

Isabela Neves de Almeida

**AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE INSERÇÃO IS6110 DIRETAMENTE  
DO ESFREGAÇO DAS LÂMINAS CORADAS PARA BACILO ALCOOL-  
ÁCIDO RESISTENTE**

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Infectologia

Belo Horizonte – MG

2013

Isabela Neves de Almeida

AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE INSERÇÃO IS6110 DIRETAMENTE DO  
ESFREGAÇO DAS LÂMINAS CORADAS PARA BACILO ÁLCOOL-ÁCIDO  
RESISTENTE (BAAR)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical de Infectologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical e Infectologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Silvana Spíndola de Miranda

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Wânia da Silva Carvalho

Belo Horizonte  
2013

- A447a Almeida, Isabela Neves de.  
Amplificação da seqüência de inserção IS6110 diretamente do esfregaço das lamina coradas para bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) [manuscrito]. / Isabela Neves de Almeida. - - Belo Horizonte: 2013. 59f.: il.
- Orientadora: Silvana Spíndola de Miranda.  
Co-Orientadora: Wânia da Silva Carvalho.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Tuberculose/diagnóstico. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda, Silvana Spíndola de. II. Carvalho, Wânia da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
- NLM: WF 220

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****Reitor**

Clélio Campolina Diniz

**Vice-Reitora**

Rocksane de Carvalho Norton

**Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Ricardo Santiago Gomez

**Pró-Reitor de Pesquisa**

Renato de Lima Santos

**FACULDADE DE MEDICINA****Diretor**

Francisco José Penna

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E  
INFECTOLOGIA****Coordenador**

Vandack Alencar Nobre Jr

**Sub-Coordenador**

Manoel Otávio da Costa Rocha

**Colegiado**

Manoel Otávio da Costa Rocha

Vandack Alencar Nobre Jr

Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Denise Utsch Gonçalves

Mariângela Carneiro

Paula Souza Lage Carvalho



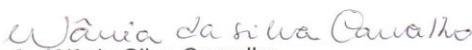
FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



### DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores Silvana Spindola de Miranda, Wânia Silva Carvalho, Agdemir Waléria Aleixo e Luciene Cardoso Scherer, aprovou a defesa de dissertação intitulada: "**Amplificação da sequência de inserção IS6110 diretamente do esfregaço das lâminas coradas para Bacilo Álcool Ácido Resistente**" apresentada pela mestrand **Isabela Neves de Almeida** para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 22 de fevereiro de 2013.

  
Profa. Silvana Spindola de Miranda  
Orientadora

  
Profa. Wânia Silva Carvalho  
Coorientadora

  
Dra. Agdemir Waléria Aleixo

  
Profa. Luciene Cardoso Scherer

A Deus por me guiar e iluminar sempre em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos e amados pais, por terem feito da minha formação a prioridade da família e contribuído imensamente para que eu tivesse condições de realizar este trabalho.

A minha madrinha Consuelo e ao meu Padrinho José Augusto pelos exemplos de determinação e pela amizade.

A todos os meus amigos e familiares pela força e companheirismo em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Silvana Spindola de Miranda, pela confiança, e pelas inúmeras oportunidades de aprendizado que me proporcionou, desde a graduação até a conclusão do mestrado. Pelo carinho, força e amizade.

A professora Wânia Silva Carvalho, pelo imenso auxílio e colaboração na função de co-orientadora. Pelo carinho, força e companheirismo.

Aos profissionais do Laboratório de Micobactérias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais: Roberto Silva, Vera Lúcia e Júlio César, pelo apoio, auxílio e ensinamentos adquiridos durante o período de trabalho ali desenvolvido.

A Ana Letícia Figueiredo, Lúcia Tavares Paradizzi e Lida Jouca, pelo excelente trabalho desenvolvido durante a etapa de extrações, e pela amizade.

A Agdemir Aleixo e toda equipe do laboratório de HIV, por todo apoio, pelos conhecimentos técnicos ali adquiridos, e pelo auxílio fundamental da etapa de padronização.

A Dora Méndez Del Castillo, Coordenadora do Laboratório de Genética, do Núcleo de Pesquisa em apoio diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG – NUPAD.

A Lucia Rosseti e Elis Regina Dallas da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde de Porto Alegre (FEPPS), pela colaboração nos trabalhos desenvolvidos.

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Micobactérias, pela força, e pela ajuda no aprimoramento do trabalho.

A coordenação e aos professores do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina/UFMG pelo apoio na realização deste projeto.

A FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio financeiro a este projeto.

Aos meus tios Reinaldo, Antonio Clareth, e a minha Tia Araci pela acolhida carinhosa durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

“Sonha e serás livre de espírito... luta e serás  
livre na vida..... Lutam melhor os que têm belos  
sonhos....”

Ernesto Che Guevara



## RESUMO

A obtenção de DNA a partir de lâminas é uma alternativa valiosa para resolver o problema do transporte do espécime, principalmente em locais onde a própria geografia é um empecilho para o acesso às amostras, e a reação de PCR tem se destacado como uma promissora técnica molecular para o diagnóstico rápido da tuberculose. Foram selecionadas duzentos e oitenta e sete amostras de conveniência, provenientes do Laboratório da Faculdade de Medicina/Laboratório de Micobactérias/Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O DNA foi extraído pelo método de *Chelex +NP40*, e amplificado pela PCR IS6110 nas seguintes condições: 7,0µL de Buffer (10x), 3,0 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,2 µL dNTP (25mM), 25 pmol de cada oligonucleotídeo (IS1- 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3' e IS2- 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') e 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (500U) Invitrogen®, em um volume final de 50 µL. A desnaturação inicial do DNA, foi a 94°C por 2min, e um total de 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 68°C por 2 min, 71°C por 1min, e uma extensão final de 72°C por 10min. Os amplicons foram revelados em gel de agarose á 2% corados por brometo de etídio. A sensibilidade e especificidade comparada com a cultura positiva para *M. tuberculosis* em meio de Lowestein Jensen foram de 37,5 e 100%, respectivamente. O valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 80,8 % e uma acurácia de 82,8%. A alta especificidade da amplificação do DNA *in house*, torna este método um procedimento rápido, simples e eficaz para o diagnóstico da tuberculose, podendo ser utilizado em casos de baciloscopias positivas em locais com alta prevalência da Micobactérias Não tuberculosas. Além da biossegurança no transporte, a PCR em lâminas também pode ser aplicada em situações onde a quantidade de células bacterianas é insuficiente para o diagnóstico. Portanto esse método é uma importante ferramenta quando associado a outros critérios diagnósticos, otimizando o tratamento e contribuindo para interrupção da cadeia de transmissão.

**PALAVRAS CHAVE:** Tuberculose, *M. tuberculosis*, PCR IS6110, Esfregaço em lâminas, BAAR.

## ABSTRACT

The obtainment of DNA directly from smear slides is a valuable option to resolve the problem of specimen transportation, as it avoids the risk of bacilli transmission; besides, this characteristic is particularly opportune in places where the geography itself hampers the access to samples and the PCR has emerged as a promising molecular technique for rapid diagnosis of tuberculosis. Two hundred eighty seven convenient samples from the laboratory of the Faculty of Medicine/Laboratory of Mycobacteria/Hospital of Clinics of University Federal of Minas Gerais were selected. The DNA was extracted by the *Chelex*<sup>®</sup> + *NP40* method and amplified by IS6110-PCR under the following conditions: 7.0  $\mu$ L of Buffer (10x), 3.0  $\mu$ L  $MgCl_2$  (50 mM), 0.2  $\mu$ L dNTP (25 mM), 25pmol of each oligonucleotide (IS1- 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3' and IS2- 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') and 0.5  $\mu$ L (500 U) of Taq DNA Polymerase Invitrogen<sup>®</sup>, in a final volume of 50  $\mu$ L. The initial DNA denaturation was at 94°C for 2 min, following a total of 40 cycles of 94°C for 30 sec, with every annealing temperature for 2 min, 71°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 10 min. The amplicons were revealed in 2% agarose gel stained by ethidium bromide. The PCR result was then compared with in Lowenstein-Jensen medium. The sensitivity and specificity as compared with those of culture were 37.5 e 100%, respectively. The positive predictive value was of 100%, the negative predictive value was of 80.8%, and the accuracy was of 82.8%. The high specificity of *in house* DNA amplification becomes this method, a quick and simple procedure for tuberculosis diagnosis; it could also assure the utilization of this method in places in which the bacilloscopy is positive, with a higher prevalence of Nontuberculous Mycobacteria. Besides to offer biosafety in the transportation, the *in house* DNA amplification could also be utilized in situations where the amount of bacterial cells is insufficient. Therefore, this method is an important tool when associated to clinical criteria, speeds up the treatment and contributes to interrupt the disease transmission chain.

**KEY WORDS:** Tuberculosis, *M. tuberculosis*, PCR IS6110, Smear, Slides, BAAR.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FM	Faculdade de Medicina
HC	Hospital das Clínicas
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LCR	Reação em Cadeia da Ligase
LM	Laboratório de Micobactérias
MNT	Micobactéria Não Tuberculosa
MSP	<i>Mycobacterium sp</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NP40	Nonidet 40
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
TB	Tuberculose
TMA	Amplificação Medida por Transcrição
TB Control	Programa de Controle da Tuberculose
TB MDR	Tuberculose multidroga resistente
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

**LISTA DE TABELAS**

## ARTIGO I

Table 1 - Amplification after extraction of ten <i>M. tuberculosis</i> cultures .....	36
Table 2 - Results of amplifications after extraction of DNA from five smears in sputum slides .....	37

**LISTA DE FIGURAS****ARTIGO I**

Figure 1 - Agarose gel electrophoresis of amplifications performed with protocol 3.....38

Figure 2 - Electrophoresis of amplifications of smear slides.....39

**ARTIGO II**

Figura 1 - Eletroforese das amplificações pela PCR IS6110.....43

## SUMÁRIO

<b>1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.0 OBJETIVO .....</b>	<b>22</b>
2.1 Objetivo Geral .....	22
2.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>3.0 ARTIGO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 ARTIGO I .....</b>	<b>24</b>
Abstract .....	24
Background.....	25
Methods .....	25
Results .....	29
Conclusions .....	30
References .....	33
<b>3.2 ARTIGO II .....</b>	<b>40</b>
Resumo .....	40
Introdução .....	40
Materias e Métodos .....	41
Resultados .....	42
Discussão .....	43
Conclusão .....	44
Referências .....	45
<b>4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>48</b>
<b>5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>
<b>6.0 ANEXO.....</b>	<b>55</b>
6.1 Anexo A - Resumo aprovado no Internacional Conference of American Thoracic Society 2013.....	55
6.2 Anexo B - Folha de Aprovação no Comitê de Ética .....	56
6.3 Anexo C - Normas de Publicação da Revista Brazilian Journal of Mycobiology ..	57
6.4 Anexo D - Normas de Publicação da Revista BMC Research Notes .....	58
6.5 Anexo E – Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado .....	59

## 1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Frequentemente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas pode afetar outros órgãos (TB extrapulmonar)<sup>1</sup>.

