

INPI

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



Consulta à Base de Dados do INPI

[\[Pesquisa Base Marcas | Pesquisa Base Desenhos | Ajuda? \]](#)» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: PI9900296-5 A2

(22) Data do Depósito: 15/01/1999

(51) Classificação: G01N 33/50

(54) Título: MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

(71) Nome do Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS) / Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde FEEPS (BR/RS)

(72) Nome do Inventor: Arnaldo Zaha / Maria Lucia Rosa Rossetti / [Rosa Dea Sperhacke](#) Leia-me
antes

"MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE
Mycobacterium tuberculosis"

O seguinte relatório descritivo da Patente de Invenção refere-se a um método laboratorial para auxiliar no diagnóstico da tuberculose através da detecção do agente causador, o bacilo *M. tuberculosis*. O teste é baseado na amplificação de DNA do bacilo utilizando a reação em cadeia da polimerase. A pesquisa do DNA, que pode ser feita em qualquer fluido biológico do paciente, possibilita a realização de um teste que fornece resultados mais sensíveis e rápidos que os atuais, auxiliando no diagnóstico precoce da doença.

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que tem acometido pessoas e animais no mundo todo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que morrem anualmente 3 milhões de pessoas no mundo todo em consequência da doença. O número de casos de TB ativa no mundo chega a 60 milhões, com 10 milhões de novos casos por ano. TB é responsável por mais de 6% de todas as mortes e 25% de todas as mortes evitáveis. Existem estimativas que ocorrerão 90 milhões de casos no mundo no ano 2000.

Atualmente a preocupação em torno da TB é ainda maior, em razão do aumento da incidência, mesmo em países desenvolvidos como os Estados Unidos. No Brasil, a cada hora, ocorrem aproximadamente, dez casos novos e morrem quatorze doentes por dia.

A doença pode acometer qualquer órgão, apresentando sintomas bastante variados nem sempre especificamente relacionados com o local da

infecção. Em aproximadamente 85% dos casos de TB o sítio envolvido são os pulmões e nos demais 15%. A TB pode estar localizada em um outro órgão (TB extrapulmonar) ou envolvendo ambos os sítios pulmonar e não pulmonar.

5 A tuberculose humana pode ser causada pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum*. No Brasil, o principal agente causador é o *M. tuberculosis*, sendo raras as doenças pulmonares causadas por outras micobactérias.

10 Os métodos de diagnóstico de TB mais utilizados consistem na pesquisa bacteriológica do bacilo (baciloscopia e cultura), na avaliação da resposta celular do indivíduo (prova tuberculínea) ou na avaliação radiológica do órgão comprometido. No Brasil, os procedimentos adotados são atualmente padronizados em todo o território nacional.

15 A mais promissora técnica para a rápida detecção do *M. tuberculosis* é baseada no método conhecido como "polymerase chain reaction" (PCR). Esse método é constituído de ciclos repetidos de síntese de segmentos de DNA, orientada por oligonucleotídeos ("primers"), para promover uma replicação "in vitro" da seqüência de DNA alvo.

20 Muitos dos ensaios de PCR usam como região alvo uma seqüência de inserção de DNA (IS) repetitiva e específica do complexo *M. tuberculosis*. Esta seqüência de inserção denominada IS 6110 está repetida de 1 a 20 vezes no cromossoma bacteriano.

ESTADO DA TÉCNICA

Existe atualmente no mercado dois testes comerciais: o "Amplicor

Mycobacterium tuberculosis assay” desenvolvido pela Roche Molecular Systems que utiliza a amplificação de uma região do gene do rRNA 16S e o “Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test”(AMTD), da empresa Gen-Probe. O ensaio da Gen-Probe detecta rRNA que está presente em

5 níveis da aproximadamente 2.000 cópias por célula.

Outro fator muito importante para a eficiência na aplicação da técnica de PCR é o método utilizado para a preparação da amostra clínica para a ampliação. Isto inclui a forma de extração do DNA (lise celular e purificação). Uma comparação dos resultados de PCR obtidos da análise de

10 escarros, saliva e água com um número estabelecido de micobactérias, foi realizada em 7 (sete) laboratórios diferentes. Os níveis de sensibilidade variaram de 2 a 90% para as amostras com 10E3 micobactérias. A possível causa dessa diferença, foi a variação nos protocolos. Apesar de todos os laboratórios utilizarem o elemento de inserção IS 6110 como região alvo,

15 cada um tinha seu próprio protocolo de preparação da amostra, amplificação e detecção do produto amplificado.

