

III. *Materiais e Métodos*

1.AMOSTRAS

No período de Março de 2000 a Julho de 2001, recebemos 58 amostras de 45 pacientes com suspeita clínica de pleurite tuberculosa e com derrame pleural, que foram rotineiramente submetidos a punção pleural, a fim de avaliar as características do mesmo e determinar a sua etiologia. De cada paciente foram coletados 50 ml do líquido pleural que, após a coleta, foi mantido à temperatura de 4°C. Este material foi encaminhado em recipiente com gelo ao Laboratório de Virologia Molecular da FMRP-USP. As amostras eram provenientes de pacientes internados ou em atendimento ambulatorial no hospital.

2. PACIENTES

Para este estudo foram analisados pacientes com suspeita clínica de tuberculose pleural, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (HC-FMRP-USP). Os pacientes escolhidos para participar do estudo deveriam apresentar manifestações clínicas tais como tosse seca, dispnéia e emagrecimento durante vários meses, com sinais radiológicos de acometimento pulmonar acompanhado de derrame pleural. Foram obtidos os consentimentos verbais destes pacientes referentes à participação neste estudo, e os resultados foram encaminhados ao médico responsável pelo atendimento, através do prontuário médico, assim que o resultado de cada paciente ficou pronto.

Este estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e aprovado, de acordo com o processo nº2116/2000.

3. DEFINIÇÃO DE CASO DE TUBERCULOSE

Com o objetivo de criar um parâmetro para comparação entre as diferentes técnicas em estudo, utilizamos o conceito de definição de caso de tuberculose. Consideramos como caso de tuberculose todos os pacientes com baciloscopia, cultura ou exame histopatológico positivos no líquido pleural ou outro material biológico. Ainda consideramos como caso de tuberculose os pacientes com suspeita clínica e/ou radiológica que responderam positivamente à prova terapêutica com as drogas tuberculostáticas. Consideramos a resposta terapêutica indicativa de tuberculose, quando houve melhora consistente dos parâmetros clínicos e radiológicos. A suspeita clínica foi definida como a presença de sintomas de tosse, febre, expectoração, sudorese noturna, perda de peso e dor torácica, especialmente se tivessem durações de quatro ou mais semanas.

A esse conjunto de critérios usados na definição de caso de tuberculose definimos como **diagnóstico abrangente de tuberculose**.

4. TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

No Laboratório de Virologia Molecular da FMRP-USP, as amostras foram processadas imediatamente após a sua chegada e foi retirada uma alíquota do líquido pleural proveniente destes pacientes, antes de centrifugar.

O líquido pleural proveniente destes pacientes foi submetido a algumas técnicas laboratoriais com o intuito de obter uma maior concentração das amostras e, assim, concentrar os bacilos, numa tentativa de melhorar a sensibilidade do método. As amostras foram submetidas à centrifugação a 3500rpm por um período de 30 minutos. Após o procedimento, a amostra foi submetida à filtração, utilizando uma membrana microporosa de nitrato de celulose (Nalgene[®] Analytical Filter Unit), com poros de 0,2µm.

5. TÉCNICA DE EXTRAÇÃO E SÍNTESE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

5.1. EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada no material total, no sobrenadante e no sedimento. O método utilizado para a extração do DNA foi o Kit da QIAGEN[®] (QIAamp Blood Kit). Para processamento das amostras, seguimos as especificações do protocolo que acompanha o kit da QIAGEN[®], conforme as instruções do fabricante.

6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para realização deste projeto utilizamos a reação em cadeia da polimerase, que já foi padronizada neste laboratório, e *primers* específicos

para a amplificação do DNA de *M. tuberculosis* (BOLLELA, 1999). Os *primers* (**TABELA 1**) usados neste trabalho (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) foram originalmente descritos por EISENACH, *et al.* (1990) e amplificam uma porção da seqüência de inserção repetitiva IS6110 do genoma das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (**FIGURA 1**). Os produtos da amplificação da PCR são fragmentos de 123 pares de base.

Para tanto, 5 μ l do DNA foram usados para a reação em cadeia da polimerase (PCR), numa reação de 50 μ l, contendo 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo, tampão da *Taq* DNA polimerase e 20 pmol de cada *primer*.

Como controle positivo, foi utilizado DNA extraído de cultura de escarro, em meio de Löwenstein-Jensen, em que houve crescimento de *Mycobacterium* sp, mas uma contaminação não permitiu sua identificação. Este material foi submetido à técnica de PCR para *M. tuberculosis*, já padronizada em nosso laboratório. Esta cultura contaminada foi obtida no laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. A amplificação consistiu de uma fase inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos com 1 minuto a 94°C; 2 minutos a 65°C; e 1 minuto a 72°C, em cada ciclo. Ao final, as amostras foram mantidas à temperatura de 72°C por 10 minutos para a polimerização dos fragmentos incompletos. Um quinto do volume da mistura foi então analisado por eletroforese em gel de agarose a 3%. O gel foi corado com uma solução de brometo de etídeo [1 μ g/ml], visualizado em luz ultravioleta e digitalizado pelo UVP® Vision Works. O tamanho do “amplicon” (123pb) foi comparado com um marcador de DNA (50bp DNA

ladder - GIBCO®) onde cada fragmento é separado por uma diferença de 50pb (FIGURA 2).