Houve uma estimativa de 9,0 milhões de casos incidentes de TB em todo mundo em 2011, sendo 990.000 mortes entre casos de TB em pacientes *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) negativos e 430.000 mortes em pacientes HIV positivos.<sup>2</sup>

Entre os 22 países com os maiores índices de TB, as maiores taxas de detecção de novos casos em 2011 foram no Brasil, China, Kenya, Rússia e República Unida da Tanzânia, e as menores foram em Moçambique, Nigéria, Afeganistão e Bangladesh. Em 2011 o Brasil apresentou 84.137 casos notificados de TB, sendo 40.289 casos novos com baciloscopia positiva, o que representa 66% dos casos novos de TB pulmonar, 12.683 casos novos com baciloscopia negativa e 10.067 casos extra pulmonares<sup>2</sup>.

No estado de Minas Gerais foram notificados 4.200 casos novos em 2011, sendo 2.195 com baciloscopia positiva, 944 baciloscopia negativa e 881 casos em que a baciloscopia não foi realizada. Destes casos 3.208 foram casos de TB pulmonar, 657 casos de TB extra pulmonar e 155 casos onde a TB pulmonar e extrapulmonar estavam associadas<sup>3</sup>.

No município de Belo Horizonte foram notificados 918 casos novos, onde 469 casos novos com baciloscopia positiva, 222 baciloscopia negativa e 227 casos em que a baciloscopia não foi realizada. Destes casos 661 foram casos de TB pulmonar, 187 casos de TB extra pulmonar e 70 casos de associação entre a TB pulmonar e extra

- 
1. SURESH, N.; ARORA, J.; PANT, H.; RANA, T.; SINGH, U. B. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Archival Ziehl–Neelsen-stained sputum smears. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, p. 291–295, 2006.
  2. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control 2012**. Genebra, 2012.
  3. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SINAN WEB: Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em março de 2013.

pulmonar. Frente a estes dados o Brasil hoje ocupa o 15º lugar dentre os 22 países que apresentam os maiores índices de TB no mundo.<sup>2,3</sup>

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) é composto por 4 espécies principais: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e o *M. microtii* que é raramente isolado. Após estudos taxonômicos baseados em características fenotípicas, relatos de antígenos solúveis no citoplasma, e na homologia do DNA, e as semelhanças encontradas foram claramente indicados que são quatro espécies diferentes, mas que formam um único complexo.<sup>4</sup>

O *M. tuberculosis* é o agente mais frequentemente isolado em doenças causadas por micobactérias em todo mundo, e também o agente patológico da TB.<sup>4</sup>

O *M. tuberculosis* é resistente à descoloração por ácidos minerais e pelo álcool, característica que confere a esse organismo o termo bacilo ácido-álcool resistente (BAAR). Este é protegido da ação de agentes químicos, embora seja facilmente destruído por agentes físicos (calor e ultravioleta). O cultivo das micobactérias requer o emprego de meios seletivos, ricos em albumina. O *M. tuberculosis* possui longo período de multiplicação (16 a 20 h). Em média, as colônias tornam-se visíveis entre 2 a 4 semanas de cultivo<sup>2,5,6</sup>.

- 
4. LEO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA, G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Belgium, 2004. 37-44 p.
  5. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in adults and children. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p. 1376-1395, 2000.
  6. BARON, E.J.; PETERSON L.R.; FINEGOLD, S.M. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9.ed. Missouri: Mosby, 1994. 958 p. (Mycobacteria, 42).
  7. THIERRY, D.; BRISSON-NOËL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J.L.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **J Clin Microbiol**, v. 28(12), p. 2668-73, 1990.
  8. TORREA, G.; LEEVEE, G.; GRIMONT, P.; MARTIN, C.; CHANTEAU, S.; GICQUEL, B. Chromosomal DNA Fingerprint Analysis Using the Insertion Sequence IS6110 and the Repetitive Element DR as Strain-Specific Markers for Epidemiological Study of Tuberculosis in French Polynesia. **J Clin. Microbiol**, v. 33(7), p. 1899-1904, 1995.
  9. GOPINATHAN, A.K.; SRIDHARAN, G.; APPU, K.C.; LINGESAN, K.; SANKAR, S.; NANDAGOPAL, B. Evaluation of a nested PCR targeting IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of the organism in the leukocyte fraction of blood samples. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 28(3), p. 227-232, 2010.



O genoma completo do *M. tuberculosis* apresenta em torno de 4,5 milhões de pares de base, contendo cerca de 4000 genes, e tem alto conteúdo aproximadamente 65,6% de guanina (G) + citosina (C). O genoma é rico em DNA repetitivo, particularmente a sequência de inserção IS6110, que é a seqüência de inserção mais bem caracterizada e a mais empregada para fins diagnósticos <sup>6</sup>. O IS6110 é um elemento genético de 1.355 pares de base que está exclusivamente presente nas espécies do CMTB, devido a esta característica é considerado um marcador molecular eficiente apresentando maior acurácia diagnóstica quando comparado a outros marcadores e é uma importante ferramenta para diferenciar das micobactérias não tuberculosas (MNT) <sup>8, 9, 10</sup>.

A diferenciação do CMTB das MNT é muito importante para o desempenho dos resultados das culturas laboratoriais. A primeira etapa deve ser a observação microscópica das colônias para confirmação da presença de micobactéria bem como para avaliar a pureza das colônias e a formação do fator corda. Seguido da observação do aspecto das colônias, do tempo de crescimento e da pigmentação. Esta diferenciação pode ser confirmada por métodos de triagem como a inoculação em meios contendo drogas que inibem o crescimento das micobactérias do CMTB e das MNT e a realização de testes bioquímicos como o teste da produção de niacina e da redução do nitrato <sup>4</sup>.

Outra importante ferramenta são os testes moleculares. Além dos testes clássicos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), outros métodos como a Reação em Cadeia da Ligase (LCR), Amplificação Medida por Transcrição (TMA) entre outros, são utilizados na detecção das micobactérias do CMTB. Marcadores moleculares tanto para DNA quanto para RNA tem sido desenvolvido e alguns já apresentam aplicabilidade em kits diagnósticos comerciais <sup>4</sup>. A detecção precoce e eficiente dos casos de TB e a expansão da capacidade de diagnóstico também dos casos TB multidroga resistente (MDR), são prioridades globais do Programa de Controle da Tuberculose (*TB Control*) da OMS. Este programa avalia novos testes diagnósticos e tem políticas claras para que se estabeleça quais os testes estão aptos a serem implantados em laboratórios, baseando na capacidade desses testes serem executados de maneira segura e efetiva <sup>11</sup>.

---

10. POROCA, D.R.; LIMA, A.S.; LIMA, J.F.A.; CRUZ, H.L.A.; MONTENEGRO, R.A.; MELO, F.L.; SCHINDLER, H.C.; MONTENEGRO, L.M.L. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24(6), p. 716-722, 2009.

Devido às limitações apresentadas pelos métodos de diagnósticos convencionais para TB, os testes de amplificação de ácidos nucleicos emergiram como uma alternativa promissora. Dentre os métodos de amplificação de ácidos nucleicos, a (PCR) é o mais conhecido e utilizado <sup>3</sup>, por ser uma técnica capaz de detectar até uma cópia de DNA de qualquer célula ou tecido e vem sendo introduzida recentemente na busca de um diagnóstico rápido e sensível do *M. tuberculosis* em amostras clínicas <sup>4,12</sup>.

A sensibilidade da técnica de PCR está relacionada, principalmente ao número de cópias da sequência alvo presente no genoma do patógeno, o tipo de iniciadores, bem como inibidores da reação presentes na amostra clínica <sup>10</sup>. A garantia da sensibilidade da reação é estabelecida pela padronização de protocolos elaborados com objetivo de alcançar o melhor desempenho possível. Produtos inespecíficos, ausência de bandas, contaminações DNA/RNA, impureza das amostras, são situações que podem ser controladas com simples procedimentos tais como: estabelecimento de fluxo no laboratório, separação dos materiais utilizados nas áreas de PCR e eletroforese, uso de luvas sem talco entre outros; conhecimento dos reagentes e equipamentos utilizados <sup>4,5</sup>.

- 
11. RILEY, L. W.; COLFORD J. M.; PAI, M.; FLORES, L. L.; In-House nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. USA. **BMC Microbiology**. v. 5(55), p. 11-9. 2005.
  12. VAN DER ZANDEN, A.G.M.; HOEILMANN F.G.C.; WELTEVRED E.F.; SCHOOLS L.M.; VAN EMBDEN J.D.A. Simultaneous detection and strains differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and stained microscopic preparation. **J Clin Pathol**, v. 51, p. 209-214, 1998.
  13. VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. 2012. <http://www.etall.hpg.com.br>.
  14. BARANI, R.; SARANGAN, G.; ANTONY, T.; PERIYASAMY, S.; KINDO, A.J.; SRIKANTH, P. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* using two independent PCR targets in a tertiary care centre in South India. **J Infect Dev Ctries**. v. 6(1), p. 46-52, 2012.
  15. MESQUITA, R.A.; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odonto Bras**. v. 15(4), p. 314-319, 2001.
  16. NAGDEV, K.J.; KASHYAP, R.S.; DESHPANDE, P.S.; PUROHIT, H.J.; TAORI, G.M.; DAGINAWALA, H.F. Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100® extracted DNA samples. **Int J Tuberc Lung Dis**. v. 14(8), p. 1032-1038, 2010.
  17. ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**. v. 145(6), p. 1301-1308, 1994.

Alguns trabalhos relatam diferentes resultados de sensibilidade e especificidade utilizando técnicas de PCR como ferramenta de investigação diagnóstica, podendo variar de 11 a 81% <sup>14</sup>. Estas variações se devem ao fato de alguns protocolos não eliminarem a presença de inibidores durante a extração <sup>13</sup>.

A técnica de isolar ácidos nucleicos em quantidade, pureza e integridade suficientes é uma fase essencial na prática da biologia molecular, sendo, portanto a extração do DNA a etapa inicial para a detecção de ácidos nucleicos por meio da técnica de PCR e a etapa primordial para garantir a efetividade desta técnica <sup>15</sup>. Além do que, o método de extração de DNA deve ter menos custo, ser simples e rápido <sup>16</sup>. Além das diferentes substâncias, o tempo no qual as células ficam em contato e as concentrações das substâncias influenciam na qualidade e na quantidade final de DNA extraído. Protocolos de extração com apenas uma etapa, como o que utiliza a suspensão de Chelex®, tem sido empregados por diversos autores <sup>17</sup>.