DESENVOLVIMENTO PROPOSTO

Um protocolo para a detecção de *M. tuberculosis* com metodologia de amplificação de ácidos nucleicos, a partir da amostra clínica, foi

20 estabelecido com o objetivo de aperfeiçoar um teste de diagnóstico de TB mais sensível e rápido que os tradicionais e com custo inferior aos testes moleculares comerciais.

Considerando os problemas existentes com os testes diagnósticos conforme exposto anteriormente e a necessidade de um diagnóstico de

tuberculose mais rápido, a obtenção de um novo método para se detectar o *M. tuberculosis* constitui um avanço importante no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico.

O método de diagnóstico foi desenvolvido a partir da amostra biológica do paciente (escarros, lavados brônquios-alveolares (LBA), líquors, soros, líquidos pleurais e líquidos ascíticos). Uma alíquota de 500 μ l de amostra clínica foi concentrada por centrifugação (12.000 rpm por 10 min). O centrifugado foi lavado com tampão TE (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM (pH 8,0)). O sedimento foi ressuscitado em 50 μ l de TE e fervido por 10 min. Após nova centrifugação de 1min., 30 μ l do sobrenadante foi separado e misturado com 100 μ l de reagente extrator (DNAzol, Gibco-BRL/life Technologies) para isolamento de DNA genômico. Após misturado diversas vezes por inversão, foi adicionado 1 volume de etanol absoluto, misturado por inversão e mantido de 1 à 3 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi então centrifugada a 12.000 rpm por 5 min. e o sobrenadante cuidadosamente removido. O centrifugado foi lavado com álcool 70% o qual foi colocado cuidadosamente nas paredes do tubo e centrifugado rapidamente. O centrifugado foi secado por aproximadamente 10 min. A temperatura ambiente e ressuscitado em 30 μ l de NaOH 8 mM. 10 μ l do sobrenadante foi utilizado na reação de PCR.

As reações de amplificação foram desenvolvidas em volumes de 50 μ l contendo tampão de reação 1X (Tris-Cl 10 mM (pH 8,3); KCL 50 mM; MgCL₂ 3 mM; gelatina 1E-4%, 0,2 μ M de cada "primer" marcados com biotina INS1-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC E INS2-

GCGTAGGGCGTCGGTGACAAA e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, UFRGS). Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador de DNA Stratagene. As reações foram realizadas por 30 ciclos de 2 min a 94°C, 2 min a 72°C. O controle negativo da reação foi utilizado substituindo-se o DNA por H₂O MiliQ. No controle positivo foi utilizado um DNA do complexo *M. tuberculosis* previamente positivo por PCR.

Método de detecção de *M. tuberculosis* em membrana de náilon

1. PREPARO DA SONDA E DA MEMBRANA PARA O TESTE

Para a detecção de *M. tuberculosis* em membrana de náilon, uma sonda de DNA foi preparada a partir de um produto amplificado com DNA de *M. tuberculosis*, como anteriormente descrito e fixada na membrana. O produto amplificado para a sonda era um fragmento de DNA de 132 pb de *M. tuberculosis* utilizando os "primers SK1 AACGGCTGATGACCAAA; SK2 GGTTAGGTGCTGGTGGTCC, referentes à região interna IS, correspondendo respectivamente ao nucleotídeo 667 até 686 a ao nucleotídeo 779 até 798. As reações de amplificação foram desenvolvidas em volumes de 50 μ l contendo tampão de reação 1X(-Tris-Cl 10mM (pH8,3); - KCl 50mM; - MgCl₂ 3 mM; - gelatina 1E-4%), 0,2 μ M de cada "primer" e 1 a 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, UFRGS). Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador de DNA Stratagene por 30 ciclos de 2 min a 94°C, 2 min a 58°C e 2 min a 72°C. O fragmento amplificado foi purificado em resina de "Sephacryl" (S-400, Pharmacia). Uma alíquota correspondendo à 50 ng de amostra de sonda foi desnaturada a 100°C durante 5 min e fixada à membrana de náilon (Biodyne B, GIBCO-BRL), utilizando solução

0,4 M de NaOH durante 20 min e SSC 5X por 1 min.

