

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**CONTRIBUIÇÃO DA DETECÇÃO DE DNA DE
Mycobacterium tuberculosis EM DIFERENTES AMOSTRAS
PARA O DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE PLEURAL**

FRANCIELE ROSSO

Porto Alegre, outubro de 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**CONTRIBUIÇÃO DA DETECÇÃO DE DNA DE
Mycobacterium tuberculosis EM DIFERENTES AMOSTRAS
PARA O DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE PLEURAL**

FRANCIELE ROSSO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Co-orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, outubro de 2008.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O projeto recebeu financiamento do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) Edital 07/2006 da FEPPS.

“Se você está percorrendo o caminho dos seus sonhos, comprometa-se com ele. Mesmo que precise dar passos incertos, mesmo que saiba que pode fazer melhor do que está fazendo. Se você aceitar suas possibilidades no presente, com toda certeza vai melhorar no futuro, mas se negar suas limitações, jamais se verá livre delas. Enfrente seu caminho com coragem, não tenha medo da crítica dos outros e, sobretudo não se deixe paralisar pela sua própria crítica”.

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Maria Lucia Rossetti, por abrir as portas do laboratório para uma quase desconhecida, meu eterno agradecimento por tornar possível a realização deste sonho. Muito obrigada pela confiança, ensinamentos e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Arnaldo Zaha, a quem tenho enorme respeito e admiração pelo exemplo de pesquisador e pessoa, muito obrigada pela oportunidade e carinho.

À querida e eterna companheira de grupo Rosa Dea Sperhacke, inicialmente por ser o elo que me levou até o CDCT, mas principalmente pelo grande incentivo, confiança e ensinamentos em biologia molecular.

A todos os pesquisadores do HUCFF da UFRJ responsáveis pela coleta das amostras e realização dos exames, sem vocês este trabalho não seria possível. Em especial ao Dr. Marcus Conde pela ajuda incansável em responder qualquer dúvida e pelos grandes ensinamentos na análise estatística.

Às parceiras de trabalho e de grupo; à Candice principalmente pela grande ajuda no início das minhas atividades no laboratório, e à Karen, uma estagiária muito dedicada, competente e minha “relatora”, obrigada pela ajuda e ensinamentos com o “português”.

À Tatiana Gregianini, por ser tão prestativa e me ajudar nos experimentos iniciais de PCR em tempo real (enquanto o Filippo dormia). Muito obrigada pela grande ajuda na realização deste trabalho.

À Lia Possuelo, pela ajuda em desvendar o mistério das bandas inespecíficas, muito obrigada pelos ensinamentos com o “Southern blotting”.

Às colegas e amigas do CDCT, pelo excelente ambiente de trabalho, agradável e divertido. Muito obrigada pelo estímulo, conversas e ajuda, vocês são minha família “porto-alegrense”.

As queridas amigas e parceiras do “Kit HPV”, Mirela e Regina, aprendi muito trabalhando com vocês. Obrigada pelos momentos de descontração, pela grande dedicação ao laboratório, pelo incentivo e amizade.

À Patrícia, pela sua maravilhosa visão crítica, que nos faz pensar e sempre tentar fazer melhor. Obrigada pelas conversas que me fizeram entender um pouco mais sobre este “mundo da pesquisa”. À Raquel, nossa matemática, obrigada pelo incentivo e amizade.

Um agradecimento muito especial, à Luciana, minha amiga, parceira de lar e “psicóloga de plantão”. Muito obrigada pelas longas conversas, incentivo, cumplicidade e carinho. Acho que não foi por acaso que nos entendemos tão bem logo que nos conhecemos, tenho certeza que nossa amizade será para sempre.

Aos secretários do PPGBCM, Silvia e Luciano, pelo grande auxílio sempre com muita dedicação.

À minha família; aos meus irmãos, Adriana e André, pela nossa união e porque sei que sempre poderei contar com vocês, obrigada pelo incentivo. Ao Sandro e à Carla por tornarem nossa família ainda mais unida, obrigada pelos momentos de descontração. À minha querida sobrinha Luiza, obrigada por tornar nossa família muito mais feliz com a sua presença.

Aos meus pais, que mesmo não entendendo muito bem este meu sonho, sempre me incentivaram e deram apoio em tudo na minha vida. À minha mãe e minha grande amiga por toda dedicação, ao meu pai pelo exemplo de caráter e determinação. Muito obrigada pela oportunidade, suporte e amor incondicional.

Ao Cris, pela compreensão com os meus sonhos, mesmo que para isso ficamos “fisicamente” longe um do outro. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado, me incentivando e ajudando a encarar as dificuldades com o bom astral que você tem. Te amo ... muito!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada. Obrigada Deus por colocar estas pessoas maravilhosas em meu caminho!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	10
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
RESUMO	15
"ABSTRACT"	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Apresentação.....	17
1.2 Tuberculose	18
1.2.1 Um breve histórico	19
1.2.2 Epidemiologia	20
1.2.3 Agente etiológico	22
1.2.4 Transmissão	23
1.2.5 Imunologia e patogênese.....	24
1.2.6 Manifestações clínicas da tuberculose.....	25
1.3 Tuberculose pleural.....	26
1.3.1 Patogenia.....	26
1.3.2 Aspectos clínicos	28
1.3.3 Tratamento.....	29
1.3.4 Tuberculose pleural e HIV.....	30
1.4 Diagnóstico de tuberculose pleural	31
1.4.1 Métodos de imagem.....	32
1.4.2 Teste tuberculínico.....	32
1.4.3 Métodos laboratoriais.....	33
1.4.3.1 Amostras clínicas utilizadas	33
1.4.3.2 Análise bioquímica e citológica dos derrames pleurais.....	34
1.4.3.3 Baciloscopia	35
1.4.3.4 Cultura para micobactérias	35
1.4.3.5 Adenosina deaminase.....	36
1.4.3.6 Interferon- γ	38

1.4.3.7 Exame histopatológico	39
1.4.3.8 Outros marcadores	39
1.5 Diagnóstico de tuberculose pleural por métodos de biologia molecular.....	40
1.5.1 Extração de ácidos nucleicos.....	40
1.5.2 Região alvo para amplificação	41
1.5.3 Métodos de amplificação	41
1.5.4 Detecção dos fragmentos amplificados	42
1.5.5 Métodos comerciais	43
1.5.6 Métodos “in house”	45
1.5.6.1 Hibridização em microplaca	48
1.5.7. PCR em tempo real.....	48
1.5.8 Resultados falso-positivos e falso-negativos	50
1.5.9 Recomendações para utilização de novas tecnologias	51
2. JUSTIFICATIVA.	53
3. OBJETIVOS.	54
3.1 Objetivo geral.....	54
3.2 Objetivos específicos	54
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 Delineamento do estudo	55
4.2 Local do estudo.....	55
4.3 Período do estudo e número de amostras	55
4.4 População elegível para o estudo.....	55
4.4.1 Critérios de inclusão.....	55
4.4.2 Critérios de exclusão.....	56
4.5 Coleta de dados	56
4.6 Critérios para o diagnóstico	57
4.6.1 Critérios para o diagnóstico de tuberculose pleural	57
4.6.2 Critérios para o diagnóstico de outras doenças	57
4.7 Coleta e processamento das amostras.....	58
4.8 Procedimentos laboratoriais.....	58
4.8.1 Testes bacteriológicos.....	58

4.8.2 Exame histopatológico.....	59
4.8.3 Extração de DNA das amostras clínicas.....	59
4.8.4 Amplificação e detecção por hibridização.....	59
4.8.4.1 “Primers” utilizados.....	59
4.8.4.2 Condições de amplificação.....	60
4.8.4.3 Hibridização e detecção colorimétrica em microplaca.....	60
4.8.4.4 Ponto de corte (“Cut-off”).....	61
4.8.5 PCR em tempo real.....	61
4.8.5.1 “Primers” utilizados.....	61
4.8.5.2 Condições de amplificação.....	61
4.8.5.3 Análise dos fragmentos amplificados.....	62
4.8.5.4 Sensibilidade analítica do teste.....	62
4.8.6 Teste de inibição da PCR.....	62
4.9 Análise estatística.....	63
4.10 Considerações éticas.....	63
4.11 Fluxograma do estudo.....	64
5. RESULTADOS.....	65
5.1 Caracterização da população de estudo.....	65
5.2 Avaliação dos métodos convencionais.....	66
5.3 Hibridização e detecção colorimétrica em microplaca.....	67
5.4 Padronização da PCR em tempo real.....	67
5.5 Sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real.....	69
5.6 Teste de inibição.....	71
5.7 Análise da sensibilidade da PCR em tempo real e dos métodos convencionais.....	72
6. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
Apêndice 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	100
Apêndice 2 - Instrumento de coleta de dados.....	103
Apêndice 3 - Protocolo de extração de DNA.....	109
Apêndice 4 - Protocolo de hibridização em microplaca.....	110
Apêndice 5 - Currículo <i>vitae</i> resumido.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AAN: amplificação de ácidos nucléicos
ADA: adenosina deaminase
AIDS: síndrome da imunodeficiência humana
BAAR: bacilo álcool-ácido resistente
BCG: bacilo de Calmette e Guérin
BSA: albumina de soro bovino
°C: graus Celsius
G+C: guanina mais citosina
CDC: “Centers for Disease Control and Prevention”
CDCT: Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CEP: comitê de ética em pesquisa
CN: controle negativo
CP: controle positivo
CPF-10: “culture filtrate protein 10”
Ct: ciclo em que uma amostra positiva cruza o “threshold” na PCR em tempo real
dNTP: desoxinucleosídeo trifosfato
DNA: ácido desoxirribonucleico
DO: densidade ótica
DP: desvio padrão
E: especificidade
EDTA: ácido etilendiaminotetracético sal sódico
ELISA: imunoenensaio enzimático
ELISPOT: imunoenensaio enzimático para interferon gama
ESAT-6: “6 kDa early secretory antigenic target”
EMB: etambutol
ETH: etionamida
FDA: “Food and Drug Administration”
fg: fentogramas
FEPPS: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HCl: ácido clorídrico
HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
kDa: kiloDaltons

IC: intervalo de confiança
INS-1: “primer forward” da região IS6110
INS-2: “primer reverse” da região IS6110
INH: isoniazida
IFN- γ : interferon gama
IS: seqüência de inserção
LES: lupus eritematoso sistêmico
LDH: desidrogenase láctica
LJ: meio de cultura Löwenstein-Jensen
M: molar
MDR: multidroga resistente
MgCl₂: cloreto de magnésio
min: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
MS: Ministério da Saúde
N: número
NaCl: cloreto de sódio
nm: nanômetro
OMS: Organização Mundial da Saúde
pb: pares de base
pH: potencial de hidrogênio iônico
PCR: reação em cadeia da polimerase
pmol: picomol
PZA: pirazinamida
RHZ: esquema I (rifampicina, isoniazida, pirazinamida)
RIA: radioimunoensaio
RNA: ácido ribonucléico
rRNA: RNA ribossômico
RMP: rifampicina
rpm: rotações por minuto
s: segundo
S: sensibilidade
SDS: dodecil sulfato de sódio

SINAN: sistema de informações de agravos de notificação

SM: estreptomicina

SSC: cloreto de sódio + citrato de sódio

Taq: “Thermus aquaticus”

TB: tuberculose

TE: Tris-EDTA

Tm: temperatura na qual metade dos produtos da PCR estão dissociados

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFC: unidades formadoras de colônias

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

UV: ultravioleta

VPN: valor preditivo negativo

VPP: valor preditivo positivo

WHO: “World Health Organization”

XDR: extensiva droga resistência

U: unidades

μg : micrograma

μL : microlitro

μM : micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxas de incidência de tuberculose em 2006.....	20
Figura 2 – Distribuição da tuberculose extrapulmonar no Brasil em 2006.....	21
Figura 3 – Fotografia de uma microplaca após hibridização e detecção colorimétrica.....	67
Figura 4 – Exemplo de uma curva de amplificação da PCR em tempo real.....	68
Figura 5 – Exemplo de uma curva de dissociação da PCR em tempo real.....	68
Figura 6 – Valor preditivo negativo (VPN) da PCR em tempo real para amostras de líquido pleural (LP) ou fragmento de pleura (FP), de acordo com a prevalência de TB pleural em pacientes com derrame pleural.....	71
Figura 7 – Teste de inibição da PCR.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos realizados para o diagnóstico de tuberculose pleural utilizando métodos “in-house” com amplificação por PCR e região alvo IS6110 em amostras de líquido pleural.....	46
Tabela 2 – “Primers”, seqüência, região alvo e posição no genoma de <i>M. tuberculosis</i> utilizados para amplificação do DNA.....	60
Tabela 3 – Diagnóstico e características demográficas dos 161 pacientes elegíveis para o estudo.....	65
Tabela 4 – Rendimento dos métodos convencionais para o diagnóstico dos 107 pacientes com TB pleural.....	66
Tabela 5 – Comparação dos resultados entre as técnicas de hibridização e detecção colorimétrica em microplaca e PCR em tempo real obtidos nas amostras de líquido pleural, fragmento de pleura e soro.....	69
Tabela 6 – Sensibilidade, especificidade e valores preditivos da PCR em tempo real para os diferentes tipos de amostras.....	70
Tabela 7 – Sensibilidade, intervalo de confiança e valor preditivo negativo dos métodos isolados e das análises em paralelo.....	73