O fato de não se utilizar nenhum solvente orgânico, eliminar múltiplas etapas de purificação e utilizar apenas dois tubos de eppendorf por amostras, reduz os custos e o tempo de execução da técnica <sup>17</sup>. A reação de PCR tem se destacado como uma das mais promissoras técnicas moleculares para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas, principalmente em TB. Ao longo do tempo, a reação de PCR sofreu algumas modificações que expandiram o uso deste teste e ampliaram o espectro de microrganismos que podem ser detectados <sup>5,6</sup>. A Nested-PCR é um exemplo de modificação da PCR. Esta técnica visa aumentar a sensibilidade da reação da análise; utilizando dois conjuntos de iniciadores dirigidos ao mesmo alvo. O primeiro conjunto

- 
18. WINN, W.J.; ALLEN, S; JANDA, W; KONEMAN, E; PROCOP, G; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Diagnóstico Microbiológico. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760 p. (Microbiologia Molecular, 4).
  19. HEYM, B.; HONORÉ, N.; TRUFFOT-PERNOT, C.; BANERJEE, A.; SCHURRA, C.; JACOBS Jr, W.R.; VAN EMBDEN, J. D. A.; GROSSET, J. H.; COLE, S.T. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. **Lancet**. v. 344, p. 293-298, 1994.
  20. BOLLELA, V.R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública**. v. 33(3), p. 281-286, 1999.
  21. MIRANDA, S.S.; KRITSKI, A.L.; FILLIOL, I.; MABILAT, C.; PANTEIX, G.; DROUET, E. Mutations in the rpoB Gene of Rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Brazil and France. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96(2), p. 247-250, 2001.

de iniciadores é desenvolvido da maneira habitual, enquanto o segundo conjunto consiste em iniciadores que estão situados internamente ou aninhados em relação ao primeiro conjunto de iniciadores. A Nested-PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo ferramenta válida para o diagnóstico da TB, principalmente no grupo de pacientes com suspeita da doença que não são diagnosticados ou iniciam tratamento sem confirmação da doença. A principal limitação desta técnica é a contaminação do amplicon no laboratório e uma conseqüente perda de especificidade da análise como teste clínico<sup>18, 9</sup>. O custo da PCR na rotina é factível, considerando que o diagnóstico rápido em pacientes paucibacilares (baciloscopias negativas e culturas positivas) e pode permitir a instituição do tratamento específico o mais precocemente possível (diminuindo assim as fontes bacilíferas e com elas a infecção pelo *M. tuberculosis*, portanto diminuindo a cadeia de transmissão). O desenvolvimento e padronização, próprios para o teste, tornam seu custo mais acessível, porém esta tecnologia deve ser reservada para centros de referência e hospitais de alta complexidade na investigação de casos que demandem diagnósticos rápidos<sup>19,20,21</sup>.

Resultados de baciloscopia positiva aumentam a acurácia diagnóstica de PCR positivas em casos da ausência da cultura<sup>21,6</sup>. A baciloscopia é um exame simples, rápido, econômico e é a mais difundida técnica para o diagnóstico da TB<sup>11</sup>, portanto a possibilidade de se obter DNA a partir de lâminas é uma alternativa valiosa para suprir a falta de amostras, quando essas são totalmente utilizadas para a baciloscopias e também para resolver o problema do transporte dos espécimes (longas distâncias transportando potes de amostras) e principalmente devido as necessidades de biossegurança<sup>7,22, 23</sup>.

- 
22. HALDAR, S.; CHAKRAVORTY, S.; BHALLA, M.; MAJUMDAR, D.S.; TYAGI, S.J. Simplified detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 1356-1362, 2007.
  23. FURLANETO, I.P.; SOUSA, E.B.; BRITO, M.L.; LIMA, G.L.F.L.; LOPES, M.L.; SILVA, S.H.M.L.; LIMA, K.V.B. Avaliação de diferente procedimentos para a extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen. **Cad.Saude Colet**. v. 15(3), p. 401-414, 2007.
  24. BARCELOS, D.; FRANCO, M.F.; LEAO, S.C. Effects of Tissue Handling and Processing Steps on PCR for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Formalin-Fixed Paraffin – Embedded Samples. **Rev Inst Med Trop**. v. 50(6), p. 321-326, 2008.
  25. FARIVAR, T.N.; JOHARI, P.; MOIEN, A.A.; SHAHRI, M.A.; NADERI, M.; OSKOUIE, H. Assessment of Prevalence of Non-tuberculous Mycobacteria in Archival Acid-fast Bacilli Positive Smear Slides by TaqMan Real-time PCR Assay. **Am J Med Sci**. v. 4(5), p. 231-4, 2012.

Vários autores sugerem a utilização do diagnóstico molecular a partir de DNA extraído de esfregaços de lâminas coradas para BAAR, assim como de tecidos embebidos em parafinas, ou fixados em formalina, explorando diversas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, como: PCR, PCR tempo real e Spoligotyping. Assim como a expansão dessa metodologia para o monitoramento de resistência aos fármacos, facilitando a detecção de mutações associadas a resistência utilizando-se marcadores como os genes *rpoB* e *katG* e melhoramento do quadro de diagnósticos de resistência nos programas de Controle da TB<sup>12, 24, 25</sup>.

Frente às novas perspectivas e as limitações ainda encontradas nos métodos moleculares, as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), é que os resultados desses testes devem estar associados aos critérios clínicos, epidemiológicos e aos métodos padrões da rotina laboratorial.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A possibilidade de amplificar a sequência de inserção IS6110 diretamente de uma lâmina, é relevante para o diagnóstico da TB, uma vez que para que a baciloscopia seja positiva necessita-se de pelo menos 5000 bacilos por mL de amostra.

O diagnóstico rápido da tuberculose é importante na interrupção da disseminação da doença, principalmente em grupos de alto risco tais como: portadores de HIV, transplantados e outros casos de imunossupressão.

A baciloscopia não diferencia morfologicamente as espécies de micobactérias, portanto a amplificação da sequência IS6110 permite a identificação rápida da micobactéria, pois sendo uma sequência específica do CMTB, diferencia estas das (MNT), enquanto os métodos convencionais utilizados para a confirmação da espécie apresentam limitações como o tempo de obtenção do resultado que varia entre quatro a oito semanas. Além de ser de fundamental importância, pois estas apresentam diferenças fundamentais no tratamento (para CMTB: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, enquanto as MNT requerem outros tratamentos como, por exemplo, amicacina, claritromicina, entre outros), prognóstico e epidemiologia.

A partir da amplificação do IS6110 pode-se prosseguir na investigação da resistência com maior rapidez por meio da amplificação de genes responsáveis pela resistência à rifampicina, isoniazida, pirezinamida, estreptomicina, entre outros, e assim instituir o tratamento mais adequado.

A manipulação de material clínico nos procedimentos laboratoriais, assim como o transporte pode gerar um maior risco de transmissão. Assim, a possibilidade de utilizar a PCR em lâminas contendo bacilos mortos pela fixação prévia em chama ou por aquecimento em placa diminui os riscos dessa transmissão para os profissionais do laboratório. Principalmente onde somente a baciloscopia é realizada, pois para manipular as culturas é necessário um laboratório de maior complexidade (cabine de segurança biológica classe II/B2 e/ou laboratório de biossegurança nível 3) que são poucos no Brasil .

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Amplificar a sequência de inserção IS6110 diretamente do esfregaço das lâminas coradas para pesquisa do Bacilo Álcool Ácido Resistente.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Padronizar o protocolo de extração de DNA em culturas e em esfregaços de lâminas coradas para BAAR.

Padronizar o protocolo de detecção do complexo MTB por PCR *in house*, utilizando como marcador molecular a sequência IS6110.

Comparar os resultados encontrados com os testes convencionais (baciloscopia e cultura em meio sólido de Lowenstein Jensen) de diagnóstico da TB.

### 3.0 ARTIGO

#### NOTA EXPLICATIVA

Seguindo uma das orientações do Programa de Pós Graduação em Infectologia e Medicina Tropical a dissertação de mestrado deve conter um artigo a ser submetido em uma revista indexada. Nessa dissertação está incluído um artigo submetido e outro a ser submetido e um resumo aceito na Internacional Conference of American Thoracic Society 2013 (Anexo I).

O primeiro artigo foi submetido à revista *BMC Research Note* (Fator de Impacto em 2012 = 3.04) e o segundo será submetido ao jornal “Brazilian Journal of Microbiology” (Qualis B3).

Primeiro artigo: “ Evaluation of the effectiveness of six different DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR IS6110 ”

Segundo artigo: “Amplificação da Sequência de Inserção IS6110 diretamente do esfregaço das lâminas coradas para Bacilo Alcool-Ácido Resistente (BAAR)”



## ARTIGO I

### **Evaluation of the effectiveness of six different DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110**

Isabela Neves de Almeida<sup>1</sup>, Wânia da Silva Carvalho<sup>1</sup>, Maria Lúcia Rossett<sup>2</sup>, Elis Regina Dalla Costa<sup>2</sup> and Silvana Spindola de Miranda<sup>3</sup>

#### **Abstract**

##### **Background:**

Developments in the molecular detection and strain differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex have proved to be useful. The DNA extraction method influences the amplification efficiency, causing interference on the sensitivity and respective inhibitors. The aim of this study was to standardize a simple, fast, and less complex DNA extraction method, providing DNA amplification by IS6110-PCR effectively free from undue interferences.

##### **Findings**

A set of ten bacterial suspensions of *M. tuberculosis* in Löwenstein-Jensen culture medium was tested with different extraction methods. The five sputum smears on slides were tested with Chelex 100 + NP-40 extraction method. The protocol Chelex + Nonidet P-40 was the best extraction method, as it amplified a larger number of concentrated and diluted cultures within a single extraction step. The extractions of smears on slides with positive culture for *M. tuberculosis* were amplified, and that with negative culture was not.

##### **Conclusion:**

The DNA extraction from both, cultures of *M. tuberculosis* and smear slides, by the *Chelex + NP-40* method resulted in good quantity of interference free DNA, especially

in samples with low concentrations of genetic material; therefore, such technique may be used for the molecular diagnosis of tuberculosis.

**Key words:**

*M. tuberculosis*, IS6110, DNA Extraction and PCR.

**Findings**

Background

Tuberculosis (TB) is one of the leading chronic bacterial infections with mortality of almost 3 million, and more than 8 million new cases, every year [1]. Early diagnosis, effective treatment, and successful termination of transmission are major strategies for the control of TB [2].

Polymerase Chain Reaction (PCR) is a fast and sensitive diagnostic method for the detection and identification of *M. tuberculosis*, especially in samples with poor load of bacilli [3], and the most used molecular marker for the DNA amplification is the IS6110 insertion element; which is specific for *M. tuberculosis* complex species' genome [4].

Some studies report different sensitivity and specificity results when using PCR techniques as diagnostic investigation tool, varying from 11 to 81% [5]. There are many reasons for the frequent variability of PCR results; however, earlier studies have suggested that the PCR outcome depends largely on the DNA extraction method [6].

DNA extraction methods should be cost effective, simple, and rapid, eliminating also the presence of PCR inhibitors during the extraction [7, 6].

Thus, the aim of this study was to standardize a simple, fast, and less complex DNA extraction method, and also providing DNA amplification by IS6110-PCR free from any undue interference.

Methods

A set of 10 bacterial dilutions of *M. tuberculosis* in Löwenstein-Jensen culture medium has been tested, using serial dilutions such as: 1/10, 1/100 and 1/1000, achieving a total of 230 dilutions tested with different DNA extraction methods.

A bacterial suspension of *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 strain has functioned as test positive control, being examined as the first sample set.