As membranas então foram tratadas com solução A (SSC 5X, SDS 0,1%, 3% BSA - soro de albumina bovina) por 30 min à 65°C, para um volume total de 0,2 ml/cm² de membrana. A solução foi removida e
5 adicionada uma solução B (SSC 5X, SDS 0,1%, Sulfato de Dextran 2,5%), para um volume total de 0,1 ml/cm² de membrana.

2- A DETECÇÃO DE DNA DE M. TUBERCULOSIS UTILIZANDO A MEMBRANA

Foram adicionados à membrana contendo solução B, quinze microlitros previamente desnaturados (100°C por 5 min) dos produtos de
10 PCR amplificados a partir das amostras clínicas com "primers" (marcados com biotina) IS1 e IS2, durante 1 hora à 65°C. Após, as membranas foram submetidas a 3 diferentes condições de lavagens:

- 1ª) SSC 2X, 0,1% SDS à temperatura ambiente durante 5 min (repetindo mais uma vez);
- 15 2ª) SSC 0,2X, 0,1% SDS à temperatura ambiente durante 5 min;
- 3ª) SSC 0,16X, 0,1% SDS à 65°C durante 10 min.

Após as lavagens as membranas foram colocadas em solução 3% de BSA durante 30 min.

Para a detecção do DNA, foi utilizado um conjunto (fosfatase alcalina ligado à estreptavidina) que liga ao produto de PCR com biotina.
20 Um volume deste conjugado foi adicionado às membranas, 1µl da solução estoque (1mg/ml) para cada 1 ml do tampão 1 (0,1 M tris-HCL (pH 7,5), 0,15M NaCl). Por 15 min, com agitação de 5 em 5 min, e ocasionalmente pipetando a solução sobre os filtros. A solução foi retirada fazendo-se duas

lavagens de 15 min cada, com tampão 1 utilizando, no mínimo 20 à 40 vezes o volume do conjugado e o tampão empregado anteriormente. Após fez-se uma lavagem por 10 min em tampão 2 (0,1M tris-HCl (pH 9,5), 0,1M NaCl, 50 mM MgCl²). Todas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente.

5

A visualização da cor (teste positivo) foi feita com 7,5 ml uma solução de detecção para cada 100 cm² de membrana. A solução de detecção foi preparada com 33µl de NBT (nitroblue tetrazolium) e 25 µm de BCPI (4-bromo-5-chloro-3-indolyphosphate) adicionados ao tampão 2. A formação de um sinal de cor púrpura indica a hibridização do produto de PCR com sonda fixada na membrana. Esta reação foi incubada à temperatura de 37°C por 5 a 10 min. A reação pode ser interrompida através de lavagens com água deionizada.

10

Reivindicações:

1- "MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis*", desenvolvido a partir da amostra biológica do paciente (escarros, lavados brônquios-alveolares (LBA), líquors, soros, líquidos pleurais e líquidos ascíticos), CHARACTERIZADO POR tomar uma alíquota de 500 μ l de amostra clínica sendo concentrada por centrifugação (12.000 rpm por 10 min), onde o centrifugado foi lavado com tampão TE (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM (pH 8,0), sendo que o sedimento foi ressuspenso em 50 μ l de TE e fervido por 10 min, onde, após nova centrifugação de 1min, 30 μ l do sobrenadante foi separado e misturado com 100 μ l de reagente extrator (DNAzol, Gibco-BRL/life Technologies) para isolamento de DNA genômico, sendo que, após ser misturado diversas vezes por inversão, foi adicionado 1 volume de etanol absoluto, misturado por inversão e mantido de 1 à 3 minutos a temperatura ambiente, sendo a mistura centrifugada a 12.000 rpm por 5 min. e o sobrenadante cuidadosamente removido, sendo o centrifugado lavado com álcool 70%, o qual foi colocado cuidadosamente nas paredes do tubo e centrifugado rapidamente, sendo o centrifugado secado por aproximadamente 10 min. a temperatura ambiente e ressuspenso em 30 μ l de NaOH 8 mM, onde 10 μ l do sobrenadante foi utilizado na reação de PCR.