RESUMO

Os métodos convencionais para o diagnóstico da tuberculose (TB) pleural possuem várias limitações, assim métodos mais sensíveis e específicos são necessários. O objetivo deste estudo foi avaliar uma metodologia de hibridização em microplaca e uma técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para a detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de líquido pleural, fragmento de pleura e soro. Adicionalmente, foi avaliada a utilidade da PCR em tempo real em paralelo com a cultura do líquido pleural para o diagnóstico de TB pleural. Foram avaliados 161 pacientes com derrame pleural e submetidos à toracocentese e biópsia pleural. O padrão-ouro para definição de um caso de TB pleural baseou-se na combinação de baciloscopia, cultura, exame histopatológico e critérios clínicos. Cento e sete dos 161 pacientes com derrame pleural receberam diagnóstico de TB pleural. Os resultados da metodologia de hibridização em microplaca não foram satisfatórios, assim foi desenvolvida uma técnica de PCR em tempo real. Nas amostras de líquido pleural, a PCR em tempo real mostrou uma sensibilidade de 46% (IC 95%, 36%-56%) com especificidade de 100%, enquanto a cultura obteve uma sensibilidade de 29% (IC 95%, 20%-38%). A PCR em tempo real realizada em associação com a cultura no líquido pleural apresentou uma sensibilidade de 60% (IC 95%, 50%-70%). Para as amostras de fragmento pleural, a PCR em tempo real mostrou uma sensibilidade de 42% (IC 95%, 26%-59%) e especificidade de 100%, para este tipo de amostra o exame histopatológico apresentou a maior sensibilidade (90% - IC 95%, 84%-96%). Nas amostras de soro a PCR em tempo real foi positiva em apenas dois pacientes, os quais também apresentaram resultado positivo nos outros tipos de amostras. Estes resultados indicam que a PCR em tempo real realizada no líquido pleural pode ser uma forma útil para obter um diagnóstico de TB pleural mais rápido, específico e com um procedimento menos invasivo para coleta das amostras.

“ABSTRACT”

Conventional tests for pleural tuberculosis (TB) have several limitations and more sensitive and specific methods are needed. The aim of this study was to evaluate microwell hybridization and real-time PCR (polimerase chain reaction) for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in pleural fluid, pleural tissue and serum. Additionally, the utility of real-time PCR in parallel with culture in pleural fluid for the diagnosis of pleural TB was assessed. One hundred sixty one patients with a pleural effusion submitted to a thoracentesis and pleural biopsy were evaluated. The gold-standard for case definition of pleural TB were the combination of acid-fast bacilli, culture, histopathologic examination and clinical parameters. One hundred seven of the 161 patients with pleural effusion received diagnosis of pleural TB. Results of microwell hybridization were not satisfactory, thus we developed a real-time PCR assay. In pleural fluid specimens, real-time PCR showed a sensitivity of 46% (CI 95%, 36%-56%) with specificity of 100%, while the sensitivity of culture was 29% (CI 95%, 20%-38%). The combination of real time PCR and culture in pleural fluid showed a sensitivity of 60% (CI 95%, 50%-70%). For the pleural tissue, real-time PCR showed a sensitivity of 42% (CI 95%, 26%-59%) with specificity of 100%, for this specimen histopathologic examination had the highest sensitivity (90% - CI 95%, 84%-96%). In the serum real-time PCR was positive in only two patients, which also had positive results in other specimens. Our results indicate that the real-time PCR is a useful approach to achieve a more rapid and specific diagnosis for pleural TB with a less invasive procedure for specimen collection.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

A tuberculose (TB) pleural é particularmente importante na presença da co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, em países com alta prevalência de TB (SHARMA & MOHAN, 2004). A sua manifestação mais característica é o derrame pleural líquido, mas também pode ocorrer acúmulo de quantidade excessiva de líquido na cavidade pleural por outras etiologias (FERRER & ROLDÁN, 2000). No Brasil, país com alta prevalência de TB, a TB pleural apresenta-se como a forma extrapulmonar mais freqüente, sendo esta a maior causa de derrame pleural (NEVES *et al.*, 2004).

Para o diagnóstico de TB pleural os métodos convencionais ainda são amplamente utilizados. A baciloscopia do líquido pleural possui uma baixa sensibilidade (0 a 10%) e embora a cultura seja mais sensível (10 a 35% para líquido pleural e 39 a 65% para fragmento de pleura), requer de duas a seis semanas para se obter o resultado (GOPI *et al.*, 2007). O melhor método diagnóstico disponível é o histopatológico, que possui uma sensibilidade superior a 80% (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006). Entretanto, este método requer procedimentos invasivos para a coleta das amostras, como a biópsia pleural.

Na ausência de tratamento, o derrame pleural devido à TB pode ter uma resolução espontânea, porém mais da metade dos casos não tratados podem desenvolver formas mais graves de TB pulmonar ou extrapulmonar (GOPI *et al.*, 2007). Por outro lado, dados do município do Rio de Janeiro mostram que um grande número de casos (cerca de 50%) tem o tratamento instituído antes da confirmação diagnóstica (NEVES *et al.*, 2004). No entanto, este tratamento empírico, baseado somente em dados clínicos e radiológicos, pode resultar em uma administração inapropriada dos fármacos anti-tuberculose (anti-TB).

Assim, métodos alternativos vêm sendo buscados e as metodologias baseadas na amplificação dos ácidos nucleicos (AAN) parecem ser promissoras. Atualmente, os métodos de amplificação comercializados são aprovados apenas para o uso em amostras respiratórias (TORTOLI & PALOMINO, 2007). Além

disso, o custo destes kits é elevado (US\$ 25 – 50 por teste) para os países em desenvolvimento, onde a tuberculose é um importante problema de saúde pública (PAI & LING, 2008).

Estudos mostram que a técnica “in house” da reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta uma sensibilidade bastante variada, de 20 a 87% utilizando amostras de líquido pleural (PAI *et al.*, 2004; DINNES *et al.*, 2007) e de, aproximadamente, 90% para amostras de fragmento pleural (TAKAGI *et al.*, 1998; HASANEEN *et al.*, 2003). Devido a esta heterogeneidade nos resultados, uma recente meta-análise concluiu que a aplicação clínica dos métodos “in house” continua incerta e ainda deve ser melhor avaliada (PAI *et al.*, 2004).

Neste estudo, buscou-se avaliar a contribuição da detecção de ácido desoxirribonucléico (DNA) de *Mycobacterium tuberculosis* no diagnóstico de TB pleural, utilizando diferentes amostras (líquido pleural, fragmento de pleura e soro). Com esta finalidade, primeiramente foi utilizada uma metodologia de hibridização e detecção colorimétrica dos fragmentos de DNA em microplaca. Posteriormente, foi desenvolvida uma metodologia de PCR em tempo real, a qual foi avaliada isoladamente e em associação com os métodos convencionais de diagnóstico.

1.2 Tuberculose

A TB é conhecida há milhares de anos e possui uma longa história. Esta doença deixou sua marca na criatividade humana, música, arte e literatura. Além disso, tem influenciado em avanços da ciência biomédica e cuidados da saúde (DANIEL, 2006). Atualmente, a TB continua sendo um relevante problema de saúde pública, pois se estima que ela seja a maior causa de doença e morte no mundo causada por um único agente infeccioso (WHO, 2008). Mesmo com programas governamentais, recursos tecnológicos capazes de promover seu controle, e os regimes terapêuticos utilizados, existem problemas inerentes à doença, como o surgimento de linhagens resistentes aos fármacos indicados para o tratamento e, mais recentemente, a imunodepressão causada pelo HIV, que criam condições ideais para transformá-la em uma doença oportunista (KAUFMANN & VAN EMBDEN, 1993; BRASIL, 2004).

1.2.1 Um breve histórico

Presume-se que o gênero *Mycobacterium* tenha surgido há mais de 150 milhões de anos. As mais primitivas documentações encontradas de TB são do Egito, Índia e China com datas de 5.000, 3.300 e 2.300 anos atrás, respectivamente (DANIEL 2006). Para a investigação da TB nestes períodos históricos, a identificação do material genético de *M. tuberculosis* tornou-se uma importante ferramenta (COOPER & POINAR, 2000).

Por volta de 460 antes de Cristo (a.C.), a TB era denominada pelo termo grego *phthisis* e, Hipócrates identificou esta como a doença mais disseminada da época. Na Europa, a epidemia de TB conhecida como “grande peste branca” iniciou, provavelmente, no século XVII e continuou pelos próximos 200 anos (LEÃO & PORTAELS, 2007). O aumento da incidência de TB começou juntamente com o crescimento da densidade populacional. A infecção se expandiu por todo o mundo, como resultado das viagens dos exploradores europeus, que infectados disseminavam o bacilo por vários lugares (DANIEL, 2000).

Em 1882, o microbiologista alemão Robert Koch descreveu o agente etiológico da TB, *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch e, demonstrou que este microrganismo era a causa da doença. Em 1905, Koch recebeu o Prêmio Nobel da medicina por sua descoberta (LEÃO & PORTAELS, 2007).

No Brasil, a luta contra a TB teve início no final do século XIX, com a criação das “Ligas Contra a Tuberculose” que priorizavam a construção de sanatórios. Nesta época, os esforços eram orientados para a obtenção da cura espontânea da doença, que ocorria em cerca de 25% dos enfermos. Tais esforços eram caracterizados por boa alimentação e muito repouso, preferencialmente no clima frio das montanhas (FERNANDES *et al.*, 1993).

De 1908 a 1919, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram uma vacina através de uma linhagem de *Mycobacterium bovis*, com virulência atenuada, chamada Bacille Calmette-Guérin ou BCG. Atualmente a vacina é aplicada apenas em crianças, para prevenir formas mais grave da doença, já que não protege adultos em países onde a TB é endêmica (LEÃO & PORTAELS, 2007; MARTÍN *et al.*, 2007).

A introdução dos fármacos anti-TB, na década de 50, juntamente com as melhores práticas de saúde pública, resultaram na diminuição das taxas de morbidade e mortalidade devido à TB. Entretanto, na metade dos anos 80 houve um aumento no número de casos da doença, mesmo nas regiões economicamente desenvolvidas (LEÃO & PORTAELS, 2007). As razões identificadas inicialmente para este aumento foram: epidemia de HIV/AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), o crescimento da pobreza nas grandes áreas metropolitanas e o aumento da imigração. Desta forma, em 1993, a TB foi considerada uma emergência global pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e, desde então, programas de prevenção, diagnóstico e tratamento vêm sendo incentivados (RAVIGLIONE, 2003).

1.2.2 Epidemiologia

De acordo com a OMS, em 2006 foram estimados mundialmente 14,4 milhões de casos prevalentes de TB, sendo 9,2 milhões de novos casos e um milhão e 700 mil mortes devido à doença. Cabe ressaltar que estas estimativas consideram todas as formas de apresentação da TB ativa, sendo que a TB pulmonar representa 80-90% dos casos e a TB extrapulmonar de 10-20% (WHO, 2008). A Figura 1 apresenta as taxas de incidência estimadas mundialmente em 2006.