A volume of 5  $\mu$ L of concentrated DNA, and the respective dilutions (1/10, 1/100, and 1/1000), were submitted to PCR reaction, and dosed in the NanoDrop 1000<sup>®</sup> spectrophotometer (using 2  $\mu$ L as per manufacturer's instruction).

### ***M. tuberculosis* culture DNA extraction**

#### ***M. tuberculosis* Inactivation**

For DNA extraction from culture, a bacterial suspension containing 1.5 mL of sterile water and around 3 to 5 colonies of the H37Rv strain of *M. tuberculosis* was prepared in Eppendorf tubes. This suspension was inactivated at 100°C for 30 minutes in thermo block, and then centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant was discarded, and the sediment was used in the Extraction Protocols 1, 2, 3, 4, and 5. In the Extraction Protocol 6, the initial stage was different and will be described further.

#### *Extraction Protocol 1 – Extraction using Phenol-chloroform*

DNA from *M. tuberculosis* strains was prepared as follows, after neutralization: a pellet of 400  $\mu$ L of lysozyme solution (10 mg/mL) was added to the suspension, and incubated for 1 hour at 37° C. Afterwards, 20  $\mu$ L EDTA (50 mM) + 400  $\mu$ L of proteinase K solution (10 mg/mL) were added, and the mixture was incubated at 60° C for 1 hour. Then, the solution was incubated at -20°C overnight, and the DNA was extracted with phenol-chloroform and ethanol. After freezing the solution, it was divided into two parts, and 400  $\mu$ L of phenol-chloroform were added in each vortex and centrifuged at 12.000 rpm for 15 minutes. The supernatant was then transferred to another tube, and 0.6 volume of isopropanol and 1/10 volume of sodium acetate were added; homogenizing then the solution until disappearance of the white color. Then, the solution was incubated again, at -20°C for 30 minutes. After that, it was centrifuged at 12.000 rpm for 10 minutes, and the supernatant was discarded. The pellet was washed with 500  $\mu$ L of 70% ethanol twice, and after complete evaporation, 20  $\mu$ L of TE (Tris 100 $\mu$ M + EDTA 50 $\mu$ M) were added to this pellet. The DNA was conserved at 2°-8°C, until the PCR. This method was considered the standard method [8].

*Extraction Protocol 2 – Extraction using 70% alcohol*

500 µL of 70% Ethanol were added to a pellet in a tube, and incubated for 2 hours. Then, mycobacterial cells were centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes, the supernatant was discarded, and the pellet was washed twice with sterile distilled water. After washing, the pellet was resuspended in 500 µL of sterile distilled water in an 1.5 mL Eppendorf tube, and used for PCR [9].

*Extraction Protocol 3 – Extraction using Chelex 100 + Nonidet P-40 (NP-40)*

200 µL were added to a pellet of Chelex suspension containing 5% Chelex-100, 1% Nonidet P-40, 1% Tween 20, and distilled water. After mixing thoroughly, the samples were incubated for 30 minutes at 100° C. The samples were then centrifuged for 10 minutes at 13000 g, and the solution was transferred to a fresh microcentrifuge tube and used for PCR [10].

*Extraction Protocol 4 – Extraction using Chelex 100*

A 200 µL solution was added to a pellet of 40 mg Chelex + 100 mL of water and incubated at 95° C for 20 minutes. Then, this solution was centrifuged at 12 000 g for 15 minutes. The supernatant was used as a DNA source for PCR [11].

*Extraction Protocol 5 – Extraction using Chelex 100 + 70% Alcohol*

A total of 150 µL of ice-cold 70% ethanol was added in a tube, mixed thoroughly, and incubated in ice (-20° C) for 20 minutes. The suspension was then centrifuged at 12000 rpm for 5 minutes, and 200 µL of 20% Chelex solution were added to the pellet. The mixture was then vigorously stirred with a shaker, and incubated at 55°C for 1 hour. It was then put in the vortex again at high speed for 10-20 seconds. The tubes were kept at 100° C for 15 minutes. Then, the tubes were centrifuged at 12.000 rpm for 5 minutes, at 4°C. Afterwards, the supernatant was transferred to a new tube and was used for PCR [12].

*Extraction Protocol 6 – Extraction using chloroform + CTAB (N-cetyl-N,N,N,-trimethyl ammonium bromide)*

Several loopfuls of bacteria were resuspended in 400 µL of TE 1X buffer, and the bacteria were inactivated at 80°C for 20 minutes. 50 µL of lysozyme solution were

added to the vortex, and incubated at 37°C for, at least, 1 hour under stirring. 70 µL of SDS 10% and 5 µL of proteinase K were added to the vortex, and incubated at 65°C for 10 minutes. 100 µL of NaCl 5M and 100 µL of CTAB/NaCl solution were added to the vortex until the liquid content became white; then, it was incubated for 10 minutes at 65°C. 750 µL of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) were added to the vortex for 10 seconds, and centrifuged at room temperature for 5 minutes, at 14.000 g. The supernatant was transferred to a clean tube and 0,6 volume of isopropanol was added. It was incubated at -20°C for 30 minutes, and centrifuged for 15 minutes at 14.000 g. The supernatant was discarded and the pellet washed with 1 mL of 70% ethanol and centrifuged for 5 minutes at 14.000 g. To precipitate the DNA, 20-30 µL of TE were added [13].

### ***M. tuberculosis* DNA extraction from smear slides of sputum**

The sputum smears on slides were submitted to *Chelex 100* + Nonidet P-40 (NP-40) extraction, as it was the most effective method among the six tested ones.

Five slides of positive bacilloscopy sputum (one + and two ++) and a slide with negative bacilloscopy were selected, coming from the Mycobacterial laboratory of the *Hospital of Clinics* at the Federal University of Minas Gerais. The slides were stained by the fluorescence method (Auramine O), to be submitted to extraction procedure.

For auramine, positive smears from culture of samples of *M. tuberculosis* positive sputum were used. These smears were done before the samples' decontamination step and after decontamination with 0.5% *N*-acetyl-L-cysteine/2% NaOH (NaLC/NaOH) [10].

#### *Extraction using Chelex 100 + Nonidet P-40 (NP-40) on slides.*

A volume of 25µL of a suspension containing 5% Chelex-100, 1% Nonidet P-40, 1% Tween 20, and distilled water was spread on the smear slides with a tip. The liquid was transferred to an Eppendorf tube and 75 µL of the same suspension were added. After mixing thoroughly, the samples were incubated for 30 minutes at 100° C. The samples were then centrifuged for 10 minutes at 13000 g and the solution was transferred to a fresh microcentrifuge tube; then, 5 µL were used for PCR [11].

The *M. tuberculosis* and Non-tuberculous Mycobacteria (NTM) species were confirmed after growth in Lowenstein Jensen culture medium, and identified by basic biochemical methods in the Ezequiel Dias Foundation Reference Center [14].

#### *PCR and Electrophoresis*

PCR was performed in a final volume of 50  $\mu$ L containing 7,0  $\mu$ L of Buffer (10x), 3,0  $\mu$ L of  $MgCl_2$  (50mM), 0,2  $\mu$ L of DNTP (25mM), 25 pmol of each oligonucleotide (IS1- 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3' and IS2- 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') and 0,5  $\mu$ L of Taq DNA Polymerase (500U) Invitrogen<sup>®</sup>. Amplification was carried out for 40 cycles, each consisting of initial denaturation at 94°C for 2 min, denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 64°C for 2 minutes, extension at 71°C for 1minute, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes. PCR products were analyzed by gel electrophoresis on 2% agarose gel. One hundred and twenty-three base pair (bp) target DNA fragments were viewed under ultraviolet illumination. The same protocol was used for cultures and slides.

#### **Results**

The cultures of *M. tuberculosis* exhibited concentrations ranging from 20 ng/ $\mu$ l up to 200 ng/ $\mu$ l of DNA, dosed by the NanoDrop1000<sup>®</sup> spectrophotometer.

The efficiency of Extraction Protocols 1, 2, 3, 4, 5 and 6 developed in *M. tuberculosis* cultures were respectively of: 75%, 75%, 90%, 75%, 77.5% and 90%.The methods presenting the better performance were Extraction Protocols 3 and 6 (both 90%). Among two, the one showing the lower amount of weak bands (WB) was the Extraction Protocol 3 (four WBs), as compared to Extraction Protocol 6 (twelve WBs).

Extraction Protocol 3 showed also a higher efficiency (90%), when 1/1000 diluted DNA was used, as compared to Extraction Protocol 6 (70%).

The amplifications results after DNA extraction from ten *M. tuberculosis* cultures are shown in Table 1.

Figure 1 shows the electrophoresis of amplifications performed with Extraction Protocol 3.

### **Amplification after extraction of sputum smears in slide:**

There was amplification of 4 slides with positive cultures for *M. tuberculosis*, and the slide with culture for *M. kansasii* was not amplified by IS6110-PCR, among the DNA extracted from the smear slides using Extraction Protocol 3 (Table 2). In Figure 2, the electrophoresis of smear slides amplifications is shown.

### **Conclusions**

This study demonstrated the application of various DNA extraction methods and found an efficiency variation between the methods of 75% to 90%, which proves that the extraction method directly influences the IS6110-PCR effectiveness. The number of steps and reagents, and the nature of used chemical reagents (proteolytic enzymes, organic solvents, alcohols, and resins) show the difference between the six extraction methods. Extraction Protocols 1 and 6 ('*Phenol-chloroform*' and '*Chloroform + CTAB*') used lysozyme and proteinase K in the first phase of extraction, which led to cellular membranes rupture and release of cytoplasmic components, due the digestion by proteolytic enzymes. There was also the use of organic solvents, phenol and chloroform, which separated the DNA from lipids and other biochemical compounds, and the addition of ethanol occurred as well, to recover and purify the DNA. With the use of CTAB, it was possible to improve the sensitivity, as it has a better action on the DNA purification [15].

Extraction Protocols 2 and 5 ('*70% Alcohol*' and '*Chelex 100 + 70% Alcohol*') used 70% alcohol aiming the DNA purification. The 70% alcohol helps in the removal of organic waste that could act as PCR inhibitors [10]. Within these two protocols, the elimination of a greater amount of organic waste in the concentrated samples is evidenced through the 70% alcohol action, which is best shown in Extraction Protocol 5, as all concentrated cultures were amplified, and resin (Chelex 100) was used to help the DNA removal from cell inward [6].

Extraction Protocols 3 and 4 ('*Chelex + NP-40*' and '*Chelex 100*') use the Chelex 100 resin as principal reagent for the DNA extraction, associated to the thermal shock and NP-40 in order to purify the DNA. These extraction protocols are fast; however, Extraction Protocol 3, which uses NP-40, had a higher efficiency when the DNA was amplified (90%), demonstrating its possible use for saving time as compared to

Extraction Protocol 1 (Phenol Chloroform), which has been described by some authors as the gold standard for extraction [16].

Extraction Protocol 3 presented the best culture results in extraction; so using this protocol in the smear slides can recover small amounts (dilution 1/1000) of *M. tuberculosis* DNA, using less reagents, with less stages, and without inhibitors; so, this method is effective, practical, and fast.