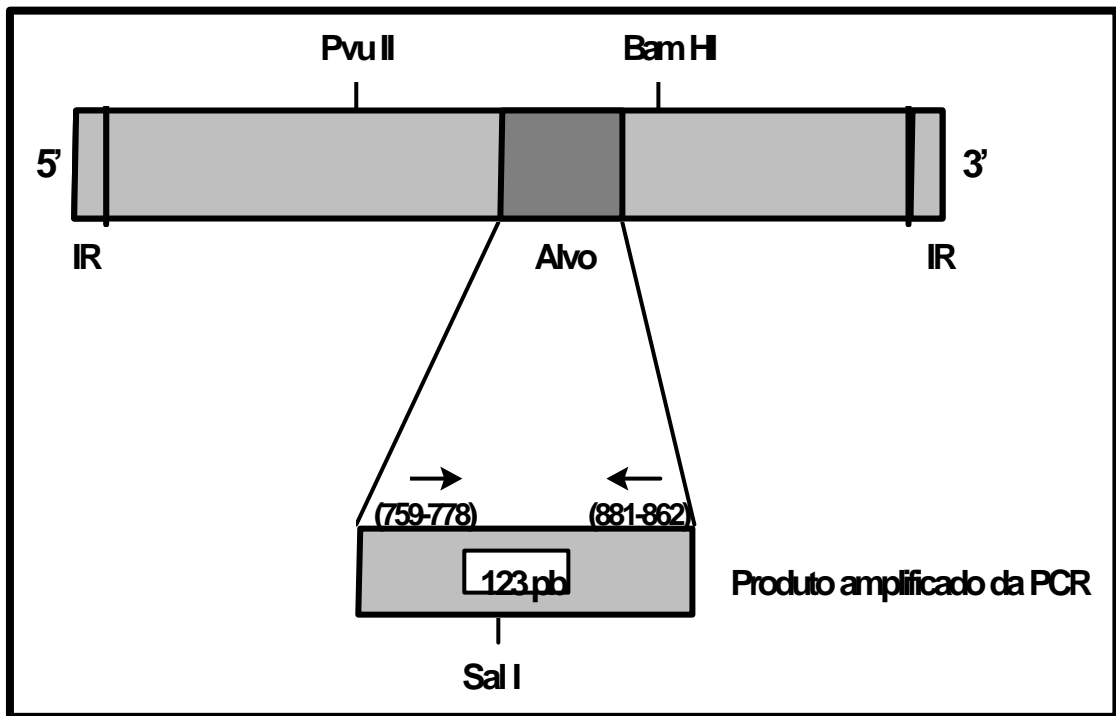


FIGURA 1- Seqüência de inserção IS6110, do complexo *M.tuberculosis*, com sítios de enzimas de restrição e região alvo da amplificação pelos *primers*, mostrando, abaixo, a posição dos *primers* específicos e o fragmento amplificado (123 pares de base-pb) (EISENACH, *et al.*, 1993).

TABELA 1- Seqüência dos *primers* usados na PCR (EISENACH, *et al.*, 1990).

TB1(Sense) → 5' – CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG – 3'
TB2 (Anti-Sense) → 5' – CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG – 3'

Complementamos alguns resultados com exames adicionais, realizando o exame de PCR nas amostras em que na cultura houve a identificação do gênero *Mycobacterium*, sem identificação da espécie. Nestas amostras, utilizamos *primers* específicos para o gênero *Mycobacterium* e para as espécies *M. avium* e *M. intracellulare*. Utilizando-se a mesma técnica descrita e *primers* específicos descritos por CHEN, *et al.* (1996) (TABELA 2).

A PCR foi realizada nas mesmas condições para o gênero *Mycobacterium*, *M. avium* e *M.intracellulare*, com as seguintes etapas: uma etapa inicial, constituída de aquecimento das amostras a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação, onde a desnaturação das fitas de DNA foi a 94°C por 1 minuto; a ligação dos primers ao DNA a uma temperatura de 55°C por 2 minutos e a extensão dos produtos amplificados (amplicons) a 72°C por 6 minutos e, depois de terminados os 40 ciclos, o produto foi mantido a uma temperatura de 72°C por 10 minutos e, então, conservado a 4°C. Os amplicons foram detectados por eletroforese em agarose a 3% em tampão TBE 1X (0.045M Tris-borate; 0.001M EDTA), corados com brometo de etídeo a 1µg/ml, visualizados em luz ultravioleta e digitalizados pelo UVP® Vision Works. Como controle positivo, foi utilizado DNA extraído de cultura de escarro, em meio de Löwenstein-Jensen, em que houve crescimento de *Mycobacterium* sp, mas uma contaminação não permitiu sua identificação. Este material foi submetido à técnica de PCR para *M. avium* e *intracellulare*, já padronizada em nosso laboratório. Esta cultura contaminada foi obtida no laboratório de Microbiologia do Hospital

das Clínicas de Ribeirão Preto. O amplicon específico para o *M. avium* e *M. intracellulare* produz um amplificado de 1.3 Kb e o gênero 978 pb.

