

P 4359

Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de pcr em tempo real para o complexo *Mycobacterium Tuberculosis*Júlia Souza da Rocha, Fernanda de Paris, Rodrigo Minuto Paiva
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Introdução: As bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* têm crescimento lento e alto poder infectocontagioso. Causam principalmente tuberculose pulmonar, mas podem ser responsáveis por meningites e infecções em outros sistemas, que são mais comumente identificadas em pacientes imunocomprometidos. O desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico destas bactérias tem grande importância no auxílio ao controle da doença. O uso de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) permite a identificação do DNA do bacilo com alta sensibilidade e especificidade. A menor quantidade de analito que pode ser detectada em um procedimento, dentro de um limite de confiança, é o limite mínimo de detecção (LMD) de uma técnica. Quando os limites de confiança são estabelecidos, a probabilidade de erros falso-positivo e falso-negativo é considerada aceitável. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com o objetivo de determinar o limite de detecção para a técnica de qPCR para o complexo *M. tuberculosis*, complementando a validação do ensaio. **Métodos:** Foram feitas diluições de 1 e 10 cópias/ μL de DNA bacteriano a partir do controle comercial quantificado 1,08 X10⁴ cópias/ μL (Viracell®, Granada, Espanha). As diluições foram submetidas a 20 ensaios de amplificação por qPCR (Kit Platinum qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen™), utilizando fragmentos de DNA marcados com fluorescência específicos para a hibridização na região de interesse, as sondas (TaqMan®). **Resultados:** Dos 20 ensaios realizados, 19 apresentaram resultado positivo, ou seja, amplificação do alvo. O limite mínimo de detecção encontrado foi de 10 cópias/ μL em 95% das replicatas, sendo que o menor CT de amplificação foi 33,2 e o maior 41,9. **Discussão:** O ensaio demonstrou um aumento da sensibilidade analítica quando comparado ao limite de detecção do Nested-PCR utilizado anteriormente pelo laboratório (25 cópias/ μL). O ensaio se tornou também mais específico, pois utiliza dois métodos de identificação – sonda e primer – da região alvo do DNA. Além disso, a determinação do CT de amplificação torna o teste menos subjetivo e, portanto, mais confiável. **Palavras-chaves:** *Mycobacterium Tuberculosis*, PCR em tempo real, limite mínimo de detecção.