

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
para Identificação do *Mycobacterium tuberculosis* em
Pacientes com Suspeita de Tuberculose Pleural**

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, da Universidade de São Paulo,
Para obtenção do título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Clínica
Médica.

Área de concentração: Clínica Médica

Aluna-Danielle Malta Lima

Orientador-Prof. Dr. Benedito Antônio
Lopes da Fonseca

Apoio-Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
-FAPESP-

Ribeirão Preto
2001

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP.

Lima, Danielle Malta

Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para
Identificação do *Mycobacterium tuberculosis* em Pacientes com
suspeita de Tuberculose Pleural, 2001.

82 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Clínica Médica.

Orientador: Fonseca, Benedito Antônio Lopes.

1. Tuberculose Pleural. 2. Diagnóstico.

***"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito...
Não somos o que devíamos ser.
Não somos o que iremos ser.
Mas, graças a Deus,
não somos o que éramos".***

Martin Luther King

DEDICATÓRIA,

Aos meus pais, Maria Helena, Everaldo (*in memorian*) e ao meu segundo pai, Zelci, por estarem sempre prontos para me acolher e apoiar, dando conforto, coragem e carinho em toda a minha jornada.

Aos meus irmãos - Jana, Rafa, Guiga e a minha afilhada Marina, pelo apoio, amor e carinho.

Ao Keny, por tanto carinho e amor, pelo incondicional estímulo, pela disponibilidade em todas as etapas deste trabalho e por me fazer feliz.

DEDICATÓRIA ESPECIAL,

Ao **Professor Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca** que foi muito mais que um orientador, obrigada pela orientação, paciência, compreensão e amizade no decorrer desta jornada.

À **FAPESP - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela paz e conforto que me concedeu nos momentos de dificuldades e angústias.

A todos os professores do curso de pós-graduação, pelo aprendizado proporcionado.

A toda a equipe de médicos, residentes e funcionários dos ambulatórios da pneumologia, UETDI e da enfermaria da MI, pela colaboração em toda a coleta do material para este trabalho.

A Maria Julieta e Maria de Lourdes, do Instituto Adolfo Lutz-Sorocaba, pelo aprendizado na técnica ADA e pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Sérgio, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Virologia - Roberto, Paula, Alessandra Fonseca, Alessandra Ruiz, Gilda, Teresa, Cristiane, Eguinair, Soraia, Victor, Luciana, Mariana.

Às minhas amigas - Flávia, Carol, Audrey, Andréa Leone - pela amizade e apoio durante toda essa jornada.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, pela amizade e carinho.

A minha querida vó Iracine, as minhas tias Enoli, Elenir, Lúcia e a minha prima Renata, pelo incentivo em todas as etapas deste trabalho.

A todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

***“ Cada pessoa que passa em nossas vidas,
passa sozinha, mas não vai só, nem nos deixa
só; leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesma”.***

Muito obrigada

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

I. INTRODUÇÃO	1
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A TUBERCULOSE	2
2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	6
2.1. MICROSCOPIA DIRETA	6
2.2. CULTURA	7
2.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO RÁPIDA DE CULTIVOS AUTOMATIZADOS	9
3. TESTE TUBECULÍNICO	11
4. DETERMINAÇÃO DA ADENOSINA DEAMINASE (ADA)	12
5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	13
II. OBJETIVOS	20

III. MATERIAIS E MÉTODOS	22
1. AMOSTRAS	23
2. PACIENTES	23
3. DEFINIÇÃO DE CASO DE TUBERCULOSE	24
4. TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS	25
5. TÉCNICA DE EXTRAÇÃO E SÍNTESE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	25
5.1 EXTRAÇÃO DO DNA	25
6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	25
7. ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR	25
8. DETERMINAÇÃO DA ADENOSINA DEAMINASE	30
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSSÃO	47
VI. CONCLUSÃO	63
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Seqüência dos *primers* usados na PCR para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* _____ 27
- TABELA 2.** Seqüência dos *primers* usados na PCR para detecção de *M. avium*, *M. intracellulare* e Gênero *Mycobacterium* _____ 29
- TABELA 3.** Comparação dos resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN nos pacientes _____ 38
- TABELA 4.** Comparação dos resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN nas amostras _____ 41
- TABELA 5.** Resultados dos 16 pacientes com diagnóstico de tuberculose em amostras de líquido pleural _____ 46