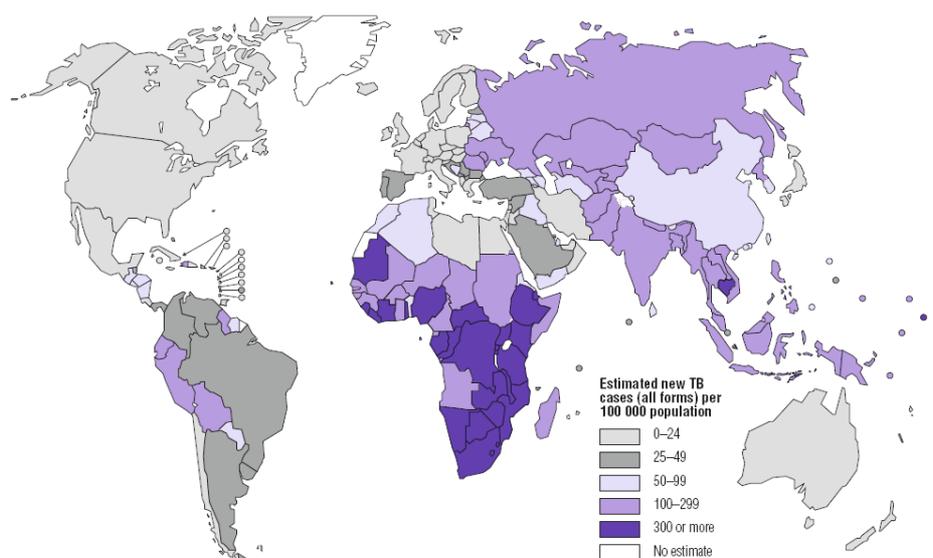


Figura 1 – Taxas de incidência de tuberculose em 2006 (WHO, 2008).

No Brasil, em 2006 estimou-se uma incidência de 94 mil casos de TB, com 7,6 mil mortes. Assim, o Brasil ocupa o 16º lugar entre os 22 países em desenvolvimento responsáveis por 80% dos casos mundiais de TB (WHO, 2008). Considerando as diferentes regiões do Brasil, observa-se que 46,37% de todos os casos de TB estão localizados na região sudeste e, na região sul, ocorrem 10,61% dos casos. No Rio Grande do Sul, a incidência em 2006 foi de 39,1 casos por 100.000 habitantes e, no Rio de Janeiro, estado com as maiores taxas de incidência e mortalidade, foi de 73,6 casos por 100.000 habitantes (BARREIRA, D. Comunicação pessoal. Dados SINAN 2007).

Dados de 2006 mostram que a TB extrapulmonar corresponde a, aproximadamente, 14% dos casos de TB no país. Destas, a TB pleural é a forma mais freqüente, representando 44% dos casos (BARREIRA, D. Comunicação pessoal. Dados GT-SINAN 2006). A Figura 2 mostra a distribuição da TB extrapulmonar no Brasil.

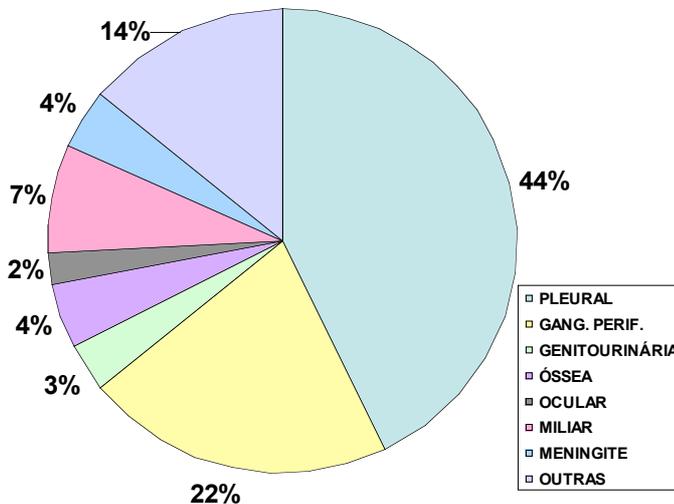


Figura 2 – Distribuição da tuberculose extrapulmonar no Brasil em 2006 (BARREIRA, D. Comunicação pessoal. Dados GT-SINAN, 2006).

1.2.3 Agente etiológico

M. tuberculosis, principal agente infeccioso da TB, é membro do gênero *Mycobacterium* e um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*. Este complexo possui distintos hospedeiros, potencial zoonótico e reservatórios e inclui as espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canetti*. Atualmente, algumas linhagens isoladas vêm sendo denominadas *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedi*, embora muitas vezes estas sejam identificadas como subespécies ou variantes de *M. bovis*. Este grupo de bactérias é identificado com base em características fisiológicas, bioquímicas e de crescimento, também se destacam por ser geneticamente muito relacionadas, com uma alta similaridade em suas seqüências de DNA (BARRERA, 2007).

Algumas características da espécie *M. tuberculosis* explicam muitas questões da história natural da doença. As micobactérias apresentam ácidos micólicos de alto peso molecular em sua parede celular. Este alto conteúdo lipídico confere proteção à ação de agentes químicos (incluindo muitos antimicrobianos), contribui para a sua sobrevivência ambiental, os protegem de algumas defesas do hospedeiro. Esta característica também está relacionada com a propriedade álcool-ácido resistente e, a dificuldade pela coloração do método de Gram (BARRERA, 2007).

No microscópio, *M. tuberculosis* apresenta-se em bacilos curvos ou retos com 0,2 a 0,7 μm de largura por 1,0 a 10 μm de comprimento. É classificado como aeróbio estrito e possui um tempo de geração de 12 a 24 horas, dependendo da oferta de oxigênio, nutrientes e do pH do meio. É um parasita causador de patogenia intracelular, que permanece no interior do macrófago em atividade metabólica muito reduzida, podendo sobreviver por anos no organismo (BARRERA, 2007). O crescimento lento do bacilo tem um importante significado clínico, pois é um dos fatores que condiciona a evolução crônica da doença (KRITSKI *et al.*, 2005).

O genoma completo da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* foi seqüenciado em 1998 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, nº de acesso AL123456). O DNA deste microrganismo é composto de 4.411.529 pares de base (pb), contém

em torno de 4.000 genes e um conteúdo de G+C de 65,5%. Este genoma é rico em DNA repetitivo, como as seqüências de inserção (IS), sendo que mais de 32 tipos diferentes de IS foram identificadas (COLE *et al.*, 1998). A IS6110, seqüência da família IS3 é bastante utilizada para tipagem de linhagens e epidemiologia molecular, devido às variações no sítio de inserção e número de cópias (VAN EMBEDEN *et al.*, 1993). No genoma de *M.tuberculosis* H37Rv foram identificadas 16 cópias de IS6110 (DEL PORTILLO *et al.*, 2007).

1.2.4 Transmissão

O bacilo da TB é transmitido de pessoa a pessoa, sendo sua principal porta de entrada a via respiratória. Os doentes com a forma pulmonar bacilífera constituem a principal fonte de disseminação da doença, pois podem eliminar pequenas gotículas que contêm apenas um ou poucos bacilos, através da tosse e do espirro. Estas gotículas são estáveis e quando eliminadas ficam em suspensão no ar por várias horas. Um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, pode infectar de 10 a 15 pessoas por ano (BATES, 1980; KRITSKI *et al.*, 2005).

A detecção e manuseio do paciente portador de TB pulmonar e baciloscopia positiva continuam sendo as principais ferramentas no controle da TB. Entretanto, com o uso de tipagem molecular, foi possível demonstrar que mesmo os pacientes com baciloscopia negativa e cultura positiva podem ser responsáveis por 17 a 20% da transmissão de TB. Isto ocorre, principalmente, em grandes centros urbanos, com elevada taxa de TB e, pela associação com outras co-morbidades, como a infecção pelo HIV (BEHR *et al.*, 1999).

Um estudo demonstrou que escarros induzidos de pacientes com TB pleural podem apresentar uma alta freqüência de baciloscopia e cultura positiva. Isto foi observado mesmo nos casos que não apresentavam anormalidades no parênquima pulmonar. Assim, os autores ressaltam que pacientes com TB pleural, diferentemente de outras formas de TB extrapulmonar, possuem um risco potencial de transmitir *M.tuberculosis* para seus contatos. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar em que grau esta transmissão pode ocorrer (CONDE *et al.*, 2003).

1.2.5 Imunologia e patogênese

Após a inalação, o bacilo da TB instala-se nos alvéolos pulmonares, onde é fagocitado pelos macrófagos (RAJA, 2004). A sobrevivência do agente infeccioso no pulmão depende da sua patogenicidade e da habilidade das células hospedeiras em eliminá-lo. Se os macrófagos alveolares não forem capazes de evitar a proliferação da bactéria, é formada uma resposta pró-inflamatória localizada. Assim, fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α) e quimiocinas inflamatórias, produzidas pelo macrófago infectado, recrutam células sanguíneas, as quais fagocitam o bacilo. Estas células, eventualmente, retornam à corrente sanguínea causando a primeira disseminação hematogênica em direção a diferentes órgãos e, pela pleura devido à proximidade (KRITSKI & MELO, 2007).

As células recrutadas para o sítio da infecção produzem quimionas e citocinas, que ampliam o recrutamento celular e remodelam o sítio da infecção em uma massa celular, conhecido como tubérculo ou granuloma (DHEDA *et al.*, 2005). O bacilo localiza-se preferencialmente no centro caseoso do granuloma, podendo permanecer assim até que ocorra uma reativação (RAJA, 2004). A resposta da proliferação bacilar provoca uma necrose caseosa e, no microscópio, podem ser observadas células gigantes multinucleadas e epiteliais, localizadas principalmente ao redor do material caseoso (KRITSKI & MELO, 2007).

O bacilo também pode ser disseminado pela via linfática. Esta segunda disseminação sistêmica ocorre pelos ductos torácicos e veia cava superior. Assim, o bacilo pode se difundir para áreas superiores do pulmão ou para diferentes órgãos, como rins, cérebro e ossos. Nestes sítios, o bacilo encontra uma atmosfera favorável para sua implantação, que combina a quantidade necessária de oxigênio e a baixa circulação, sendo esta uma associação ideal que dificulta o acesso das células de defesa (KRITSKI & MELO, 2007).

Na grande maioria das infecções pelo bacilo o sistema imune atua eficientemente. A maioria das pessoas infectadas (~90%) permanece com o bacilo na forma latente e assim não desenvolvem a doença. Contudo, doenças e condições que afetam a imunidade, tais como: má nutrição, alcoolismo, idade avançada, HIV/AIDS, diabetes, insuficiência renal crônica e tratamento com fármacos imunossupressores, aumentam o risco de desenvolvimento da TB.

Fatores adicionais incluem o nível bacilar infectivo, patogenicidade e virulência do bacilo, além da susceptibilidade genética do hospedeiro (ATS, 2000).

1.2.6 Manifestações clínicas da tuberculose

Se durante a fase inicial da infecção o sistema imune não conseguir contê-la, ocorrerá a chamada TB primária. Porém, se após um período de latência ocorrer quebra do equilíbrio entre o indivíduo e o bacilo por uma diminuição da resposta imune local ou sistêmica, se desencadeará a TB pós-primária devido à reativação endógena. Poderá também ocorrer nova inalação de grande quantidade de bacilos, associada ou não à imunodeficiência, instalando-se assim a reinfecção exógena (SMITH & MOSS 1994; KRITSKI *et al.*, 2005).

Como a TB é normalmente adquirida por inalação do bacilo, a localização inicial é o pulmão. Posteriormente, pode ocorrer uma disseminação, tanto por via hematogênica como linfática, para outros órgãos, causando o que é chamado de TB extrapulmonar (KRITSKI *et al.*, 2005). Os sintomas gerais da TB pulmonar são: febre, sudorese, perda de apetite e tosse acompanhada de expectoração mucopurulenta. Os sinais e sintomas da TB extrapulmonar dependem do órgão ou sistema afetado e são caracterizados por fenômenos inflamatórios ou obstrutivos. Em alguns casos a forma extrapulmonar pode coexistir com TB pulmonar ativa (KRITSKI & MELO, 2007).

A maioria das formas extrapulmonares afeta órgãos com condições ótimas de crescimento do bacilo e, por esta razão, geralmente apresenta-se de forma insidiosa, com lenta evolução e lesões e/ou fluídos paucibacilares. As formas mais freqüentes de TB extrapulmonar são: pleural, miliar, ganglionar, renal, óssea e do sistema nervoso central (meningite ou intracranial). Outras formas menos freqüentes, envolvem órgãos como olhos, pele, intestino e sistema geniturinário (KRITSKI & MELO, 2007).

1.3 Tuberculose Pleural

A TB pleural é considerada uma forma de TB extrapulmonar, apesar da proximidade anatômica entre a pleura e o pulmão (SHARMA & MOHAN, 2004). Segundo alguns estudos, o comprometimento pleural representa a forma mais freqüente de TB extrapulmonar (WONG, 2005; KRITSKI & MELO, 2007; BAUMANN *et al.*, 2007). No entanto, outros trabalhos afirmam que a TB pleural é a segunda forma mais comum, apenas menos freqüente do que a TB ganglionar (VALDÉS *et al.*, 2003; SHARMA & MOHAN, 2004; GOPI *et al.*, 2007). Estas freqüências variáveis são observadas de acordo com os países analisados, dependendo da prevalência de TB e da sorologia positiva para o HIV (SEISCENTO *et al.*, 2006).