2- "MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis*" em membrana de náilon, onde uma sonda de DNA foi preparada a partir de um produto amplificado com DNA de *M. tuberculosis*, como anteriormente descrito e fixada na membrana, onde o

produto amplificado para a sonda era um fragmento de DNA de 132 pb de *M. tuberculosis* utilizando os "primers SK1 AACGGCTGATGACCAAA; SK2 GGTTAGGTGCTGGTGGTCC, referentes à região interna IS, correspondendo respectivamente ao nucleotídeo 667 até 686 a ao nucleotídeo 779 até 798, onde as reações de amplificação foram desenvolvidas em volumes de 50 μ l contendo tampão de reação 1X(-Tris-Cl 10mM (pH8,3); - KCl 50mM; - MgCl₂ 3 mM; - gelatina 1E-4%), 0,2 μ M de cada "primer" e 1 a 2,5 U de Taq DNA polimerase (Cenbiot, UFRGS), com todas as amplificações realizadas em um termociclador de DNA Stratagene por 30 ciclos de 2 min a 94°C, 2 min a 58°C e 2 min a 72°C, sendo o fragmento amplificado purificado em resina de "Sephacryl" (S-400, Pharmacia), com uma alíquota correspondendo à 50 ng de amostra de sonda sendo desnaturada a 100°C durante 5 min e fixada à membrana de náilon (Biodyne B, GIBCO-BRL), utilizando solução 0,4 M de NaOH durante 20 min e SSC 5X por 1 min, sendo que, então, as membranas foram tratadas com solução A (SSC 5X, SDS 0,1%, 3% BSA - soro de albumina bovina) por 30 min à 65°C, para um volume total de 0,2 ml/cm² de membrana, sendo a solução removida e adicionada uma solução B (SSC 5X, SDS 0,1%, Sulfato de Dextran 2,5%), para um volume total de 0,1 ml/cm² de membrana, sendo CARACTERIZADO POR serem adicionados à membrana contendo solução B, quinze microlitros previamente desnaturados (100°C por 5 min) dos produtos de PCR amplificados a partir das amostras clínicas com "primers" (marcados com biotina) IS1 e IS2, durante 1 hora à 65°C sendo que após isto, as membranas são submetidas a 3 diferentes condições de lavagens, sendo

que após as lavagens as membranas foram colocadas em solução 3% de BSA durante 30 min:

1ª condição) SSC 2X, 0,1% SDS à temperatura ambiente durante 5 min (repetindo mais uma vez); 2ª condição) SSC 0,2X, 0,1% SDS à temperatura

5 ambiente durante 5 min; 3ª condição) SSC 0,16X, 0,1% SDS à 65°C durante 10 min , sendo que, para a detecção do DNA, foi utilizado um conjunto (fosfatase alcalina ligado à estreptavidina) que liga ao produto de

PCR com biotina, onde um volume deste conjugado é adicionado às membranas, 1 μ l da solução estoque (1mg/ml) para cada 1 ml do tampão

10 1 (0,1 M tris-HCL (pH 7,5), 0,15M NaCl), por 15 min, com agitação de 5 em 5 min, e ocasionalmente pipetando a solução sobre os filtros, sendo a

solução retirada fazendo-se duas lavagens de 15 min cada, com tampão 1 utilizando, no mínimo 20 à 40 vezes o volume do conjugado e o tampão

15 empregado anteriormente, sendo que após isto, fez-se uma lavagem por 10 min em tampão 2 (0,1M tris-HCl (pH 9,5), 0,1M NaCl, 50 mM MgCl₂), sendo

todas as etapas realizadas à temperatura ambiente e com a visualização da cor (teste positivo) feita com 7,5 ml uma solução de detecção para cada

100 cm² de membrana, sendo a solução de detecção preparada com 33 μ l de NBT (nitroblue tetrazolium) e 25 μ m de BCPI (4-bromo-5-chloro-3-

20 indolyphosphate) adicionados ao tampão 2, onde a formação de um sinal de cor púrpura indica a hibridização do produto de PCR com sonda fixada

na membrana, sendo esta reação incubada à temperatura de 37°C por 5 a 10 min.

Resumo:

“MÉTOD DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE
Mycobacterium tuberculosis”

Trata-se de um método para detecção de *Mycobacterium*
5 *tuberculosis* utilizando a reação em cadeia da polimerase caracterizada, pela
pesquisa de DNA de bacilo de *M. tuberculosis* causador da tuberculose,
utilizando um reagente extrator. Este método auxiliar o diagnóstico da
tuberculose pela detecção de DNA do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*,
causador da doença e presente nos fluidos biológicos do doente. Este DNA
10 é purificado utilizando-se um reagente extrator e após, amplificado pela
técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos
complementares a região IS 6110 presente no genoma deste microrganismo.
A detecção dos produtos amplificados é feita em gel de agarose 2% e
hibridização em membrana de náilon.