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Esquema da seqüência de inserção IS6110 do complexo *M. tuberculosis*. _____ 27
- FIGURA 2.** Gel de agarose a 3%, mostrando controle positivo e negativo para tuberculose pleural e 2 amostras positivas. _____ 44

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Comparação dos resultados de sensibilidade nos pacientes _____	<u>39</u>
GRÁFICO 2. Comparação dos resultados de especificidade nos pacientes _____	<u>39</u>
GRÁFICO 3. Comparação dos resultados de acuidade nos pacientes _____	<u>40</u>
GRÁFICO 4. Comparação dos resultados de sensibilidade nas amostras _____	<u>42</u>
GRÁFICO 5. Comparação dos resultados de especificidade nas amostras _____	<u>42</u>
GRÁFICO 6. Comparação dos resultados de acuidade nas amostras _____	<u>43</u>

RESUMO

O presente estudo tem como principal objetivo o emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR) na elucidação da etiologia dos derrames pleurais dos pacientes com suspeita de pleurite tuberculosa, comparando-o com as técnicas diagnósticas disponíveis na atualidade.

O diagnóstico da tuberculose pleural costuma ser feito por meio dos dados clínicos e radiológicos, teste tuberculínico, exames bioquímicos, microbiológicos, e citológicos do líquido pleural e da histopatologia de fragmento de pleura obtido por punção-biópsia. Ainda assim estes métodos apresentam muitas limitações, dentre as quais a baixa sensibilidade e o longo período necessário para a confirmação do diagnóstico.

Estudamos 58 amostras de 45 pacientes. Destes, 16 pacientes tiveram diagnóstico clínico ou laboratorial confirmado de tuberculose, totalizando 22 amostras. Consideramos como caso de tuberculose todos os pacientes com baciloscopia, cultura ou histopatológico positivos no líquido pleural ou outro material biológico, ou que tenham apresentado melhora clínica após a introdução do tratamento empírico.

Das 22 amostras com o diagnóstico de tuberculose, a PCR foi positiva em 6 amostras de 6 pacientes. A reação foi positiva em 1 amostra de um paciente em que o diagnóstico de tuberculose foi descartado. A sensibilidade, especificidade e os valores preditivo positivo e negativo nos 16 pacientes com diagnóstico de tuberculose foram 31,3%, 96,6%, 83% e 71% respectivamente.

A PCR, apesar de ter apresentado uma baixa sensibilidade, demonstrou uma especificidade ótima em relação aos métodos convencionais.

Esta técnica pode ter utilidade como método complementar às técnicas disponíveis, na tentativa de obter um diagnóstico mais precoce e preciso nos casos de tuberculose pleural.

SUMMARY

The present study evaluates the use of the polymerase chain reaction (PCR) to confirm the etiology of pleural effusions in patients with suspicion of pleural tuberculosis, comparing it to the current available techniques.

The diagnosis of pleural tuberculosis is made through the combination of clinical data, radiologic findings, biochemical, microbiological and cytological examination of the pleural fluid and by the pathology of pleural fragment obtained by biopsy. However, these methods present a lot of limitations, including a low sensitivity and a long incubation period to confirm the diagnosis by culture.

We studied 58 samples of 45 patients with pleural effusion. Of these, 16 patients had clinical diagnosis or confirmed by laboratory, in a total of 22 samples. We defined as case of tuberculosis all patients with culture or positive pathology in the fluid pleural or other biological material and those with clinical improvement after empirical treatment.

Of the 22 samples with the tuberculosis diagnosis PCR was positive in 6 samples of 6 patients. The reaction was positive in a sample of a patient whose diagnosis of tuberculosis was later discarded. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value in the 16 patients with tuberculosis diagnosis were 31,3%, 96,6%, 83% and 71% respectively.

In spite of having presented a low sensitivity, PCR specificity was greater than the conventional methods.

This technique can be useful as an additional method to the available techniques, in the attempt of obtaining a more precocious and precise diagnosis in the cases of pleural tuberculosis.