No Brasil, a TB pleural é a forma extrapulmonar mais comum e representa, aproximadamente, 6% de todos os casos de TB do país (BARREIRA, D. Comunicação pessoal. Dados GT-SINAN, 2006). Dados indicam que a doença acomete principalmente homens (2:1) na faixa etária dos mais jovens (com menos de 50 anos) (SEISCENTO *et al.*, 2006). Em outros países, principalmente na África, onde o impacto do HIV é maior, até 38% de todos os casos de TB podem apresentar envolvimento pleural (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006).

Uma precisa freqüência do comprometimento pleural devido à TB é difícil de ser determinada. Isto ocorre, pois quando este comprometimento está presente simultaneamente com a TB pulmonar ativa, o paciente é categorizado de acordo com os manuais da OMS apenas como portador de TB pulmonar (SHARMA & MOHAN, 2004).

1.3.1 Patogenia

A pleura é uma membrana fina e elástica que reveste os pulmões (pleura visceral) e a parte interna da parede torácica (pleura parietal), formando a cavidade pleural. Entre as duas superfícies existe uma pequena quantidade de líquido (menos de 1mL em humanos) límpido e incolor, que é fundamental para a movimentação dos pulmões durante a respiração (WANG, 1998). Entretanto, pode ocorrer um acúmulo de líquido na cavidade pleural, conhecido como

derrame pleural, ocasionado por diversas etiologias, as quais dependem da região geográfica (FERRER & ROLDÁN, 2000). No Brasil, país com alta prevalência de TB, esta é a maior causa de derrame pleural, responsável por aproximadamente metade dos diagnósticos (NEVES *et al.*, 2004).

A TB pleural pode ser uma manifestação tanto da forma primária da doença quanto da reativação de uma infecção latente. Nos países com alta prevalência, a TB pleural ocorre mais em jovens como manifestação de tuberculose primária, enquanto que em países com baixa prevalência ela acomete mais a população idosa, como consequência da reativação endógena (LIAN *et al.*, 1999; IBRAHIM *et al.*, 2005). Nos últimos anos, observou-se um aumento dos casos de TB pleural devido à reativação, principalmente em pacientes co-infectados com HIV (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006).

Bacilos ou antígenos de *M.tuberculosis* podem entrar no espaço pleural após ruptura do foco caseoso pulmonar, sendo este considerado o evento inicial na patogenia da TB pleural primária. A etiologia desta manifestação primária ocorre, principalmente, devido a um fenômeno imunológico e não por uma infecção direta (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006; GOPI *et al.*, 2007). Nesta forma de manifestação, o líquido pleural possui poucos bacilos e o tecido pleural é granulomatoso em torno de 72% dos casos (LAZARUS *et al.*, 2007).

Na reativação, a TB pleural ocorre, principalmente, como resultado de uma infecção direta do bacilo. Nesta manifestação, observa-se a presença de infiltrados nos parênquimas ou cavidades no lobo superior e uma maior duração dos sintomas, quando comparado com a manifestação primária (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006). Além disso, também se observa um maior número de bacilos no líquido pleural e uma menor frequência de granuloma no tecido pleural, atribuída a menor resposta imune a *M. tuberculosis* (LAZARUS *et al.*, 2007).

O derrame pleural ocorre tanto na doença primária como na reativação, no entanto, é suportada a hipótese que ele seja resultante, principalmente, da presença do antígeno de *M.tuberculosis* no espaço pleural. O antígeno provoca uma interação com as células T, previamente sensibilizadas pela micobactéria, resultando em um processo inflamatório de hipersensibilidade tardia. Esta reação provoca um acúmulo de fluido na cavidade pleural, devido ao aumento da

permeabilidade dos capilares pleurais às proteínas do soro. Ainda, se observa que o envolvimento do sistema linfático pode contribuir para o acúmulo de líquido e a saída de proteínas do espaço pleural também fica prejudicada (FERRER, 1997; VALDÉS *et al.*, 2003).

A reação de hipersensibilidade provoca afluxo de células do compartimento sanguíneo para o espaço pleural. Os neutrófilos são predominantes no início da reação e responsáveis pelo recrutamento de populações de monócitos-macrófagos. Posteriormente, ocorre um predomínio de linfócitos, sendo a maioria linfócitos T. Em humanos com TB pleural, a proporção de linfócitos T é maior no líquido pleural do que no sangue (FERRER, 1997; SEISCENTO *et al.*, 2006).

1.3.2 Aspectos clínicos

A presença clínica pode manifestar-se na forma de doença aguda ou crônica. A forma aguda pode simular uma pneumonia bacteriana, com tosse não produtiva, dor torácica ventilatório-dependente, dispnéia e febre alta. A forma crônica manifesta-se com tosse não produtiva, febre vespertina, sudorese noturna, adinamia, anorexia e perda de peso (SEISCENTO *et al.*, 2006).

Na ausência de diagnóstico e tratamento com fármacos anti-TB, a resolução do derrame pleural pode ocorrer espontaneamente após alguns meses das manifestações clínicas da doença. Porém, em mais da metade destes casos podem se desencadear nos anos seguintes TB pulmonar ou extrapulmonar, resultando em uma doença mais grave ou morte (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006; GOPI *et al.*, 2007).

A TB pleural pode deixar seqüelas, como o espessamento pleural, que normalmente, fica circunscrito a pequenas áreas pleurais, sendo muito raro quando o tratamento quimioterápico é instituído precocemente. A TB pleural também pode apresentar-se na forma de empiema tuberculoso, o qual na maioria dos casos é decorrente da ruptura para o espaço pleural de uma lesão pulmonar com material caseoso, ricamente habitado por bacilos. Esta forma se caracteriza por um líquido pleural purulento, que pode estar associado a uma infecção bacteriana secundária, principalmente, se houver fístula broncopleural. O

pneumotórax, que se caracteriza pela presença de ar livre na cavidade pleural, pode ocorrer devido à fístula ou ruptura de cavidades por TB no espaço pleural. (SEISCENTO *et al.*, 2006).

1.3.3 Tratamento

Apesar de a vacina BCG apresentar baixa eficácia para evitar a enfermidade, nenhuma nova vacina está disponível no mercado, mesmo com as necessidades atuais e estudos realizados. Desta forma, a quimioterapia é fundamental para o controle da TB, promovendo a cura dos pacientes e interrompendo a cadeia de transmissão (SILVA & AÍNSA, 2007). No caso da TB pleural, muitos pacientes não tratados apresentam cura espontânea, mas podem evoluir para formas mais graves da doença, ressaltando assim a importância de um apropriado diagnóstico e tratamento (GOPI *et al.*, 2007).

O tratamento quimioterápico preconizado é o esquema de primeira linha, chamado Esquema I ou RHZ de curta duração, no qual se utiliza rifampicina (RMP), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA) por dois meses, seguidos de RMP e INH por quatro meses. Este esquema é indicado para todas as formas de TB (pulmonar e extrapulmonar) sem uso prévio de medicação e, para o retratamento nos casos de recidiva depois de curados há mais de cinco anos. Para pacientes que se tornaram positivos após abandonar o tratamento inicial, ou que apresentaram recidiva após cura em período menor que cinco anos com o Esquema I, utiliza-se Esquema I reforçado com etambutol (EMB). O Esquema III é utilizado em casos de falência dos Esquemas I (ou do Esquema I reforçado) e inclui estreptomicina (SM) e etionamida (ETH) (BRASIL, 2004).

Nas diferentes apresentações de TB, situações como monoterapia, utilização por tempo incorreto, prescrição inapropriada dos esquemas padronizados, ou falta de colaboração do paciente no uso da medicação, podem levar ao surgimento de linhagens resistentes de *M. tuberculosis*. A multidroga resistência (MDR) caracteriza-se pela resistência a pelo menos RPM e INH (ROSSETTI *et al.*, 2002). Mais recentemente, uma extensa resistência aos fármacos anti-TB (XDR), caracterizado por resistência aos fármacos de segunda linha, tem emergido em vários países (ZAGER & MCNERNEY, 2008). No Brasil,

não existem dados publicados específicos sobre a resistência de isolados de *M.tuberculosis* em amostras de TB pleural. Nos Estados Unidos, um estudo realizado recentemente, encontrou uma menor tendência de MDR em isolados de TB pleural, quando comparados com amostras de TB pulmonar (BAUMANN *et al.*, 2007).

Aproximadamente após 15 dias do início do tratamento, o derrame pleural é freqüentemente absorvido e o paciente apresenta uma acentuada melhora clínica. A avaliação radiológica da reabsorção deve ser acompanhada após um a dois meses de tratamento. Se ocorrer a manutenção do derrame pleural ou a presença de grandes espessamentos, antes da indicação do tratamento específico deve ser realizada uma tomografia (SEISCENTO *et al.*, 2006).

No caso de empiema tuberculoso, o tratamento consiste no efetivo esvaziamento do acúmulo de líquido pleural através de sistemas de drenagem e apropriada quimioterapia. As intervenções cirúrgicas devem ser realizadas em casos de insucesso dos tratamentos tradicionais. Também pode ser necessária a decorticação pulmonar e outros procedimentos cirúrgicos para ressecção de toda a fibrose que recobre a pleura. A fibrose pleural pode impedir que a concentração adequada do medicamento seja atingida, podendo levar a ocorrência rara de MDR (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006; SEISCENTO *et al.*, 2006).

O uso de corticóides como terapia adjunta para o tratamento de TB pleural, poderia reduzir os eventos inflamatórios, diminuindo as seqüelas e a evolução da doença. No entanto, uma revisão de diferentes testes clínicos randomizados mostrou que com este tratamento pode ocorrer uma rápida resolução do derrame pleural e controle dos sintomas, mas nenhuma vantagem adicional é observada. Desta forma, as evidências são insuficientes para determinar a utilização de corticóides no tratamento de TB pleural (EVANS, 2008).

1.3.4 Tuberculose pleural e HIV

Desde a década de 80 (século XX), com o advento do HIV/AIDS, tem-se observado um aumento do número de casos de TB no mundo. Sabe-se que o HIV é o maior fator de risco para o desenvolvimento de TB. Estimativas mostram que

a chance de uma pessoa previamente infectada com HIV desenvolver TB é de 5 a 8% em cada ano de vida, enquanto que a de uma pessoa não infectada com este vírus é de 5 a 10% em toda a vida (SHARMA *et al.*, 2005).

A infecção pelo HIV provoca uma redução, principalmente, das células T CD4⁺ as quais possuem um papel fundamental na imunidade da TB. Pessoas infectadas com HIV têm maiores riscos de progressão rápida de uma infecção recentemente adquirida, ou de reativação de uma infecção latente. Principalmente os pacientes mais imunocomprometidos, apresentam maior proporção de casos de TB extrapulmonar ou doença disseminada (RAJA, 2004), sendo o derrame pleural a causa mais comum de TB extrapulmonar nestes pacientes (WHO, 2007). No Brasil, um estudo realizado em 43 pacientes com TB pleural, mostrou que 30% possuíam co-infecção com HIV (TRAJMAN *et al.*, 1997). Na África, a prevalência desta co-infecção pode ser de até 80% (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006) com uma mortalidade acima de 20% (WHO, 2007).

Evidências sugerem que o HIV altera a apresentação clínica da TB pleural. Pode ocorrer maior duração dos sintomas, manifestações atípicas no exame radiológico e maior proporção de resultados negativos no teste tuberculínico (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006). Ainda, observa-se que diferentemente dos pacientes sem HIV, na co-infecção dificilmente ocorre resolução espontânea do derrame pleural (SHARMA *et al.*, 2005).

1.4 Diagnóstico de tuberculose pleural

De forma geral, é difícil estabelecer o diagnóstico dos diferentes tipos de TB extrapulmonar, principalmente devido a sua natureza paucibacilar e aos sinais e sintomas que são vagos e não específicos (PAI & LING, 2008). Na TB pleural, os testes diagnósticos convencionais possuem reconhecidas limitações para o uso clínico, assim, novos testes e biomarcadores vêm sendo desenvolvidos e avaliados (TRAJMAN *et al.*, 2008).

1.4.1 Métodos de imagem

A radiografia de tórax é o método de imagem de escolha na avaliação inicial e no acompanhamento de pacientes com TB pleural. O derrame pleural, geralmente, é unilateral e com volume que varia de pequeno a moderado (LOPES *et al.*, 2006), em um terço dos casos pode ocorrer infiltrado no pulmão (KRITSKI & MELO, 2007). Também podem ser observados espessamento ou calcificações pleurais, especialmente nos casos em que o diagnóstico ocorre tardiamente, ou devido a seqüelas após a cura (SEISCENTO *et al.*, 2006).