TABELA 2- Seqüência dos *primers* usados na PCR para o gênero *Mycobacterium* e para as espécies *avium* e *intracellulare* (CHEN, *et al.*, 1996).

	Seqüência
<i>Primers para M. avium</i>	Sense – 5'- CCT CAA gAC gCA TGT CTT CT- 3' Anti-sense – 5' - ACA gCT CCC TCC CAA AAg gg - 3'
<i>Primers para M. intracellulare</i>	Sense – 5'- CCT TTA ggC gCA TgT CTT TA - 3' Anti-sense – 5'- gCA CAg CTC CCT CCC AAg gg - 3'
<i>Primers para Gênero Mycobacterium</i>	Sense – 5'- ATg CAA gTC GAA Cgg AAA gg - 3' Anti-sense – 5'- TgC ACA CAg gCC ACA Agg gA -3'

7. ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR

A análise da sensibilidade, especificidade, acuidade e valores preditivo positivo e negativo da baciloscopia, cultura, histopatológico, ADA e PCR foram calculados tomando-se como padrão-ouro o diagnóstico abrangente, levando em consideração a definição de caso de tuberculose. A sensibilidade diagnóstica foi definida como a capacidade do teste em ser positivo, ou detectar a doença quando ela está realmente presente. A especificidade diagnóstica foi entendida como a capacidade do teste em ser negativo, quando a doença em estudo está ausente na pessoa testada. A

acuidade refere-se ao grau em que o exame é apropriado para medir o verdadeiro valor daquilo que é medido, observado ou interpretado. A validade ou acuidade informa se os resultados representam a "verdade" ou quanto se afastam dela.

A análise foi feita considerando o resultado dos testes diagnósticos nas 58 amostras e para os 45 pacientes. Quando avaliamos o teste diagnóstico nas amostras, cada espécime é contado uma vez, mesmo que tenhamos vários espécimes por paciente. Na avaliação do teste nos pacientes, agrupamos todos os espécimes coletados para cada paciente e consideramos o teste positivo para um determinado caso se, em pelo menos um dos espécimes, o resultado foi positivo.

Realizamos a comparação entre a baciloscopia, cultura, histopatológico, dosagem da ADA e a PCR, utilizando como parâmetro o diagnóstico abrangente de tuberculose. Enfatizamos que os resultados da PCR e dosagem da ADA não foram utilizados como critérios de definição de caso.

8. DETERMINAÇÃO DA ADENOSINA DEAMINASE (ADA)

O método utilizado foi descrito por Giusti, (1974) e adaptado pelo Instituto Adolfo Lutz, de Sorocaba.

A adenosina deaminase é um enzima conversora da adenosina em inosina. Seu principal papel bioquímico é o de catalisar a transformação da adenosina em inosina, com a conseqüente liberação de amônia. A atividade da ADA foi medida pela determinação da amônia formada durante os 60

minutos de incubação do líquido pleural com o tampão de adenosina a 37°C. A amônia reage em meio alcalino, com o fenol e hipoclorito de sódio, em presença do catalisador nitrosilpentaciano ferrato (III) de sódio, levando a formação de um indofenol de coloração intensamente azul. A concentração da amônia é diretamente proporcional a absorbância do indofenol, determinada na leitura em aparelho de espectrofotometria.

O teste foi realizado conforme o descrito a seguir: Primeiramente os tubos foram marcados da seguinte forma branco, padrão, paciente e controle do paciente.

No branco, foram adicionados 500µl de tampão fosfato; no padrão, foram adicionados 500µl de sulfato de amônio; no tubo do paciente foram adicionados 500µl de tampão de adenosina mais 20µl do líquido pleural; e no tubo controle do paciente foram adicionados 500µl de tampão de adenosina. Após, os tubos foram agitados e incubados a 37°C, por 60 minutos.

Depois da incubação, foram adicionados 1,0 ml de fenol e 1,0ml hipoclorito de sódio em todos os tubos. Apenas no tubo controle do paciente é que foram adicionados 20µl do líquido pleural. Posteriormente, foram agitados novamente e incubados a 37°C por 30 minutos e medidas suas absorbâncias entre 630nm, zerando o aparelho com branco.

Neste trabalho consideramos o cut-off de 40U/L, conforme um trabalho realizado no Brasil por CESTARI, *et al.* (1987).

O cálculo da atividade da ADA foi determinada pela densidade óptica do paciente menos a densidade óptica do controle do paciente. Este

resultado foi dividido pela densidade óptica do padrão e posteriormente multiplicado por 50, que é o valor da curva-padrão, obtendo um resultado em unidades/litro.