Chain Reaction With Histopathologic Features for Diagnosis of Tuberculosis in Formalin-Fixed,Paraffin-Embedded Histologic. *Archives of Phatology & Laboratory medicine*. Março de 2003, Vol. 127, pp. 326-330.

25. **Broccolo, F.; Scarpellini, P.; Locatelli, G.; Zingale, A.; Brambilla, A. M.; Cichero, P.; Sechi, L. A.; Lazzarin, A.; Paolo Lusso, P.; Malnati, M. S.** Rapid Diagnosis of Mycobacterial Infections and Quantitation of Mycobacterium tuberculosis Load by Two Real-Time Calibrated PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*. Outubro de 2003, Vol. 41, 10, pp. 4565-4572.

26. **Savelkoul, P. H.; Catsburg, A.; Mulder, S.; Oostendorp, L.; Schirm, J.; Wilke, H.; van der Zanden, A. G.; Noordhoek, G. T.** Detection of Mycobacterium tuberculosis complex with Real Time PCR:comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. *Journal of Microbiological Methods*. Janeiro de 2006, Vol. 66, pp. 177-180.

27. **Guerrero, C.; Bernasconi, C.; Burki, D.; Bodmer, T.; Telenti, A.** A Novel Insertion Element from Mycobacterium avium, IS1245, Is a Specific Target for. *Journal of Clinical Microbiology*. Fevereiro de 1995, Vol. 33, 2, pp. 304-307.

28. **Keller, A.P.; Beggs, M.L.; Amthor, B.; Burns, F.** Evidence of the Presence of IS1245 and IS1311 or Closely Related Insertion Elements in

Nontuberculous Mycobacteria outside of the Mycobacterium avium Complex. *Journal Of Clinical Microbiology*. Maio de 2002, Vol. 40, 5, pp. 1869-1872.

29. **O'Mahony, J.; Hill, C.** Rapid Real-Time PCR Assay for Detection and Quantitation of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis DNA in Artificially Contaminated Milk. *Applied And Environmental Microbiology*. Agosto de 2004, Vol. 70, 8, pp. 4561-4568.

30. **Shin, S.J.; Lee, B.S.; Koh, W.J.; Manning, E. J. B.; Anklam, K.; Sreevatsan, S.; Lambrecht, R.S.; Collins, M. T.** Efficient Differentiation of Mycobacterium avium Complex Species and Subspecies by Use of Five-Target Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. Novembro de 2010, Vol. 48, 11, pp. 4057-4062.

31. **Svastova, P., Pavlik, I. e Bartos, M.** Rapid differentiation of Mycobacterium avium subsp.avium and Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis by amplification of insertion element IS901. *Veterinary Medicine – Czech*,. 2002, Vol. 47, 5, pp. 117-121.

32. **Marchetti, G.; Gori, A.; Catozzi, L.; Vago, L.; Nebuloni, M.; Rossi, M. C.; Esposti, A. D.; Bandera, A.; Franzetti, F.** Evaluation os PCR in detection of Mycobacterium tuberculosis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assays. *Journal os Clinical Microbiology*. junho de 1998, Vol. 36, 6, pp. 1512-1517.

33. **Lee, H. S.; Park, K. U.; Park, J. O.; Chang, H. E.; Song, J.; Choe, G.** Rapid, Sensitive, and Specific Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex by Real-TimePCR on Paraffin-Embedded Human Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics*. Julho de 2011, Vol. 13, 4.

34. **Hewitt, S. M.; Lewis, F. A.; Cao, Y.; Conrad, R. C.; Cronin, M.; Danenberg, K. D.; Goralski, T. J.; Langmore, J. P.; Raja, R. G.; Williams, P. M.; Palma, J. F.; Warrington, J. A.** Tissue Handling and Specimen Preparation in Surgical Pathology Issues Concerning the Recovery of Nucleic Acids From. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. Dezembro de 2008, Vol. 132, pp. 1929-1935.

35. **Takano, E. A.; Mikeska, T.; Dobrovic, A.; Byrne, D. J.; Fox, S. B.** A multiplex endpoint RT-PCR assay for quality assessment of RNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Biotechnology*. 2010.