A ultra-sonografia é um método sensível na detecção do derrame pleural e também pode ser útil na orientação da toracocentese diagnóstica. A tomografia computadorizada apresenta um importante papel, especialmente na presença de sinais sugestivos de atividade no parênquima pulmonar, não visualizados pela radiografia de tórax. A ultra-sonografia também pode ser útil na orientação da punção nos derrames septados ou em casos de pequena quantidade de líquido (SEISCENTO *et al.*, 2006).

1.4.2 Teste tuberculínico

O teste tuberculínico, que pode ser realizado através da técnica de Mantoux, baseia-se na reação celular desenvolvida após a aplicação intradérmica de um derivado protéico de *M.tuberculosis*. O resultado é examinado após 72 horas, sendo que os pacientes que apresentarem uma induração de 5 a 9 mm são considerados como reatores fracos e acima de 10 mm como reatores fortes (BRASIL, 2004).

Em populações com alta incidência de TB ou em países onde a vacinação com BCG é rotineira, como no Brasil, a presença de reação positiva no teste tuberculínico tem valor discutível como método auxiliar no diagnóstico de TB pleural. Além disso, em pacientes imunocomprometidos, o teste negativo não afasta o diagnóstico da doença. De forma geral, na fase inicial ou aguda da doença o teste pode ser negativo devido a uma linfopenia periférica transitória, contudo após dois meses pode haver conversão do teste (SEISCENTO *et al.*, 2006).

1.4.3 Métodos laboratoriais

1.4.3.1 Amostras clínicas utilizadas

Para o diagnóstico de TB pleural utilizam-se amostras de líquido pleural, fragmento de pleura, escarro (principalmente o escarro induzido) e soro.

As amostras de líquido pleural são obtidas, principalmente, pela toracocentese, que utiliza uma agulha e seringa para coletar o derrame pleural. O procedimento é rápido, de baixo custo e seguro, sendo baixa a incidência de complicações (SALES & ONISHI, 2006). Esta técnica é responsável pela obtenção de mais de 90% das amostras que são encaminhadas para diagnóstico laboratorial. Entretanto, amostras obtidas através de drenagem torácica, por coleta durante toracoscopia, ou mesmo durante a toracotomia, também podem ser utilizadas para análises laboratoriais (ANTONANGELO & CAPELOZZI, 2006).

Na prática, estas diferentes formas de punção pleural podem ser realizadas tanto para o alívio dos sintomas, como para a coleta de material diagnóstico (SEISCENTO *et al.*, 2006). Neste caso, o volume recomendado para as análises é em torno de 50 a 60 mL, sendo importante a utilização de heparina, a fim de evitar a coagulação do líquido durante a aspiração (ANTONANGELO & CAPELOZZI, 2006).

Como o líquido pleural é um ultrafiltrado do plasma, de maneira geral, todas as determinações bioquímicas habitualmente realizadas no soro são passíveis de serem nele realizadas. Para a caracterização dos derrames pleurais, em transudatos ou exsudatos, recomenda-se que seja coletada uma amostra de sangue, simultaneamente à coleta do líquido, para que a interpretação da relação pleural-sérica de proteínas e desidrogenase láctica (LDH) seja confiável (LIGHT, 1972; ANTONANGELO & CAPELOZZI, 2006).

A biópsia pleural é um procedimento mais invasivo que a toracocentese, mas de extrema importância no diagnóstico das doenças da cavidade pleural. Os fragmentos de pleura podem ser obtidos por agulha ou sob visão direta através de toracoscopia ou toracotomia. Quando a biópsia é realizada por agulha, o número mínimo recomendado de fragmentos é de três e o tamanho de cada fragmento

obtido deve ser de 3 X 10 mm (ANTONANGELO & CAPELOZZI, 2006). Alguns estudos analisaram o impacto do número de fragmentos para o diagnóstico de TB pleural por métodos microbiológicos e histopatológicos. Porém, não se observaram dados conclusivos indicando que mais de um fragmento aumente o rendimento do diagnóstico (KIRSCH *et al.*, 1997; JIMÉNEZ *et al.*, 2002).

Em pacientes com derrame pleural, amostras de escarro são pouco analisadas, pois normalmente estes pacientes não apresentam expectoração espontânea. Entretanto, nos casos suspeitos de etiologia tuberculosa, a realização da técnica de indução do escarro está indicada independentemente do aspecto da radiografia de tórax (CONDE *et al.*, 2003; BRASIL, 2004).

1.4.3.2 Análise bioquímica e citológica dos derrames pleurais

Os derrames pleurais são sistematicamente classificados em transudatos ou exsudatos, de acordo com a sua classificação bioquímica. Esta diferenciação é realizada pela determinação dos níveis de proteína e LDH no líquido pleural e no soro, pelo critério de "Light". De acordo com essa classificação um líquido pleural é considerado um exsudato se um ou mais destes critérios forem encontrados: 1) Valor da relação entre proteínas do líquido pleural e do soro maior que 0,5; 2) Valor da relação entre LDH do líquido pleural dividido pelo do soro maior que 0,6; 3) LDH do líquido pleural 0,67 maior do que o limite superior do nível normal de LDH no soro (LIGHT *et al.*, 1972; LIGHT, 1997; LIGHT, 2006).

Os transudatos geralmente são límpidos, amarelo-claros e não coagulam espontaneamente. Em contraposição, os exsudatos podem ser turvos, hemorrágicos ou purulentos e, freqüentemente, coagulam devido à presença de fibrinogênio (ANTONANGELO & CAPELOZZI, 2006). Nos transudatos é importante a pesquisa de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca, evidências de nefro ou hepatopatia, trauma ou cirurgia de coluna torácica. Os exsudatos pleurais possuem causas mais variadas e requerem exames adicionais para a investigação e estabelecimento do diagnóstico etiológico (GENOFRE *et al.*, 2006).

A TB pleural apresenta um derrame caracteristicamente exsudativo, com predomínio de linfócitos em 60 a 90% dos casos nas fases aguda e crônica da

infecção, mas em pacientes com sintomas há menos de 15 dias pode haver predomínio de neutrófilos (SEISCENTO *et al.*, 2006).

Assim, quando forem observadas estas características no derrame pleural, principalmente em países com alta prevalência de TB, esta etiologia deve ser sempre considerada e investigada (NEVES *et al.*, 2004). Entretanto, muitas outras doenças podem estar associadas a um derrame pleural exsudativo, tais como: câncer, pneumonia, embolia pulmonar, infecção por fungos, abscesso intra-abdominal, doenças do pericárdio, lúpus eritematoso sistêmico (LES), pancreatite, derrame induzido por fármacos, pleurisia reumatóide, quilotórax e pseudoquilotórax, entre outras (LIGHT, 2006). Mesmo com o advento de critérios específicos e da aplicação de novas técnicas de diagnóstico, cerca de 10 a 20% dos derrames pleurais permanecem sem diagnóstico etiológico definido, sendo caracterizados como derrames de origem indeterminada (VILLENNA *et al.*, 2002).

1.4.3.3 Baciloscopia

Com base na característica álcool-ácido resiste das micobactérias, após coloração com fucsina, o método de Ziehl-Neelsen é amplamente utilizado para o diagnóstico da TB. Esta técnica é simples e rápida, mas além de não ser específica para *M. tuberculosis*, para um resultado ser positivo é necessário um número mínimo de 5.000 a 10.000 bacilos por mL de amostra (WAARD & ROBLEDO, 2007).

Desta forma, como a TB pleural caracteriza-se por possuir poucos bacilos no líquido pleural, o rendimento da baciloscopia nestas amostras é muito baixo, de aproximadamente zero a menos de 10% (VALDÉS *et al.*, 2003; SEISCENTO *et al.*, 2006; GOPI *et al.*, 2007). Amostras de fragmentos pleurais são, geralmente, menos utilizadas, mas a baciloscopia destas amostras pode apresentar uma sensibilidade em torno de 25% (VALDÉS *et al.*, 2003).

1.4.3.4 Cultura para micobactérias

Diferentes meios podem ser utilizados para isolar micobactéria, os mais comuns são o Löwenstein-Jensen (LJ) e o Ogawa, preparados à base de ovos,

enquanto os meios de cultura a base de ágar (Middlebrook 7H10 e 7H11) ou meios líquidos (Middlebrook 7H9) são disponíveis comercialmente. Para detecção pela cultura, estima-se que sejam necessários de 10 a 1.000 bacilos viáveis por mL de amostra e, devido à característica de crescimento lento, o resultado nos meios sólidos pode demorar de três a oito semanas. Além da demora nos resultados, todas as culturas positivas para micobactérias devem ter sua espécie identificada por métodos bioquímicos ou moleculares (WAARD & ROBLEDO, 2007).

O BACTEC TB-460 foi o primeiro sistema semi-automatizado disponível no mercado para cultura de micobactérias. Atualmente, outros sistemas comerciais estão disponíveis, como BACTEC MGIT960, VersaTREK e BacT/Alert 3D. Estes sistemas utilizam meios líquidos, que são mais sensíveis e mais rápidos (detecção de uma a três semanas) que os meios comumente utilizados, porém possuem um alto custo (WAARD & ROBLEDO, 2007).

A positividade da cultura no meio LJ pode variar de 10 a 35% para o líquido pleural e de 39 a 65% para fragmento de pleura (VALDÉS *et al.*, 2003; CHAKRABARTI & DAVIES, 2006; GOPI *et al.*, 2007). Testes realizados com o sistema BACTEC mostraram um aumento na sensibilidade, podendo chegar a 50% para líquidos e 90% para amostras de fragmentos pleurais, com resultados em 18 dias aproximadamente (FERRER, 1997; WONG, 2005).

Um estudo realizado com amostras de escarro induzido, em pacientes com derrame pleural por TB, mostrou que a cultura destas amostras pode apresentar um rendimento de 52%, mesmo na ausência de lesão no parênquima pulmonar radiologicamente visível. Enquanto o líquido pleural destes pacientes foi positivo em apenas 11% dos casos (CONDE *et al.*, 2003).

1.4.3.5 Adenosina deaminase

Adenosina deaminase (ADA) é uma denominação dada a um grupo de enzimas, com pesos moleculares distintos, que possuem uma função química semelhante no metabolismo das purinas. Nos humanos é encontrada, principalmente, nos linfócitos e está diretamente relacionada à atividade destas

células. Assim, em enfermidades em que há maior participação de linfócitos, como na TB pleural, a ADA geralmente é detectada em níveis elevados no líquido pleural (KAISEMANN *et al.*, 2004).

Diversos estudos pesquisaram a ADA em amostras de líquido pleural e, até o momento, duas meta-análises foram publicadas (GREGO *et al.*, 2003; LIANG *et al.*, 2008). O último trabalho analisou 63 estudos e verificou uma sensibilidade de 47% a 100% (média de 92% - Intervalo de confiança de 95% - IC – 90%-93%) e especificidade de 41% a 100% (média de 90% - IC 95%, 89%-91%) (LIANG *et al.*, 2008). Em outra recente meta-análise foram avaliados 25 estudos, todos realizados no Brasil e, encontrou-se uma sensibilidade de 91,8% (IC 95%, 89,8%-93,6%) e especificidade de 88,4% (IC 95%, 86,0%-90,5%) (MORISSON & NEVES, 2008). Estes estudos concluíram que apesar das diferenças encontradas, a ADA possui uma alta acurácia no diagnóstico de TB pleural, principalmente em pacientes jovens e em países com alta prevalência de TB.

No entanto, em outras doenças que produzem derrame pleural com predomínio de linfócitos, como a artrite reumatóide, carcinoma broncoalveolar, linfoma, LES, pneumonia por *Mycoplasma* ou *Chlamydia*, mononucleose, histoplasmosse e empiema, também podem apresentar níveis elevados de ADA (WONG, 2005; GOPI *et al.*, 2007). A especificidade do exame aumenta quando se dosa a fração ADA-2, pois esta isoenzima é produzida somente por macrófagos. Entretanto, na prática, quando se comparam os resultados dos testes de ADA-2 com ADA total, não se observa diferença significativa (KAISEMANN *et al.*, 2004). Desta forma, mesmo com um valor de ADA elevado, sugerindo TB pleural, deve ser sempre avaliada a história clínica do paciente, a análise de imagem e a evolução clínica, para que outras doenças possam ser afastadas (SEISCENTO *et al.*, 2006).

