

352

UTILIZAÇÃO DE GM-PCR E PCR DOT-BLOT COLORIMÉTRICO NA DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO PLEURAL. Karina Salvador, Rosa Dea Sperhackle, Morrys Casagrande Kaisermann, Arnaldo Zaha, Maria Lucia Rosa*Rossetti (orient.) (UFRGS).*

O *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb) causador da tuberculose é identificado em até seis semanas através do isolamento em cultura, portanto métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) abriram enormes perspectivas para se obter um diagnóstico rápido da tuberculose. O objetivo deste trabalho foi padronizar um método de detecção de M. tb por PCR dot-blot colorimétrico e comparar com o método da detecção em gel de agarose (GM-PCR) descrito por Rossetti et al., 1997. Um protocolo de detecção colorimétrico utilizando a seqüência de inserção IS6110 (primers IS1 e IS2 biotilado) como alvo para amplificação do DNA genômico foi padronizado. Uma sonda amplificada com primers SK (SK1 e SK2) interno a seqüência de inserção IS6110 foi transferido por dot-blot para membrana de náilon e fixado com NaOH 0,4 %. Após a membrana foi hibridizada com o produto de amplificação biotilado. A utilização de um conjugado streptavidina fosfatase alcalina, e os seus substratos BCIP (5-Bromo-4Cloro-3-Indoil fosphate) e NBT (Nitro Blue Tetrazolium) resultaram em um precipitado de coloração púrpura. Um controle interno foi incluído para monitorar a presença de possíveis inibidores. Foram analisadas 64 amostras de líquido pleural em gel de agarose 2 %, 48 provenientes de pacientes com diagnóstico de tuberculose pleural e 16 amostras usadas como controles negativos. A sensibilidade e a especificidade foram de 93,7 e 87,5%, respectivamente, na detecção em gel de agarose. O PCR dot-blot colorimétrico padronizado demonstrou ser um método rápido na detecção do M. tb, portanto as amostras de líquido pleural estão sendo testadas na metodologia padronizada e posteriormente comparadas com os resultados obtidos com a técnica em gel de agarose. (FAPERGS/IC).