In this work, we have noticed that simpler protocols (Extraction Protocol 3), presenting fewer stages and using less reagents, presented results similar to those of more complex protocols (Extraction Protocol 6), presenting also higher efficiency with lower DNA concentrations (1/1000) and lower evidence of WB among the positives, since WB may be considered negative, depending on the observer. This protocol has been employed by some authors, since it does not use any organic solvent, eliminates multiple stages of purification, and uses only two Eppendorf tubes per sample, decreasing so costs and time spent [7].

DNA dosage after extraction from cultures was important in showing that there was sufficient quantity for PCR amplification, but some authors claim that it is not a reliable parameter to direct the technical procedures of extraction, because even when the device measurements do not reveal the presence of DNA, successful amplification may occur, as demonstrated in this study with the use of smears from clinical specimens [17].

The authors used Extraction Protocol 3 (Chelex NP-40) for DNA extraction in smear slides, due to its higher efficiency between the protocols tested in culture, which has also demonstrated high efficiency. The good PCR performance exhibited in samples extracted by ‘*Chelex + NP-40*’ may be associated to the fact that the NP-40 is a detergent with high capacity for breaking lipid-protein interactions, performing so the cell lysis and facilitating the DNA release from the cell; which results in good extraction and reduces the presence of PCR inhibitors. In addition, it is a single stage extraction method, eliminating so the DNA loss that occurs when using multiple stages.

The smear slides study limitation is in the need to use a great panel to confirm the sensitivity and specificity values, as this methodology (Extraction Protocol 3) would be ideal for laboratories where only bacilloscopy is performed, as is the case in several locations in Brazil. Additionally, it would eliminate the biosafety issue during the



transportation of slides to molecular biology labs. The relevance of amplifying the DNA extracted directly from smear slides is due to the fact that bacilloscopy does not differentiate the macro bacterial species, while IS6110 sequence amplification allows a rapid identification of these micro bacteria, as it is a specific sequence of MTC, differentiating them from the MNT. As such, new “in house” extraction methods should be standardized and tested, as shown in this study.

The results of this work lead to conclusion that the method *Chelex + NP-40* (Extraction Protocol 3) for *M. tuberculosis* DNA extraction in cultures and slides is able to provide a good quantity of interferences free DNA, mainly in samples with low concentrations of genetic material, which makes possible its use in the molecular diagnostic of TB.

### **Abbreviations**

*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*); Tuberculosis (TB); *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC); Polimerase Chain Reaction (PCR).

### **Competing interest**

The authors declare no competing interests.

### **Authors' information**

<sup>1</sup> Federal University of Minas Gerais, <sup>2</sup> State Foundation for Production and Research in Health (FEPPS), Porto Alegre, Brazil<sup>3</sup> Research Group Coordinator FM/UFMG\_REDE-TB.

### **Authors' contributions**

SSM, WSC and INA planned and designed the experiments. INA performed the experiments. SSM, WSC and INA analyzed the data. SSM, WSC, INA, MLR and ERDC wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements:**

The Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG) and the Graduate department of the Medicine Faculty, Federal University of Minas Gerais for the financial support. To the collaborators: Lúcia Tavares Paradizi, Ana Lethícia Figueiredo and Lida Jouca, and all integrated laboratories employees.

## References

1. Amim I, Idrees M, Awan Z, Shashid M, Afzal S, Hussain A. **PCR could be a method of choice for identification of both pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis.** *BMC Research Notes* 2011, **4**:332.
2. Van Der Zandem AGM, Te Koppele, Vije EM, Vijay Bhanu N, Van Soolingen D, Schouls LM. **Use of DNA Extracts from Ziehl Neelsen Stained Slides for Molecular Detection of Rifampin Resistance and Spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis.** *J Clin. Microbiol* 2003, **41**(3):1101 – 1108.
3. Haldar S, Chakravorty S, Bhalla M, Majumdar DS, Tyagi SJ. **Simplified detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons.** *J Med Microbiol* 2007, **56**(10):1356-1362.
4. Kolk AHJ, Noordhoek GT, De Leeuw O, Van Emden JDA. **Mycobacterium smegmatis strain for detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria.** *J Clin Microbiol* 1994, **32**(5):1354-1356.
5. Barani R, Saranga G, Antony T, Periyasami S, Kindo AJ, Srikanth P. **Improved detection of Mycobacterium tuberculosis using two independent PCR targets in a tertiary care centre in South India.** *J Infect Dev Ctries* 2012, **6**(1):46-52.
6. Nagdev KJ, Kashyap RS, Deshpande PS, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. **Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100® extracted DNA samples.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2010, **14**(8):1032–1038.
7. Suresh N, Arora J, Pant H, Rana T, Singh UB. **Spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis DNA from Archival Ziehl–Neelsen-stained sputum smears.** *J Microbiol Methods* 2007, **68**(2):291–295.

8. Otal I, Martin C, Frebault LVV, Thierry D, Gicquel B. **Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using IS6110 as an Epidemiological Marker in Tuberculosis.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**(6):1252-1254.
9. Elbir H, Mushin A, Babiker A. **Short Report: A One-Step DNA PCR-based Method for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Grown on Lowenstein-Jensen Media.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**(2): 316–317.
10. Van Der Zanden AGM, Hoeilmann FGC, Weltevred EF, Schouls LM, Van Embden JDA. **Simultaneous detection and strains differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and stained microscopic preparation.** *J Clin Pathol* 1998, **51**(4):209-214.
11. Al-Mutairi NM, Ahmad S, Mokkadas E. **Performance comparison of four methods for detecting multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2011, **15**(1):110–115.
12. Deshpande PS, Nagdev KJ, Kashyap RS, Purohit HJ, Taori GM, Daginawala HF. **Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100® extracted DNA samples.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2010, **14**(8):1032–1038.
13. Leao SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, Portaels F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Section II - Methodological Procedures.** Printed by Vanden B. Bruges; 2004: 115-116.
14. Ministério da Saúde: *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da tuberculose e outras Micobactérias.* Brasília; 2009.
15. Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. **Avaliação de três métodos de extraction de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR.** *Pesqui Odonto Bras* 2001, **15**(4):314-319.

16. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. **Fast Identification of Mycobacteria to Species Level by Polymerase Chain reaction and Restriction Enzyme analysis.** *J Clin Microbiol* 1993, **31**(2):175-178.
  
17. Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. **Methodos of DNA extraction from archived materials and rare sources for utilization in polymer reaction.** *Rev. bras. Hematol Hemoter* 2004, **26**(4):274-281.

**Table 1 Amplification after extraction of ten *M. tuberculosis* cultures**

		DNA of <i>Tuberculosis</i> cultures									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		(PC)									
Protocol 1	Concentrated	WB	WB	WB	-	+	+	+	+	WB	+
	Dilution 1:10	WB	+	+	-	+	WB	+	-	+	WB
	Dilution 1:100	-	+	+	-	+	WB	+	WB	+	-
	Dilution 1:1000	-	WB	-	WB	+	WB	-	+	+	-
Protocol 2	Concentrated	WB	+	+	-	+	+	+	+	WB	+
	Dilution 1:10	+	-	WB	-	+	+	+	+	-	+
	Dilution 1:100	WB	-	+	WB	WB	+	+	+	-	+
	Dilution 1:1000	WB	-	+	WB	WB	+	-	+	-	-
Protocol 3	Concentrated	+	+	+	WB	+	+	+	+	-	+
	Dilution 1:10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dilution 1:100	+	+	+	-	+	WB	+	+	-	+
	Dilution 1:1000	+	+	+	-	+	WB	+	+	WB	+
Protocol 4	Concentrated	+	+	+	WB	WB	+	+	+	-	WB
	Dilution 1:10	+	+	+	-	WB	+	+	+	-	+
	Dilution 1:100	+	WB	+	-	-	+	+	+	-	+
	Dilution 1:1000	+	-	WB	-	-	+	WB	-	+	+
Protocol 5	Concentrated	+	+	+	WB	+	+	+	+	+	+
	Dilution 1:10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dilution 1:100	+	WB	WB	-	+	+	WB	+	-	+
	Dilution 1:1000	WB	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Protocol 6	Concentrated	+	+	+	-	+	WB	+	+	WB	+
	Dilution 1:10	+	+	+	WB	+	+	+	+	WB	+
	Dilution 1:100	+	WB	+	WB	WB	+	WB	+	WB	+
	Dilution 1:1000	WB	WB	+	-	-	+	-	+	WB	+

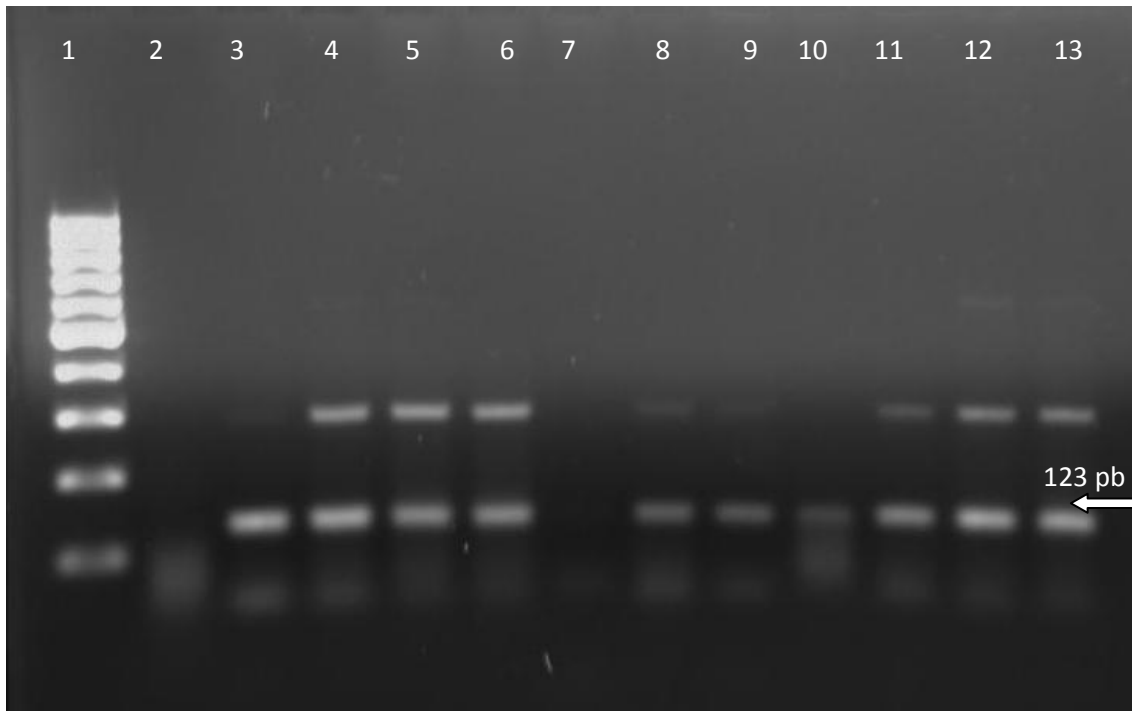
\*WB: weak band; CP: positive control; + positive; - negative.