Embora este seja um método bastante estudado, ainda não foi definido um valor de corte universal que possa ser adotado como referência para a ADA no líquido pleural. Existe uma ampla faixa de variação dos resultados entre diferentes países e até mesmo entre serviços diferentes de uma mesma região. Assim, o valor de referência para um teste diagnóstico de TB pleural, baseado na dosagem da ADA, deve ser regionalizado de acordo com as diferenças de prevalência da

TB e de outras doenças entre os pacientes com derrame pleural (KAISEMANN *et al.*, 2004). As Diretrizes Brasileiras para TB indicam que com base nos estudos até o momento, o valor discriminatório da dosagem de ADA deve ser de 40 U/L e, recomendam que a dosagem seja realizada pelo método colorimétrico descrito por Giusti (BRASIL, 2004).

1.4.3.6 Interferon- γ

O interferon- γ (INF- γ) é uma citocina liberada pela ativação dos linfócitos T que é capaz de aumentar a atividade microbicida dos macrófagos, além de também estar envolvida na formação do granuloma. Vários estudos vêm investigando a utilidade do INF- γ no diagnóstico de TB pleural, sendo este dosado através das técnicas de ELISA (Imunoensaio enzimático) ou RIA (Radioimunoensaio) (VALDÉS *et al.*, 2003).

Duas meta-análises, publicadas em 2003 e 2007, que analisaram 13 e 22 trabalhos respectivamente, avaliaram a dosagem de INF- γ no líquido pleural. O último estudo verificou uma sensibilidade de 64 a 100% (média de 89% - IC 95%, 87%-91%) e uma especificidade de 86 a 100% (média de 97% - IC 95%, 96%-98%). Assim, tem-se observado que o INF- γ pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico de TB pleural, mas deve ser interpretado juntamente com os dados clínicos e os métodos convencionais (GREGO *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2007).

O rendimento do INF- γ tem se mostrado semelhante ao da dosagem da ADA no líquido pleural, no entanto, o seu custo é mais elevado e assim não é recomendado o uso rotineiro de INF- γ na prática clínica atual (SEISCENTO *et al.*, 2006). Além disso, outras doenças também podem apresentar níveis elevados de INF- γ , tais como neoplasias hematológicas e empiema (GOPI *et al.*, 2007).

Recentemente, estão disponíveis no mercado testes comerciais, como o ELISPOT e o QuantiFERON-TB, que baseiam-se na detecção de INF- γ liberado *in vitro* (SINGH & ESPITIA, 2007). Normalmente, estes testes são utilizados apenas em amostras de sangue, mas um recente estudo analisou amostras de sangue e líquido pleural com o teste ELISPOT. Neste estudo, observou-se uma elevada sensibilidade em ambas as amostras, de 90% para o sangue e 95% para

o líquido pleural, mas baixa especificidade, de 67 e 76% respectivamente (LOSI *et al.*, 2007).

1.4.3.7 Exame histopatológico

O exame histopatológico do fragmento de pleura está indicado em todo derrame pleural exsudativo que permanecer com etiologia desconhecida (BRASIL, 2004). A morfologia da lesão causada pela micobactéria pode ser de um granuloma completo ou incompleto, este último sem caseificação. A observação de um bacilo em uma amostra histológica de um granuloma de 1 cm³ indica a existência, de pelo menos, 2.000 bacilos no interior do granuloma (SEISCENTO *et al.*, 2006).

Desde que foi descrito até os dias atuais, a análise da biópsia continua sendo o teste diagnóstico mais sensível para a TB pleural (GOPI *et al.*, 2007). Contudo, alguns estudos indicam que a sensibilidade do histopatológico não ultrapassa 85%, pois em pacientes com diabetes ou imunocomprometidos, pode ocorrer a perda de função dos linfócitos, resultando em ausência na formação do granuloma, e assim dificultando o diagnóstico (SEISCENTO *et al.*, 2006).

Embora outras condições, como sarcoidose, presença de fungos e artrite reumatóide também sejam granulomatosas, a demonstração de granulomas, com ou sem necrose de caseificação, é normalmente considerada compatível com TB, pois esta é a responsável por mais de 95% dos casos de granuloma pleural (SEISCENTO *et al.*, 2006). Assim, em áreas com alta prevalência de TB e na ausência de diagnóstico bacteriológico, quando o granuloma na pleura é encontrado em paciente com quadro clínico sugestivo de TB e descartadas outras doenças, recomenda-se que tratamento com fármacos anti-TB seja instituído (BRASIL, 2004).

1.4.3.8 Outros marcadores

Novos testes e biomarcadores vêm sendo avaliados para o diagnóstico de TB pleural, tais como: Lisozima, Neopterin, Leptina, Fibronectina, Interleucina (IL-2), resposta de células T a ESAT-6 (“6 kDa early secretory antigenic target”) e

CFP-10 (“culture filtrate protein 10”), detecção de anticorpos (utilizando diferentes antígenos, como MPT-64, TBGL, MT-10.3). Contudo, de forma geral ainda existem poucos dados para definir o valor diagnóstico destes novos marcadores (TRAJMAN *et al.*, 2008).

1.5 Diagnóstico de tuberculose pleural por métodos de biologia molecular

Como resultado das limitações dos métodos convencionais para o diagnóstico de TB, os testes de AAN vêm sendo desenvolvidos para detecção de *M. tuberculosis* diretamente de amostras clínicas. Muitos estudos já foram realizados e esses testes parecem ser uma alternativa promissora para um rápido e acurado diagnóstico de TB. Estas técnicas baseiam-se na amplificação de regiões específicas de DNA ou RNA do agente infeccioso e, possuem as vantagens de amplificar pequenas quantidades de ácidos nucleicos e de obter resultados em apenas algumas horas (DINNES *et al.*, 2007; TORTOLI & PALOMINO, 2007; PAI & LING, 2008).

Os testes de AAN são classificados em comerciais, que utilizam kits já padronizados por empresas, ou “in house”, que são padronizados nos diversos laboratórios de pesquisa. Estas técnicas utilizam protocolos que diferem entre si, pelo método de extração dos ácidos nucleicos possivelmente presentes na amostra clínica, pela seqüência alvo e técnica de amplificação utilizada, e pela detecção dos produtos amplificados (FLORES *et al.*, 2005).

1.5.1 Extração de ácidos nucleicos

O método utilizado para extrair os ácidos nucleicos presentes na amostra clínica é um fator importante, pois pode influenciar na acurácia das técnicas de amplificação. Nos diferentes métodos utilizados, a primeira etapa consiste em romper a célula bacteriana, com posterior liberação do DNA de seu interior. Vários protocolos vêm sendo avaliados para a lise da parede celular das micobactérias, incluindo a utilização de detergentes, enzimas proteolíticas, rompimento por

processos mecânicos e elevadas temperaturas. Estes métodos podem ser utilizados isolados ou em várias combinações (ALDOUS *et al.*, 2005).

A segunda etapa consiste em purificar o DNA, removendo substâncias usualmente encontradas em materiais clínicos, que podem atuar como inibidores no processo subsequente de amplificação. Os métodos descritos na literatura variam, desde utilizar o DNA sem qualquer tratamento específico (KOGACÖZ *et al.*, 1993), até adicionar substâncias capazes de purificar o DNA como fenol-clorofórmio (HERMANS *et al.*, 1990a; WILSON *et al.*, 1993; NOLTE *et al.*, 1993) ou partículas de sílica (BOOM *et al.*, 1990; ANDERSEN *et al.*, 1993; WILSON *et al.*, 1993; ROSSETTI *et al.*, 1997).

Além dos protocolos desenvolvidos por diferentes laboratórios, também estão disponíveis no mercado diversos kits para extração. Os testes comerciais de AAN já possuem extrações padronizadas, sendo que cada sistema possui a sua própria estratégia, utilizando principalmente sonicação ou tratamento com temperatura (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

1.5.2 Região alvo para amplificação

Nas técnicas de AAN, a escolha da região do genoma a ser amplificada é importante para definir a especificidade da técnica. Uma das regiões mais utilizadas é a seqüência de inserção IS6110 (TORTOLI & PALOMINO, 2007). Esta seqüência, também nomeada previamente de IS986, além de ser específica para o complexo *M. tuberculosis*, está presente em múltiplas cópias (de 4 a 20 em 95% das linhagens de *M. tuberculosis*), possuindo assim, um potencial para aumentar a sensibilidade (EISENACH *et al.*, 1990; THIERRY *et al.*, 1990; HERMANS *et al.*, 1990b). Outras regiões amplamente utilizadas incluem o gene que codifica uma proteína “heat-shock” de 65 kDa, o gene que codifica uma proteína de fusão de 126 kDa, e fragmentos de DNA que codificam uma região do gene do RNA ribossomal (rRNA) 16S. Todas estas estão presentes como cópia única no genoma do complexo *M. tuberculosis* (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

1.5.3 Métodos de amplificação

Para a amplificação dos ácidos nucleicos podem ser utilizados diferentes métodos de amplificação, os principais são: PCR, amplificação mediada por transcrição, amplificação por deslocamento de fita e reação em cadeia da ligase (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

A PCR é o método de amplificação mais conhecido e amplamente utilizado (PAI & LING, 2008). A técnica, desenvolvida por Kary Mullis e colaboradores em 1985, baseia-se na síntese de uma nova fita complementar ao DNA alvo. Assim, para que a reação ocorra é necessário, além do DNA alvo, a utilização da enzima DNA polimerase, de um par de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”), dos quatro nucleotídeos que compõem o DNA (deoxinucleosídeos trifosfato: dATP, dTTP, dGTP, dCTP) e de um tampão de reação. A reação possui três etapas (desnaturação, anelamento e extensão) que ocorrem em repetidos ciclos com diferentes temperaturas (SAIKI *et al.*, 1985).

1.5.4 Detecção dos fragmentos amplificados

Os produtos amplificados podem ser detectados apenas pela visualização em luz ultravioleta (UV) de um gel após eletroforese, ou pela hibridização dos fragmentos amplificados com uma sonda (oligonucleotídeo) específica (IEVEN & GOOSSENS, 1997).

No caso da detecção pela hibridização, esta pode ser realizada utilizando substâncias que são incorporadas às moléculas de DNA, tais como a biotina (ANDERSEN *et al.*, 1993) e a digoxigenina (KOLK *et al.*, 1992). Estas proporcionam um manuseio mais fácil e acessível que a utilização de marcadores radioativos, muito utilizados antigamente. A hibridização com estes marcadores pode ser detectada com estreptavidina ou anticorpos anti-digoxigenina ligados a uma enzima (normalmente fosfatase alcalina ou peroxidase). A reação entre o substrato com a enzima produz luminescência detectável em filmes de raio-X (KOLK *et al.*, 1992) ou coloração que pode ser apenas visualizada, ou medida em espectrofotômetro (CHO *et al.*, 1995; KOX *et al.*, 1996). Estas etapas de hibridização podem ser realizadas em membranas de náilon ou nitrocelulose em

experimentos de "Southern blotting" (KOLK *et al.*, 1992; ANDERSEN *et al.*, 1993; SPERHACHE *et al.*, 2004) ou em microplacas (WILSON *et al.*, 1993; CHO *et al.*, 1995; KOX *et al.*, 1996; ROSSI *et al.*, 2000).

1.5.5 Métodos comerciais

Atualmente, existem no mercado alguns métodos comerciais de AAN para o diagnóstico de TB, mas apenas três estão amplamente difundidos e validados por estudos internacionais. No Brasil, estão disponíveis os dois kits aprovados pelo organismo norte americano de controle e regulamentação "Food and Drug Administration" (FDA), sendo estes o Amplified MTD (Gen-Probe, San Diego, CA) e o Amplicor MTB Test (Roche Molecular Systems, Basel, Switzerland). O sistema BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD), que utiliza uma amplificação por deslocamento de fita para produzir múltiplas cópias de IS6110, ainda não foi aprovado pelo FDA (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

O teste Amplified MTD é baseado no sistema de amplificação mediado por transcrição reversa e utiliza o 16S (rRNA) como alvo da detecção. Isto, teoricamente, poderia tornar a técnica mais sensível, devido ao alto número de rRNA presente em cada célula da bactéria (aproximadamente 2.000 cópias). Os produtos amplificados são detectados por uma sonda de DNA, marcada com uma molécula quimioluminescente. O procedimento pode ser realizado em duas horas e 30 minutos (min). Este sistema é aprovado para utilização em amostras pulmonares com baciloscopia positiva e negativa, porém não disponibiliza controle interno para monitorar a presença de inibidores (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

O teste Amplicor baseia-se em uma PCR e o DNA da micobactéria é amplificado com "primers" específicos da região do gene que codifica o rRNA 16S. Os produtos amplificados hibridizam com uma sonda e são reconhecidos por um conjugado formado de avidina-peroxidase. Os produtos desta ligação são então detectados pela coloração que é produzida quando a peroxidase reage com o seu substrato. Neste teste, os resultados falsos positivos, produzidos por contaminações com amplicons, podem ser reduzidos pelo uso de dUTP e a uracil-N-glicosilase, além disso, possíveis inibições podem ser detectadas com o uso de

um controle interno. O teste pode ser desenvolvido em seis a sete horas. Este sistema é aprovado somente para a utilização em amostras clínicas pulmonares com baciloscopia positiva (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

Mesmo não sendo aprovados para a utilização em amostras extrapulmonares, vários estudos avaliaram a acurácia destes métodos comerciais no diagnóstico da TB pleural. Em uma meta-análise foram avaliados quatro estudos que utilizaram o teste Amplicor e seis estudos que utilizaram o teste Amplified MTD, todos testados em amostras de líquido pleural. Os estudos apresentaram uma elevada especificidade, de aproximadamente 95 a 100% (média de 98% - IC 95%, 96%-98%), mas em contraste a sensibilidade foi baixa e bastante heterogênea, pois variou de 20% a 100% (média de 62% - IC 95%, 43%-77%). Esta meta-análise concluiu que os métodos comerciais possuem um potencial para confirmar a TB pleural, mas devido à variável sensibilidade não devem ser usados para excluir a doença (PAI *et al.*, 2004).