36. **Chung, J. Y.; Braunschweig, T.; Williams, R.; Guerrero, N.; Hoffmann, K. M.; Kwon, M.; Song, Y. K.; Libutti, S. K.; Hewitt, S. M.** Factors in Tissue Handling and Processing That Impact RNA Obtained From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *Journal of Histochemistry&Cytochemistry*. Agosto de 2008, Vol. 56, 11, pp. 1033-1042.

37. **Funabashi, K. S.; Barcelos, D.; Visoná, I.; Silva, M. S.; Sousa, M. L. A. P. O.; Franco, M. F.; Iwamura, E. S. M.** DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen and brain from autopsy samples: The effect of formalin fixation and paraffin embedding. *Research and Practice*. 2012, Vol. 208, 1.
38. **Dietrich, D.; Lesche, R.; Tetzner, R.; Krispin, M.; Dietrich, J.; Haedicke, W.; Schuster, M.; Kristiansen, G.** Analysis of DNA Methylation of Multiple Genes in Microdissected Cells From Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissues. *Journal of Histochemistry&Cytochemistry*. Janeiro de 2009, Vol. 57, 5, pp. 477-489.
39. **Reddington, K.; O'Grady, J.; Dorai-Raj, S.; Maher, M.; Van Soolingen, D.; Barry, T.** Novel Multiplex Real-Time PCR Diagnostic Assay for Identification and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canetti*, and *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *Journal Of Clinical Microbiology*. Fevereiro de 2011, Vol. 49, 2, pp. 651-657.
40. **Duval, K.; Aubin, R. A.; Elliott, J.; Gorn-Hondermann, I.; Birnboim, H. C.; Jonker, D.; Fourny, R. M.; Frégeau, C. J.** Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcohol-based fixative. *Forensic Science International: Genetics*. Junho de 2010, Vol. 4, pp. 80-88.
41. **Amaro, A.; Duarte, E.; Amado, A.; Ferronha, H.; Botelho, A.** Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *Avium*. *Journal compilation – The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*. Março de 2008, Vol. 47, pp. 8-11.
42. **Nimri, L., Samara, H. e Batchoun, R.** Detection of mutations associated with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Junho de 2011, Vol. 62, pp. 321-327.
43. **Helb, D.; Jones, M.; Story, E.; Boehme, C; Wallace, E.; Ho, K.; Kop, J.; Owens, M. R.; Rodgers, R.; Banada, P.; Safi, H.; Blakemore, R.; Lan, N. T.; Jones-Lopez, E. C.; Levi, M.; Burday, M.; Ayakaka, I.; Mugerwa, R. D.; McMillan, B.; Winn-Deen, E.; Christel, L.; Dailey, P.; Perkins, M. D.; Persing, D. H.; Alland, D.** Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance using on-demand, near-patient technology. *Journal of Clinical Microbiology*. Outubro de 2009, Vol. 48, 1, pp. 229-237.
44. **Lee, J. H.; Park, Y.; Choi, J. R.; Lee, E. K.; Kim, H.S.** Comparisons of Three Automated Systems for Genomic DNA Extraction in a Clinical Diagnostic Laboratory. *Yonsei Medical Journal*. Janeiro de 2010, Vol. 51, 1, pp. 104-110.
45. **Drews, S. J.; Eshaghi, A.; Pyskir, D.; Chedore, P.; Lombos, E.; Broukhanski, G.; Higgins, R.; Fisman, D. N.; Blair, J.; Jamieson, F.** The

relative test performance characteristics of two commercial assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-fixed human biopsy specimens. *Diagnostic Pathology*. Setembro de 2008, Vol. 37, 3.

46. **WHO - World Health Organization**. Library Cataloguing-in-Publication Data. [Online] Dezembro de 2008. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em Dezembro de 2011.

47. **Williams, J.E., Pinedo, P.J. e Monif, G.R.G.** Comparative IS900 and IS1311 Direct Fecal *Mycobacterium Avium* Subspecies Paratuberculosis Nested PCR Tests: Significance of Disparities. *Proceedings of 10ICP*. 2009.