**Table 2 Results of amplifications after extraction of DNA from five smears in sputum slides.**

	AFB AU	PCR	Culture
Sample 1	++	pos	<i>M. tuberculosis</i>
Sample 2	+	pos	<i>M. tuberculosis</i>
Sample 3	-	pos	<i>M. tuberculosis</i>
Sample 4	++	pos	<i>M. tuberculosis</i>
Sample 5	+	neg	<i>M. kansasii</i>

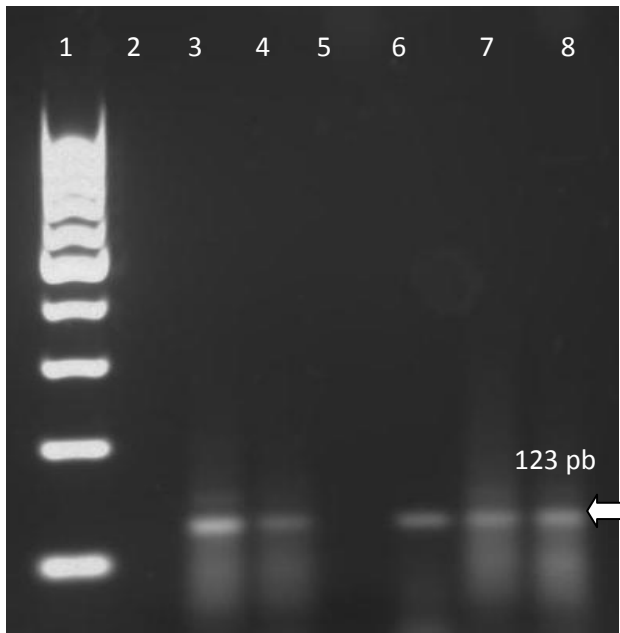
+ and ++ positives; pos = positive; neg = negative; PCR = Polymerase Chain Reaction; AFB AU = Acid-fast bacilli by Auramine.

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of amplifications performed with protocol 3.



Lane 1 = Molecular marker 100pb, Lane 2 = Negative Control, Lane 3 = Positive Control, Lane 4 = Sample 8, Lane 5 = Sample 6, Lane 6 = Sample 7, Lane 7 = Sample 9, Lane 8 = Sample 5, Lane 9 = Sample 10, Lane10 = Sample 4, Lane 11 = Sample 3, Lane 12 = Sample 1, Lane 13 = Sample 2.

Figure 2 Electrophoresis of amplifications of smear slides



Lane 1 = Molecular marker 100pb, Lane 2 = Negative Control, Lane 3 = Positive Control, Lane 4 = Sample 1, Lane 5 = Sample 5, Lane 6 = Sample 3, Lane 7 = Sample 3, Lane 8 = Sample 4.



## ARTIGO II

### **PCR *in house* em DNA extraído diretamente de lâminas para a exclusão da Tuberculose: enfoque na biossegurança.**

**Isabela Neves de Almeida<sup>1</sup>, Agdemir Valéria Aleixo, Wânia Silva Carvalho<sup>3</sup>, Silvana Spindola de Miranda<sup>4</sup>.**

#### **Resumo**

Testes moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são uma alternativa promissora para o diagnóstico da TB. No presente estudo foi padronizado e testado a amplificação da sequência de inserção IS6110 diretamente do esfregaço das lâminas coradas para detecção do Bacilo Álcool Ácido Resistente (BAAR).

**Palavras Chave:** *M. tuberculosis*, lâminas, PCR IS6110, tuberculose.

#### **Introdução**

A tuberculose (TB) continua sendo um grande problema de saúde global (14). Em 2011 o Brasil apresentou 84.137 casos notificados de TB, sendo 40.289 casos novos com baciloscopia positiva, o que representa 66% dos casos novos de TB pulmonar, 12.683 casos novos com baciloscopia negativa e 10.067 casos extra pulmonares. Frente a estes dados o Brasil hoje ocupa o 15º lugar dentre os 22 países que apresentam os maiores índices de TB no mundo (14).

As Micobactérias Não tuberculosas (MNT) também têm a capacidade de produzir doença, e sua importância vem aumentando progressivamente com isolamentos de diferentes espécies nos laboratórios de micobactérias. A correlação clínica laboratorial é de fundamental importância para o diagnóstico da doença por MNT e determinação da estratégia terapêutica (17).

A baciloscopia é um exame simples, rápido, econômico e é a mais difundida técnica para o diagnóstico da TB, portanto a possibilidade de se obter DNA a partir de lâminas é uma alternativa valiosa para suprir a falta de amostras, quando estas são totalmente utilizadas para a baciloscopia, resolver o problema do transporte dos espécimes e principalmente devido às questões de biossegurança (longas distâncias transportando

frascos com amostras clínicas (escarro), potencialmente transmissíveis em caso de acidente no transporte) (5,13,15). A amplificação de ácidos nucleicos por meio da PCR diretamente de esfregaços em lâminas tem sido descrita por alguns autores como sendo mais específica, em relação à baciloscopia e mais rápida do que os métodos de cultura (5, 13). A baciloscopia positiva não diferencia as espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) das MNT, porém quando associada à PCR positiva aumenta a acurácia do diagnóstico da TB (10,16).

O presente estudo tem como objetivo utilizar a sequência de inserção IS 6110 na amplificação de DNA de esfregaço em lâminas para o diagnóstico da TB e descartar as MNT, levando em conta a biossegurança.

### **Materiais e Métodos**

Foram selecionados 287 esfregaços em lâminas (amostra de conveniência) coradas pelo método de Ziehl Neelsen e Auramina, provenientes do laboratório da Faculdade de Medicina/Laboratório de Micobactérias/Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais – FM/LM/HC/UFGM, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

Foram incluídas lâminas com resultado de cultura positivas e negativas. Quando positivas deveriam ter o resultado do teste de identificação. Foram excluídas as amostras que não apresentavam resultado de cultura (por não realização ou contaminação), ou resultado do teste de identificação de culturas mistas (MTB e MNT).

Dos 287 lâminas, 26 foram excluídas por não atenderem os critérios de inclusão, restando portanto, 261 lâminas.

Das 261 lâminas incluídas, 52 apresentaram baciloscopias e culturas positivas, 35 baciloscopias negativas e culturas positivas. Dessas, 72 foram identificadas como Complexo *M. tuberculosis*, 15 como Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) e 174 baciloscopias e culturas negativas.

A cultura foi realizada em meio de Loweinstein-Jensen e o teste de identificação foi realizado por métodos fenotípico (8).

Extração do DNA - *Chelex 100 + Nonidet P40 (NP40) em lâminas* (13).

Foi adicionado 25µL da solução de Chelex, contendo 5% Chelex-100, 1% Nonidet P40, 1% Tween 20 e água destilada, sobre o esfregaço. O esfregaço foi raspado até completa remoção, com o auxílio da ponteira, e transferido para um eppendorf contendo 75 µL da mesma solução. Após agitação, incubou-se o eppendorf por 30 min á 100°C. As amostras foram centrifugadas por 10 min á 13.000g e então o sobrenadante transferido para um novo eppendorf estéril, e 5 µL desta solução utilizado para PCR.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: 7,0µL de Buffer (10x), 3,0 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,2 µL DNTP (25mM), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (IS1- 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3' e IS2- 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') e 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (500U) Invitrogen®, em um volume final de 50 µL. A desnaturação inicial do DNA, foi a 94°C por 2min, e um total de 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 68°C 2 min, 71°C for 1min, e uma extensão final de 72°C for 10min. Os amplicons foram revelados em gel de agarose a 2% corados por brometo de etídio.

As amplificações dos DNA por PCR foram realizadas de maneira cega.

#### Análise Estatística

Os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia foram comparados com a identificação fenotípica (padrão ouro) (3).

### **Resultados**

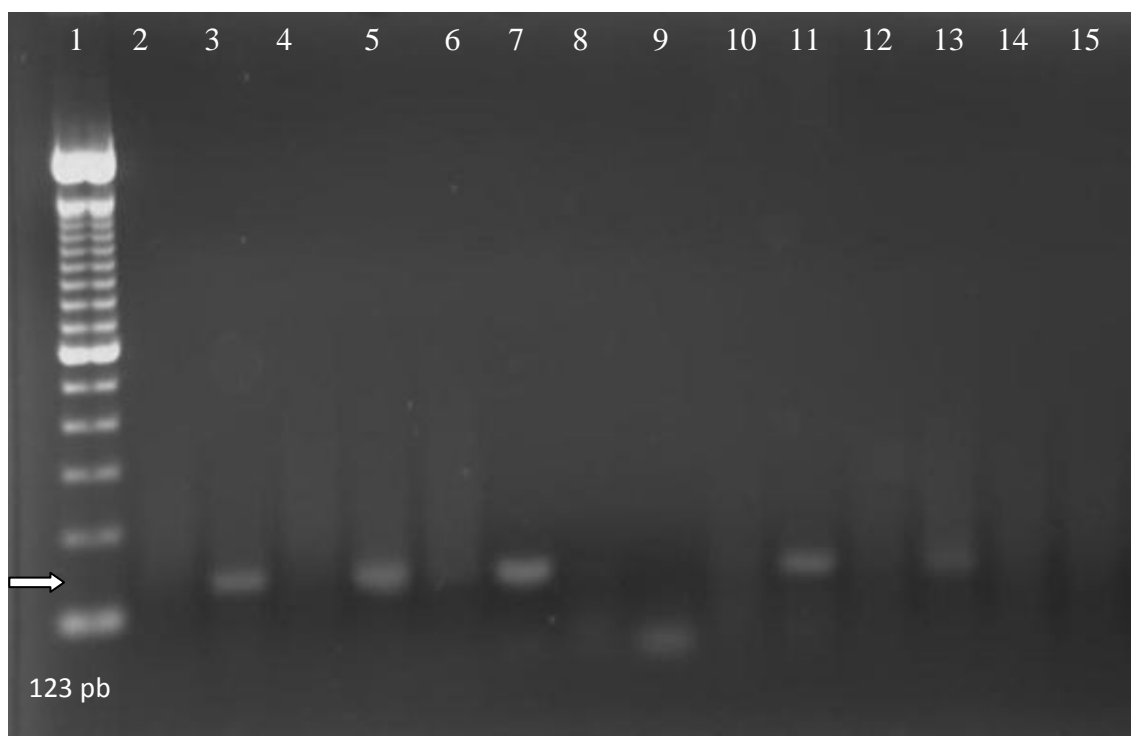
Das 87 lâminas com cultura positiva, 69 eram escarros, 7 Lavados Bronco Alveolar (BAL), 6 aspirados traqueais, 2 abscessos axilares, 2 líquidos pleurais e 1 secreção (abcesso). Não houve diferença da sensibilidade e especificidade entre essas amostras na PCR.

A sensibilidade e especificidade da amplificação do DNA com o IS 6110 foram de 37,5% e 100%, respectivamente. O valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 80,8% e acurácia de 82,8%.

Dentre as 22 baciloscopias negativas com culturas positivas, quatro foram positivas pela PCR (18%).