Outros dois trabalhos, mais recentes, também avaliaram o potencial diagnóstico do teste Amplicor utilizando amostras de líquido pleural. Em um destes estudos, foram analisadas 111 amostras, 57 de TB pleural. A especificidade encontrada foi alta (98%), mas a sensibilidade foi de apenas 17,5%, assim o teste mostrou-se menos sensível que a cultura, que apresentou uma sensibilidade de 24,6%. Dividindo os pacientes em grupos, de acordo com resultados de baciloscopia, cultura e exame histopatológico da biópsia, os autores concluíram que a sensibilidade é altamente dependente da concentração de bacilos (MOON *et al.*, 2005). Em outro estudo foram analisadas 512 amostras de líquido pleural, mas apenas 25 amostras de pacientes com TB pleural e, encontrou-se uma sensibilidade de 68% e especificidade de 98,1% (MICHOS *et al.*, 2006).

Utilizando amostras de fragmentos pleurais, um estudo analisou 74 amostras (em parafina) com o teste comercial Amplified MTD. Baseando-se nos resultados histopatológicos e de cultura, foi observado que 57 eram de pacientes com TB e pelo teste de AAN encontraram uma sensibilidade de 52,6% e especificidade de 100% (RUIZ-MANZANO *et al.*, 2000).

1.5.6 Métodos “in house”

Os ensaios padronizados em laboratórios são comumente utilizados nos países em desenvolvimento, pois os kits comerciais possuem um elevado custo. Os métodos “in house” possuem protocolos bastante diversos, mas de forma geral, a amplificação por PCR e a região alvo IS6110 são as estratégias mais utilizadas. Uma das grandes diferenças entre os protocolos é o método de detecção dos produtos amplificados (FLORES *et al.*, 2005).

Em uma meta-análise, avaliando o diagnóstico de TB pleural pelos métodos de AAN, foram analisados 26 estudos que utilizaram metodologias “in-house” em amostras de líquido pleural. Neste estudo, observou-se que estes testes são muito heterogêneos, pois tanto a sensibilidade (20% a 100%) como a especificidade (53% a 100%) apresentaram grande variação (PAI *et al.*, 2004). Outra recente meta-análise, avaliou 20 estudos de técnicas “in-house” e também observou esta grande diferença na sensibilidade e especificidade. No entanto, mostrou que a especificidade é relativamente maior (89%) quando os testes utilizam a seqüência alvo IS6110 (DINNES *et al.*, 2007).

Ambos os estudos concluíram que os testes de AAN não podem ser substituídos pelos testes convencionais, mas precisam ser interpretados em paralelo com os achados clínicos e os resultados de outros testes diagnósticos. Assim, devido principalmente a esta elevada heterogeneidade encontrada, a aplicabilidade clínica dos testes “in-house” ainda não está clara (PAI *et al.*, 2004; DINNES *et al.*, 2007). PAI *et al.* (2004) relataram que esta heterogeneidade está significativamente relacionada ao tipo de estudo utilizado (transversal ou caso controle) e a seqüência alvo utilizada para amplificação. Já DINNES *et al.* (2007) relataram que a heterogeneidade está correlacionada ao local em que o estudo foi realizado (laboratório ou hospital) e a utilização de cegamento nas análises.

Na Tabela 1 estão listados vários estudos que utilizaram métodos “in-house” com amplificação por PCR e com “primers” da região IS6110 em amostras de líquido pleural. Podem ser observados o número de amostras analisadas, a referência padrão de diagnóstico utilizada e as respectivas sensibilidades (S) e especificidades (E).

Tabela 1 – Estudos realizados para o diagnóstico de tuberculose pleural utilizando métodos “in-house” com amplificação por PCR e região alvo IS6110 em amostras de líquido pleural.

Referência	N de amostras testadas (com TB/ sem TB)	Referência padrão de diagnóstico	S	E
LASSENCE <i>et al.</i> (1992)	15/10	Cultura / biópsia	60%	100%
QUEROL <i>et al.</i> (1995)	21/86	Cultura / biópsia	81%	98%
CHAN <i>et al.</i> (1996)	25/76	Cultura	44%	99%
MANGIAPAN <i>et al.</i> (1996)	17/25	Cultura / biópsia	76%	100%
TAN <i>et al.</i> (1997)	16/49	Cultura / clínico	100%	88%
VILLENA <i>et al.</i> (1998)	33/98	Cultura / biópsia	42%	99%
ALMEDA <i>et al.</i> (2000)	9/16	Cultura / clínico	89%	100%
PARANDAMAN <i>et al.</i> (2000)	30/20	Baciloscopia / cultura	100%	70%
PORTILLO-GÓMEZ <i>et al.</i> (2000)	17/56	Cultura / biópsia	94%	100%
VILLEGAS <i>et al.</i> (2000)	42/70	Cultura / biópsia	74%	90%
GUNISHA <i>et al.</i> (2001)	4/26	Cultura	25%	96%
LIMA <i>et al.</i> (2003)	45/13	Cultura / biópsia	31%	97%
CHAKRAVORTY <i>et al.</i> (2005)	53/16	Cultura / biópsia	75,5%	94%
ANIE <i>et al.</i> (2007)	69/71	Cultura / clínico	87%	93%
LIU <i>et al.</i> (2007)	53/110	Cultura / biópsia	43%	95,5%
TRAJMAN <i>et al.</i> (2007)	78/27	Cultura / biópsia / clínico	82%	85%

S= sensibilidade / E = especificidade

O uso combinado da técnica de PCR com outros métodos de diagnóstico também já foi avaliado. Estudos avaliaram a associação de PCR com ADA (VILLEGAS *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2003) ou de PCR com INF- γ (VILLEGAS *et al.*, 2000), ambos testados em amostras de líquido pleural e, observaram que a sensibilidade aumentou quando comparada com as técnicas isoladas. Outro estudo observou que a associação de uma técnica de PCR “in house” com métodos convencionais também aumentou a sensibilidade do diagnóstico. A técnica de PCR foi realizada em amostras de líquido pleural e isoladamente mostrou uma sensibilidade de 44,4%. Quando combinada com a cultura do líquido pleural a sensibilidade aumentou para 51,9% e a maior sensibilidade encontrada foi entre a associação da PCR com o histopatológico da biópsia pleural (70,3%) (LIU *et al.*, 2007).

Amostras de fragmentos de pleura são menos utilizadas pelas técnicas de amplificação do que o líquido pleural, mas alguns estudos mostraram bons resultados. TAKAGI *et al.* (1998) utilizaram a técnica de PCR com a região alvo IS6110 e analisaram 47 amostras de fragmentos de pleura, 19 com TB pleural. Comparando com os resultados histopatológicos e clínicos encontraram uma sensibilidade de 89% e especificidade de 100%. HASANEEN *et al.* (2003) analisaram 45 amostras de fragmentos pleurais, 26 com TB pleural, também por PCR (IS6110). Utilizando a cultura e o exame histopatológico como referências, encontraram uma sensibilidade de 90% e especificidade de 100%.

Baseando-se nas hipóteses de que os macrófagos que migram para as áreas inflamatórias podem retornar ao sangue com os bacilos fagocitados, ou ainda, que os bacilos podem escapar dos alvéolos para o sangue, alguns estudos foram realizados com o objetivo de detectar *M. tuberculosis* por PCR em amostras de sangue. Para a extração de DNA, estes estudos utilizaram amostras de sangue total ou a camada de leucócitos. A sensibilidade encontrada variou de 24% a 44% para pacientes com TB pulmonar e imunocompetentes (ROLFS *et al.*, 1995; FOLGUEIRA *et al.*, 1996; AHMED *et al.*, 1998; TACI *et al.*, 2003).

No entanto, em pacientes vivendo com HIV/Aids, esta sensibilidade pode ser maior (82%), pois alguns achados sugerem que a redução das células CD4 parece ter um importante papel na disseminação hematogênica do bacilo,

principalmente em pacientes com menos de 200 células/ μ L (FOLGUEIRA *et al.*, 1996). Especificamente para o diagnóstico de TB pleural, não foram encontrados dados publicados analisando a acurácia da detecção de *M.tuberculosis* por PCR em amostras de sangue.

1.5.6.1 Hibridização em microplaca

Para as técnicas de hibridização em microplaca, a PCR é realizada com “primers” biotinilados e os produtos amplificados biotinilados ligam-se a uma sonda previamente fixada na microplaca. Além de possuir um protocolo simples, o que torna adequada a sua utilização em rotinas de laboratório, esta técnica permite que o sinal da hibridização seja mensurado por densidade óptica (DO). Assim, após ser definido um valor de corte (“cut-off”), pode ser realizada uma distinção clara entre os resultados positivos e negativos (YAM *et al.*, 2004). Outra vantagem é que a técnica de hibridização pode ser 10 vezes mais sensível que a detecção por eletroforese em gel (KOX *et al.*, 1996).

Alguns estudos utilizaram a hibridização em microplaca para a detecção de *M. tuberculosis* diretamente de amostras clínicas e observaram resultados promissores (CHO *et al.*, 1995; KOX *et al.*, 1996; YAM *et al.*, 2004), contudo, poucos estudos avaliaram esta técnica para o diagnóstico da TB pleural. KOX *et al.* (1996) analisaram 172 amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares, destas 48 eram líquidos pleurais, porém este trabalho não apresentou os resultados obtidos pelo tipo de amostra e não calculou a acurácia do teste. YAM *et al.* (2004) analisaram 659 amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares, mas somente 17 líquidos pleurais. Os resultados também não foram apresentados pelo tipo de amostra e assim, de forma geral, encontraram uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 100%.

1.5.7 PCR em tempo real

Para realizar a detecção dos produtos amplificados por uma PCR convencional, é necessário esperar o término da reação. Entretanto, esta tecnologia da PCR foi aprimorada para uma detecção no momento em que a

reação está ocorrendo, sendo que a amplificação e a detecção ocorrem no mesmo tubo (PARASHAR *et al.*, 2006). Esta técnica é conhecida como PCR em tempo real e, devido à combinação de excelente acurácia, baixo risco de contaminação, protocolos simples e rapidez, vem sendo utilizada como uma alternativa para a PCR convencional (ESPY *et al.*, 2006).

Atualmente, existe uma variedade de equipamentos para PCR em tempo real disponíveis no mercado. Cada equipamento possui as suas características quanto ao método de detecção utilizado, o número máximo de amostras por corrida, o volume máximo de reação e o tempo médio de cada corrida. O método de detecção pode variar em cada equipamento e, de forma geral as metodologias mais utilizadas envolvem moléculas que emitem fluorescência (ESPY *et al.*, 2006).

Sistemas como “TaqMan” e “Molecular beacons” utilizam sondas que hibridizam especificamente na região interna do produto da PCR formado e, por possuírem moléculas fluorescentes ligadas a esta sonda, emitem um sinal de fluorescência. O sistema “Sybr Green” utiliza uma molécula fluorescente, que possui uma fluorescência não detectável quando está na sua forma livre, mas quando se liga ao DNA fita dupla emite um sinal que é detectado pelo equipamento. Este sistema possui a vantagem de não precisar de um par de “primers” específicos para esta metodologia e não utiliza sonda, possuindo assim um custo mais acessível que outros sistemas (PARASHAR *et al.*, 2006).

Ao utilizar o sistema “Sybr Green”, o equipamento da PCR em tempo real permite que seja realizada uma curva de dissociação. Com esta curva pode ser analisada a temperatura (T_m) na qual metade do fragmento amplificado está dissociado (ou seja, em fita simples). Assim, baseando-se na quantidade de G+C e no tamanho dos fragmentos, é possível identificar se fragmentos inespecíficos (como dímeros de “primers”) estão sendo amplificados (ESPY *et al.*, 2006).