Na figura 1 é demonstrada a eletroforese das amplificações pela PCR IS6110.

Figura 1. Eletroforese das amplificações pela PCR IS6110



Linha 1- Marcador de peso molecular 100pb, Linha 2- Controle Negativo, Linha 3- Controle positivo – *M. tuberculosis* H37RV, Linhas: 4, 6, 8, 9 e 10 – Amostras de MNT, Linhas: 5, 7, 11 e 13 – Amostras de MTB, Linhas: 14 e 15 – Amostras negativas.

### Discussão

A possibilidade de se obter DNA a partir de lâminas é uma alternativa valiosa para resolver o problema do transporte do espécime, principalmente em locais onde a própria geografia é um empecilho para o acesso às amostras. Além de diferenciar as micobactérias do CMTB das MNT, o que não é possível utilizando somente a baciloscopia (5).

A PCR IS6110 tem como característica principal a capacidade de detectar a presença do DNA de micobactérias do CMTB, e pode ser utilizada em amostras paucibacilares reduzindo o tempo do diagnóstico (1,9).

A alta especificidade encontrada nesse estudo é relevante, pois evita a introdução de tratamentos e condutas desnecessárias em casos em que a baciloscopia é positiva e se

trata de uma infecção por MNT. Portanto, essa metodologia pode ser aplicada em locais onde as MNT são frequentemente isoladas. Como por exemplo, no Brasil onde no período de 2000 a 2008 foram notificados 2.139 casos de infecção por MNT. A maioria destes casos foi notificada na região sudeste (1.458), incluindo o Estado de Minas Gerais. Os demais casos estão distribuídos entre as regiões Norte, Sul, Centro Oeste e Nordeste (18).

A baixa sensibilidade da PCR *in house* tem sido associada a uma pequena quantidade e a heterogenicidade da distribuição de bacilos na amostra, embora nesse estudo as 22 baciloscopias negativas com cultura positiva a PCR IS6110 foi positiva em 4 amostras (18%), sendo portanto mais rápida que a cultura que tem como limitação o tempo de crescimento (5,9).

A aplicação da PCR IS6110 *in house* em DNA extraído de esfregaço em lâminas em diversas amostras (escarro, BAL, aspirado traqueal, e secreções) é descrita pela primeira vez nesse estudo,, e por não ter sido observado diferença da sensibilidade e especificidade entre elas, essa metodologia tem um potencial de aplicação no diagnóstico da TB

A manipulação de material clínico nos procedimentos laboratoriais, assim como o transporte pode gerar um maior risco de transmissão da TB. Assim, a possibilidade de utilizar a PCR em lâminas contendo bacilos mortos pela fixação prévia em chama ou por aquecimento em placa diminui os riscos dessa transmissão para os profissionais do laboratório que irão realizar a extração do DNA. Além da importância do diagnóstico da TB e da exclusão da mesma, onde somente a baciloscopia é realizada, como acontece em várias locais no Brasil e no mundo, pois para manipular as colônias em cultura é necessário um laboratório de maior complexidade (Nível de Biossegurança III).

### **Conclusão**

A PCR IS6110 em DNA extraído de esfregaços em lâminas é um método rápido, simples, específico e seguro, sendo, portanto indicado como uma importante ferramenta auxiliar no diagnóstico e principalmente para descartar a TB.

## Referências

1. Barani, R.; Sarangan, G.; Antony, T.; Periyasamy, S.; Kindo, A.J.; Srikanth, P. (2012). Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* using two independent PCR targets in a tertiary care centre in South India. *J Infect Dev Ctries.* 6, 46-52.
2. Barcelos, D.; Franco, M.F.; Leao, S.C. (2008). Effects of Tissue Handling and Processing Steps on PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Formalin-Fixed Paraffin – Embedded Samples. *Rev Inst Med Trop.* 50, 321-326.
3. Braile, D.M.; Godoy, M.F. (1999). Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos.
4. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2006). Técnicas em Biologia Molecular.
5. Furlaneto, I.P.; Sousa, E.B.; Brito, M.L.; Lima, G.L.F.L.; Lopes, M.L.; Silva, S.H.M.L.; Lima, K.V.B. (2007). Avaliação de diferentes procedimentos para a extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen. *Cad.Saude Colet.* 15, 401-414.
6. Gopinathan, A.K.; Sridharan, G.; Appu, K.C.; Lingesan, K.; Sankar, S.; Nandagopal, B. (2010). Evaluation of a nested PCR targeting IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of the organism in the leukocyte fraction of blood samples. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 28, 227-232.
7. Magana-Arachchi, D.; Perera, J.; Gamage, S.; Chandrasekharan, V. Low cost in-house PCR for the routine diagnosis of extra pulmonary tuberculosis. (2008). *Int J Tuberc Lung Dis.* 12, 275-280.
8. Ministério da Saúde. (2009). Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da tuberculose e outras Micobactérias.
9. Nagdev, K.J.; Kashyap, R.S.; Deshpande, P.S.; Purohit, H.J.; Taori, G.M.; Dagainawala, H.F. (2010). Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100® extracted DNA samples. *Int J Tuberc Lung Dis.* 14, 1032–1038.

10. Nogueira, C.L.; Wildner, L.M.; Senna, S.G.; Rovaris, D.; Gruner, M.F.; Jakimiu, A.R.; Silva, R.M.; Bazzo, M.L. (2012). Alternative sputum preparation to improve polymerase chain reaction assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 16, 783-787.
11. Poroca, D.R.; Lima, A.S.; Lima, J.F.A.; Cruz, H.L.A.; Montenegro, R.A.; Melo, F.L.; Schindler, H.C.; Montenegro, L.M.L. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. (2009). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24, 716-722.
12. Riley, L. W.; Colford, J.M.; Pai, M.; Flores, L.L. (2005). In-House nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology.* 55, 11-9.
13. Van Der Zandem, A.G.M.; Hoeilmann, F.G.C.; Weltevred, E.F.; Schouls, L.M.; Van Embden, J.D.A. (1998). Simultaneous detection and strains differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and stained microscopic preparation. *J Clin Pathol.* 51, 209-214.
14. W.H.O. World Health Organization. 2012. Global Tuberculosis Control 2012.
15. Thierry, D.; Brisson-Noel, A.; Vicent Levy Frebau, V.; Nguyen, S.; Guesdon, J.L.; Gicquel, B. (1990) Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 28, 2668-73.
16. Haldar, S.; Chakravorty, S.; Bhalla, M.; Majumdar, D.S.; Tyagi, S.J. Simplified detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons.(2007) *Journal of Medical Microbiology.* 56, 1356-1362,
17. Hada, D.J.; Ide, J.; Ferrazoli, L.; Seiscento, M.; Telles, M.A.S.; Martins, M.C.; Leite, O.M.; Ueki, S.Y.M. Micobacteriose: Recomendações para o diagnostic e tratamento. (2005) Secretaria Estadual de Saúde\_Coordenadoria de Controle de Doenças. São Paulo.

#### **4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esse estudo levanta a necessidade de maior aprimoramento das técnicas de extração de DNA, amplificação de ácidos nucleicos e revelação dos produtos amplificados, para aumentar a eficácia das técnicas de biologia molecular *in house* para que estas tenham aplicabilidade da rotina laboratorial.



#### 4.1 PERSPECTIVAS

Desenvolvimento de metodologias de PCR *in house*, aprimorando a técnica de detecção dos produtos amplificados utilizando hibridização em membrana.

PCR multiplex para a identificação do *Mycobacterium* e estudo de genes de resistência à drogas utilizadas no tratamento da TB.

Utilização de marcadores das regiões de repetições diretas (DR), para identificação e detecção de mutações relacionadas à resistência por meio de métodos de genotipagem como: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism), MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) e Spoligotyping.

## 5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in adults and children. **Am J Respir Crit Care Med.** v.161, p. 1376-1395, 2000.

AMIM, I.; IDREES, M.; AWAN, Z.; SHASHID, M.; AFZAL, S.; HUSSAIN, A. PCR could be a method of choice for identification of both pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. **BMC Research Notes.**, v.4, p.332. 2011.

AL-MUTAIRI, N.M.; AHMAD, S.; MOKKADAS, E. Performance comparison of four methods for detecting multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Int J Tuberc Lung Dis.** v.15(1), p.110–115. 2011.

BAREA, J.A.; PARDINI, M.I.M.C.; GUSHIKEN, T. Methodos of DNA extraction from archived materials and rare sources for utilization in polymer reaction. **Rev. bras. Hematol Hemoter.** v.26(4), p.274-281. 2004.

BARANI, R.; SARANGAN, G.; ANTONY, T.; PERIYASAMY, S.; KINDO, A.J.; SRIKANTH, P. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* using two independent PCR targets in a tertiary care centre in South India. **J Infect Dev Ctries.** v. 6(1), p. 46-52, 2012.

BOLLELA, V.R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública.** v. 33(3), p. 281-286, 1999.

BARCELOS, D.; FRANCO, M.F.; LEAO, S.C. Efects of Tissue Handling and Processing Steps on PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Formalin-Fixed Paraffin – Embedded Samples. **Rev Inst Med Trop.** v. 50(6), p. 321-326, 2008.

BARON, E.J.; PETERSON L.R.; FINEGOLD, S.M. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9.ed. Missouri: Mosby, 1994. 958 p. (Mycobacteria, 42).

BRAILE, D.M.; GODOY, M.F. Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos, 1999.

DESHPANDE, P.S.; NAGDEV, K.J.; KASHYAP, R.S.; PUROHIT, H.J.; TAORI, G.M.; Daginawala, H.F. Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100® extracted DNA samples. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 14(8), p.1032–1038. 2010.

ELBIR, H.; MUSHIN, A.; BABIKER, A. Short Report: A One-Step DNA PCR-based Method for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Grown on Lowenstein-Jensen Media. **Am J Trop Med Hyg.** v. 78(2), p. 316–317. 2008.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Técnicas em Biologia Molecular.** Concórdia, 2006.

FURLANETO, I.P.; SOUSA, E.B.; BRITO, M.L.; LIMA, G.L.F.L.; LOPES, M.L.; SILVA, S.H.M.L.; LIMA, K.V.B. Avaliação de diferentes procedimentos para a extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen. **Cad.Saude Colet.** v. 15(3), p. 401-414, 2007.

FARIVAR, T.N.; JOHARI,P.; MOIEN, A.A.; SHAHRI, M.A.; NADERI,M.; OSKOUIE,H. Assessment of Prevalence of Non-tuberculous Mycobacteria in Archival Acid-fast Bacilli Positive Smear Slides by TaqMan Real-time PCR Assay. **Am J Med Sci.** v. 4(5), p. 231-4, 2012.

GOPINATHAN, A.K.; SRIDHARAN, G.; APPU, K.C.; LINGESAN, K.; SANKAR, S.; NANDAGOPAL, B. Evaluation of a nested PCR targeting IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of the organism in the leukocyte fraction of blood samples. **Indian Journal of Medical Microbiology,** v. 28(3), p. 227-232, 2010.

HEYM, B.; HONORÉ, N.; TRUFFOT-PERNOT, C.; BANERJEE, A.; SCHURRA, C.; JACOBS Jr, W.R.; VAN EMBDEN, J. D. A.; GROSSET, J. H.; COLE, S.T. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. **Lancet**. v. 344, p. 293-298, 1994.

HALDAR, S.; CHAKRAVORTY, S.; BHALLA, M.; MAJUMDAR, D.S.; TYAGI, S.J. Simplified detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56(10), p. 1356-1362, 2007.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**. v. 145(6), p. 1301-1308, 1994.

KOLK, A.H.J.; NOORDHOEK, G.T.; DE LEEUW, O.; VAN EMDEN, J.D.A. Mycobacterium smegmatis strain for detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. **J Clin Microbiol**. v. 32(5), p. 1354-1356. 1994.

LEAO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA, G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Printed by Vanden B. Brugues; Belgium, 2004. 37-44p.

MESQUITA, R.A.; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odonto Bras**. v. 15(4), p. 314-319, 2001.

MIRANDA, S.S.; KRITSKI, A.L.; FILLIOL, I.; MABILAT, C.; PANTEIX, G.; DROUET, E. Mutations in the rpoB Gene of Rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Brazil and France. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96(2), p. 247-250, 2001.

MAGANA-ARACHCHI, D.; PERERA, J.; GAMAGE, S.; CHANDRASEKHARAN, V. Low cost in-house PCR for the routine diagnosis of extra pulmonary tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis.** v.12(3), p. 275-280, 2008.

Ministério da Saúde: *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da tuberculose e outras Micobactérias.* Brasília; 2009.

NAGDEV, K.J.; KASHYAP, R.S.; DESHPANDE, P.S.; PUROHIT, H.J.; TAORI, G.M.; DAGINAWALA, H.F. Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100® extracted DNA samples. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 14(8), p. 1032–1038, 2010.

NOGUEIRA, C.L.; WILDNER, L.M.; SENNA, S.G.; ROVARIS, D.; GRUNER, M.F.; JAKIMIU, A.R.; SILVA, R.M.; BAZZO, M.L. Alternative sputum preparation to improve polymerase chain reaction assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 16(6), p. 783-787, 2012.

OTAL, I.; MARTIN, C.; FREBAULT, L.V.V.; THIERRY, D.; GICQUEL, B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using IS6110 as an Epidemiological Marker in Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 29(6), p. 1252-1254, 1991.

POROCA, D.R.; LIMA, A.S.; LIMA, J.F.A.; CRUZ, H.L.A.; MONTENEGRO, R.A.; MELO, F.L.; SCHINDLER, H.C.; MONTENEGRO, L.M.L. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 24(6), p. 716-722, 2009.

RILEY, L. W.; COLFORD J. M.; PAI, M.; FLORES, L. L.; In-House nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. **BMC Microbiology,** v. 5(55), p. 11-9, 2005.

SES. Infecção por Micobactéria não Tuberculosa de Crescimento Rápido.

**Prevenção e Controle.** 2ª Ed. revisada, ampliada. Cuiabá, 2009.

SURESH, N.; ARORA, J.; PANT, H.; RANA, T.; SINGH, U. B. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Archival Ziehl–Neelsen-stained sputum smears. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68 (2), p. 291–295, 2006.

TORREA, G.; LEVEE, G.; GRIMONT, P.; MARTIN, C.; CHANTEAU, S.; GICQUEL, B. Chromosomal DNA Fingerprint Analysis Using the Insertion Sequence IS6110 and the Repetitive Element DR as Strain-Specific Markers for Epidemiological Study of Tuberculosis in French Polynesia. **J Clin. Microbiol**, v. 33(7), p. 1899-1904, 1995.

THIERRY, D.; BRISSON-NOËL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J.L.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **J Clin Microbiol**. v. 28(12), p. 2668-73, 1990.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY F.; BOTTGER E.C.; BODMER T. Fast Identification of *Mycobacteria* to Species Level by Polymerase Chain reaction and Restriction Enzyme analysis. **J Clin Microbiol**. v. 31(2), p.175-178. 1993.

VAN DER ZANDEN, A.G.M.; HOEILMANN, F.G.C.; WELTEVRED, E.F.; SCHOULS, L.M.; VAN EMBDEN, J.D.A. Simultaneous detection and strains differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and stained microscopic preparation. **J Clin Pathol**. v. 51(4), p.209-214. 1998.

VAN DER ZANDEM, A.G.M.; TE Koppele.; VIJE, E.M.; VIJAY BHANU N.; VAN SOOLINGEN, D.; SCHOULS, L.M. Use of DNA Extracts from Ziehl Neelsen Stained Slides for Molecular Detection of Rifampin Resistance and Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin. Microbiol**. v. 41(3), p.1101 – 1108. 2003.

VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. 2012. <http://www.etall.hpg.com.br>.

WINN, W.J.; ALLEN, S; JANDA, W; KONEMAN, E; PROCOP, G; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Diagnóstico Microbiológico. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760 p. (Microbiologia Molecular, 4).

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control 2012**. Genebra, 2012.

YUM, H.; CHOI, S.J. Detection of Mycobacterial DNA Using Nested Polymerase Chain Reaction of Pleural Biopsy Specimes: Compared to Pathologic Findings. **The Kurean Journal of Internal Medicine**. v. 18, p. 89-93, 2003.

ZAMAROLI, L. A.; COELHO, A. G. V.; PEREIRA, C. M.; NASCIMENTO, A. C. C.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E. Estudo descritivo da frequência de micobactérias não tuberculosas na Baixada Santista (SP). (2008). **J Bras Pneumol**. 34, 590-594.

## 6.0 ANEXO

6.1 Anexo A – Resumo aprovado no Internacional Conference of American Thoracic Society 2013.

Abstract 42320

### **Tuberculosis Diagnosis By Amplification Of The IS6110 Insertion Sequence Developed Directly In Smear Slides**

I.N. Almeida<sup>1</sup>, A. Aleixo<sup>2</sup>, W.S. Carvalho<sup>2</sup>, L. Paradizi<sup>2</sup>, A. Figueiredo<sup>2</sup>, L. Jouca<sup>3</sup>, S.S. Miranda<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Minas Gerais - Minas Gerais/BR, <sup>2</sup>Federal University of Minas Gerais - 130100/BR, <sup>3</sup>Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte/BR

**RATIONALE:** The Polymerase Chain Reaction (PCR) has emerged as a promising alternative for TB diagnosis. The obtainment of DNA directly from smear slides is a valuable option to resolve the problem of specimen transportation, as it avoids the risk of bacilli transmission; besides, this characteristic is particularly opportune in places where the geography itself hampers the access to samples. **METHODS:** 287 convenient samples from the laboratory of the Faculty of Medicine/Laboratory of Mycobacteria/Hospital of Clinics of UFMG were selected. The DNA was extracted by the under the following conditions: 7.0 µL of Buffer (10x), 3.0 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.2 µL DNTP (25 mM), 25pmol of each oligonucleotide (IS1- 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3' and IS2- 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') and 0.5 µL (500 U) of Taq DNA Polymerase Invitrogen, in a final volume of 50 µL. The initial DNA denaturation was at 94°C for 2 min, following a total of 40 cycles of 94°C for 30 sec, with every annealing temperature for 2 min, 71°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 10 min. The amplicons were revealed in 2% agarose gel stained by ethidium bromide. The PCR result was then compared with in Lowenstein-Jensen medium. **RESULTS:** The sensitivity and specificity as compared with those of culture were 37.5 e 100%, respectively. The positive predictive value was of 100%, the negative predictive value was of 80.8%, and the accuracy was of 82.8%. **CONCLUSIONS:** The high specificity of *in house* DNA amplification becomes this method, a quick and simple procedure for TB diagnosis; it could also assure the utilization of this method in places in which the bacilloscopy is positive, with a higher prevalence of NTM. Besides to offer biosafety in the transportation, the *in house* DNA amplification could also be utilized in situations where the amount of bacterial cells is insufficient. Therefore, this method is an important tool when associated to clinical criteria, speeds up the treatment and contributes to interrupt the disease transmission chain.



**6.2 Anexo B – Folha de Aprovação no Comitê de Ética**

Parecer nº. ETIC 537/07

**Interessada: Profa. Silvana Spíndola de Miranda**  
**Departamento de Clínica Médica**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, em 07 de março de 2008, a transferência da coordenação do projeto de pesquisa intitulado "**Amplificação da seqüência de inserção IS 6110 diretamente do esfregaço das lâminas coradas para Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR)**", aprovado em 11 de abril de 2007, sob a coordenação de Wania da Silva Carvalho, para a Professora Silvana Spíndola de Miranda.

  
Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP/UFMG

### 6.3 Anexo C - Normas de Publicação da Revista Brazilian Journal of Microbiology

The manuscript should be submitted as **one single WORD file**. This single file should include: the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **Research Papers**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (200 to 250 words)
- Three to five key-words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements (optional)
- References

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The lines in each page of the manuscript should be numbered too. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

*Research papers* and *mini-reviews* consist of 20 pages, including references, tables and figures.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. When authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples: Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that...Do not use capital letters.

#### **SUGGESTED REVIEWERS**

Authors may submit suggestions of reviewers to evaluate the manuscripts. The following information must be provided: reviewer name, email address, and the home institution.

As demais instruções e normas para publicação encontram-se disponíveis no endereço eletrônico: <http://www.biomedcentral.com/bmcresnotes/authors/instructions/shortreport>.

## 6.4 Anexo D - Normas de Publicação da Revista BMC Research Notes

### Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

### Manuscript sections for Short Report

Manuscripts for Short Report submitted to *BMC Research Notes* should be divided into the following sections (in this order):



- Title page
- Abstract
- Keywords
- Findings
- Availability of supporting data
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Endnotes
- References
- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions (if any)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank at the NCBI (GenBank), Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) and the Swiss-Prot Protein Database (Swiss-Prot).

As demais instruções e normas para publicação encontram-se disponíveis no endereço eletrônico: <http://www.biomedcentral.com/bmcresnotes/authors/instructions/shortreport>.

## 6.5 Anexo E – Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado






	<b>FACULDADE DE MEDICINA CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO</b> Av. Prof. Alfredo Balena 190   30130-353 Belo Horizonte - MG - CEP 30130-100 Fone: (31) 34099540 - FAX: (31) 34099541	
---	---	---

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de IBABELA NEVES DE ALMEIDA,** registro número 2011660895. No dia vinte e dois de fevereiro de dois mil e treze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: "Amplificação da sequência de inserção ISB116 diretamente do esfregaço das lâminas coradas para *Bacilo Alcool Ácido Resistente*", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abriu-se a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Sílvia Spindola de Miranda, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Sílvia Spindola de Miranda orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Wânia Silva Carvalho Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Luciene Cardoso Scherer	Instituição: ULBRA	Indicação: <u>APROVADA</u>
Dra. Agdemir Wânia Aleixo	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e levou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2013.

Profa. Sílvia Spindola de Miranda	
Profa. Wânia Silva Carvalho	
Profa. Luciene Cardoso Scherer	
Dra. Agdemir Wânia Aleixo	
Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior/Coordenador	

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