A técnica de PCR em tempo real vem sendo utilizada em amostras de TB, para diferentes finalidades; pode ser aplicada na quantificação da concentração bacilar, principalmente para o monitoramento do tratamento (DESJARDIN *et al.*, 1998; DESJARDIN *et al.*, 1999; HELLYER *et al.*, 1999), na detecção de resistência aos fármacos (TORRES *et al.*, 2000; VIEDMA *et al.*, 2002; VAN

DOORN *et al.*, 2003; MARÍN *et al.*, 2004; WADA *et al.*, 2004) e na identificação de espécies de *Mycobacterium* (LACHNIK *et al.*, 2002; SHRESTHA *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2008).

A detecção de *M. tuberculosis* por PCR em tempo real, com a finalidade de diagnóstico, está sendo avaliada para diferentes formas de TB, tais como; pulmonar (LEMAITRE *et al.*, 2004; BURGRAFF *et al.*, 2005; HILLEMANN *et al.*, 2006; POUNDER *et al.*, 2006; DROUILLON *et al.*, 2007; KIBIKI *et al.*, 2007), ganglionar (VAN COPPENRAET *et al.*, 2004), óssea (KOBAYASHI *et al.*, 2006), meníngea (TAKAHASHI & NAKAYAMA, 2006) e extrapulmonar de forma geral (LEMAITRE *et al.*, 2004; BURGRAFF *et al.*, 2005; POUNDER *et al.*, 2006).

Para o diagnóstico de TB pleural, entretanto, poucos estudos utilizando PCR em tempo real foram realizados até o momento. LEMAITRE *et al.* (2004) analisaram 24 amostras extrapulmonares, mas apenas três de líquido pleural. BURGRAFF *et al.* (2005) analisaram 38 amostras extrapulmonares, mas nenhuma relacionada à TB pleural. POUNDER *et al.* (2006) analisaram sete amostras extrapulmonares, mas sem especificar de qual natureza.

Em um estudo utilizando amostras de biópsia, foram comparados um kit de PCR em tempo real e uma PCR convencional “in-house” para detecção de *M.tuberculosis*. Foram testadas 48 amostras de tecido pulmonar em parafina e, concluiu-se que a PCR em tempo real foi mais sensível (66,7%) do que a PCR tradicional (33,3%) (HILLEMANN *et al.*, 2006).

1.5.8 Resultados falso-positivos e falso-negativos

Para que a técnica de PCR seja executada com sucesso no diagnóstico de doenças, precauções rigorosas são essenciais e devem ser adotadas a fim de evitar resultados falso-positivos e falso-negativos. É necessária a utilização de controles em todas as etapas do processo, para confirmar a obtenção adequada do DNA da amostra clínica, a eficácia da reação de PCR e a ausência de contaminação cruzada com produto de *M. tuberculosis* nos reagentes (BARNES & BARROWS, 1993, NOORDHOEK *et al.*, 1996).

Os resultados falso-positivos ocorrem, principalmente, devido à contaminação no ambiente de trabalho com produtos prévios da PCR (amplicons) (VALENTINE-THON, 2002). No entanto, alguns procedimentos são utilizados para controlar este problema, tais como modificar os amplicons com radiação UV ou fotoquimicamente (CIMINO *et al.*, 1990), isolamento físico de todas as etapas do processo e a autoclavagem dos reagentes (KWOK & HIGUCHI, 1989; NOORDHOEK *et al.*, 1996).

Resultados falso-negativos podem estar relacionados às pequenas quantidades de amostra clínica para o isolamento do DNA, à pequena quantidade de bacilos presentes nas amostras e à presença de substâncias que inibem a DNA polimerase, como heparina, hemoglobina, etanol, fenol, dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetracético sal sódico (EDTA) e acetato de sódio (VALENTINE-THON, 2002). Assim, é aconselhado o uso de um controle interno para verificar a possível inibição da reação de amplificação. Um dos controles internos mais utilizados é um plasmídeo que contém uma seqüência similar, mas não idêntica à seqüência alvo. Ambas as seqüências podem ser amplificadas com o mesmo par de “primers”, mas devido ao tamanho de cada uma é possível diferenciá-las (BURGGRAF & OLGEMÖLLER, 2004).

1.5.9 Recomendações para utilização de novas tecnologias

A incidência global de TB continua a subir 1% a cada ano, assim devido à necessidade de maiores mudanças, em 2006, a OMS publicou um Plano Global (Global Plan to Stop TB: 2006-2015) no qual lista seis elementos para o melhor controle da TB (WHO, 2006 a). Sabe-se que um rápido e acurado diagnóstico é crítico para diminuir a transmissão, evitar casos mais graves da doença e reduzir a mortalidade devido à TB. Desta forma, o desenvolvimento de novos testes diagnósticos faz parte destes seis elementos e é uma das prioridades da OMS (WHO, 2006 b).

Com esta finalidade, a OMS estimula parcerias públicas e privadas para a pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias. O objetivo é que estes testes diagnósticos atendam aos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, para diminuir o risco de transmissão da doença. No entanto, estudos de novos testes

diagnósticos para a TB extrapulmonar também são incentivados, devido às limitações dos métodos convencionais e ao aumento da mortalidade nos casos não diagnosticados e tratados (WHO, 2006 b).

Contudo, mesmo incentivando novos testes diagnósticos, atualmente, existe um consenso da utilização destes testes com cautela. A utilidade clínica dos testes de AAN tem sido discutida e “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) publicou recomendações para a interpretação dos resultados, porém apenas para a TB pulmonar. De forma geral, sugere-se que quando a baciloscopia e os testes de AAN discordarem, as evidências clínicas devem ser consideradas e os testes devem ser repetidos (ATS, 2000).

Com base nestes dados, o II Consenso Brasileiro de Tuberculose não recomenda, no momento, a técnica de PCR na rotina diagnóstica de TB. No entanto, afirma que ela poderá ser utilizada em laboratórios de referência, principalmente naqueles casos que demandarem diagnóstico rápido, considerando-se as características da população estudada, antes da decisão diagnóstica final (BRASIL, 2004).

No caso da TB pleural, devido às reconhecidas limitações dos testes convencionais, novos testes vêm sendo desenvolvidos e testados. Entretanto, uma das maiores limitações destes estudos deve-se ao fato de que a TB pleural não possui um método diagnóstico padrão-ouro, e assim, os resultados dos novos testes podem ser influenciados pelo método de referência utilizado (PAI & LING, 2008). Atualmente, mesmo com suas limitações, o uso combinado dos métodos convencionais é reconhecido como a melhor referência padrão para a avaliação da acurácia destes novos testes (TRAJMAN *et al.*, 2008).

Os resultados dos diferentes estudos sugerem que os testes de AAN podem contribuir para um diagnóstico mais efetivo e em menos tempo da TB pleural. No entanto, as evidências mostram que estes testes não podem ser substituídos pelos métodos de diagnósticos comumente utilizados. Eles devem ser empregados e interpretados em conjunto com os testes convencionais e os dados clínicos (PAI & LING, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Como descrito anteriormente, os sinais e sintomas da TB pleural e as características do líquido pleural são comuns a várias outras doenças (TARANTINO, 2002). Além disso, os métodos tradicionais de diagnóstico são pouco acurados. Devido a estas dificuldades, na prática clínica, o derrame pleural com etiologia de TB é muitas vezes caracterizado como indeterminado, ou a TB pleural é diagnosticada apenas por critérios clínicos (KAISERMANN *et al.*, 2004). Entretanto, isto pode resultar na ausência de um tratamento específico para a TB, ou no uso equivocado de fármacos anti-TB (PAI & LING, 2008).

Assim, métodos alternativos para o diagnóstico da TB pleural, como os testes de AAN, vêm sendo avaliados. Estudos mostram que a detecção de DNA de *M. tuberculosis* em amostras extrapulmonares, como o líquido pleural, têm demonstrado uma alta variabilidade de resultados, dificultando uma avaliação da sua utilidade no diagnóstico de TB pleural (PAI *et al.*, 2004). Apesar de existirem testes moleculares comerciais para o diagnóstico da doença, o que poderia minimizar esta variabilidade dos resultados, o seu emprego na rede de saúde pública é discutível, principalmente, por questões de custo e pelo fato de serem aprovados apenas para a análise em amostras pulmonares.

Desta forma, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a contribuição de duas metodologias moleculares, não comerciais, no diagnóstico de TB pleural. Primeiramente, avaliou-se a hibridização e detecção colorimétrica em microplaca, que possui um protocolo simples e permite uma clara distinção entre os resultados positivos e negativos. Posteriormente, utilizou-se a PCR em tempo real, uma metodologia inovadora que possibilita uma amplificação e detecção mais sensível e em menor tempo. Sabe-se que para o diagnóstico da TB pleural frequentemente torna-se necessário a realização de um procedimento invasivo para a coleta das amostras, como a biópsia pleural. Desta forma, como alternativa para uma coleta menos invasiva, foi avaliada a contribuição da PCR em tempo real quando utilizada em associação com a cultura, ambos os métodos realizados no líquido pleural. Adicionalmente, devido à característica paucibacilar do líquido pleural também foi avaliada a contribuição de mais de um tipo de amostra clínica do mesmo paciente para o diagnóstico de TB pleural.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a detecção de DNA de *M. tuberculosis* em diferentes amostras clínicas (líquido pleural, fragmento de pleura e soro) de pacientes com suspeita de TB pleural e, comparar os resultados obtidos com o diagnóstico final para avaliar a contribuição dessa metodologia no diagnóstico de TB pleural.

3.2 Objetivos específicos

- Utilizar uma metodologia de PCR “in house” e testar o protocolo de hibridização e detecção colorimétrica em microplaca para a amplificação de DNA de *M. tuberculosis* em diferentes amostras clínicas;
- Padronizar e testar um protocolo de PCR em tempo real utilizando o sistema “Sybr Green” para detecção de *M. tuberculosis* em diferentes amostras clínicas;
- Calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da PCR em tempo real para cada tipo de amostra;
- Realizar uma análise da PCR em tempo real em paralelo com cultura, ambos realizados no líquido pleural, e calcular a sensibilidade, intervalo de confiança (IC) e VPN da associação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo descritivo transversal de avaliação de teste diagnóstico. A análise das amostras foi realizada com cegamento, ou seja, todos os testes laboratoriais foram realizados sem conhecimento do diagnóstico.

4.2 Local do estudo

A coleta das amostras e os exames de bioquímica, citologia, baciloscopia, cultura e histopatológico foram realizados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As amostras clínicas foram então encaminhadas ao Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) onde foram realizadas as técnicas moleculares.

4.3 Período do estudo e número de amostras

A coleta das amostras foi realizada no período de janeiro de 2003 a julho de 2005, sendo que durante este período 161 pacientes atenderam aos critérios de inclusão para participar do estudo.

4.4 População elegível para o estudo

Foram elegíveis os pacientes com suspeita clínico-radiológica de derrame pleural líquido, encaminhados ao Setor de Métodos Especiais do Instituto de Doenças do Tórax do HUCFF/UFRJ com objetivo de diagnóstico.

4.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os pacientes que atenderam aos seguintes critérios no momento da coleta das amostras:

1. Apresentar condições clínicas para o procedimento de toracocentese e biópsia pleural (estabilidade hemodinâmica e/ou Karnofski igual ou superior a 50%) e, ser possível realizar a coleta de líquido pleural.
2. Não possuir história clínica de coagulopatia.
3. Não ser portador de insuficiência cardíaca descompensada e/ou síndromes edemigênicas (síndromes nefróticas, hepatotóxicas).
4. Não estar utilizando esquema de tratamento para TB por mais de uma semana nos últimos três meses, antes da coleta das amostras.
5. Não ser gestante.
6. Idade acima de 18 anos.
7. Concordar em participar do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos das análises de acurácia dos testes diagnóstico os pacientes:

1. Cujo diagnóstico final não foi definido pela análise do líquido pleural e/ou do fragmento de pleura e, que foram considerados indeterminados e excluídos pela falta de informações para o seguimento clínico do seu desfecho diagnóstico.

4.5 Coleta de dados

Após prévio consentimento, foram coletadas informações através de entrevista com todos os participantes do estudo. Os dados do instrumento de coleta (Apêndice 2) foram armazenados em uma planilha do programa Excel.

4.6 Critérios para o diagnóstico

4.6.1 Critérios para o diagnóstico de tuberculose pleural (Padrão-ouro)

Os pacientes foram considerados com diagnóstico de TB pleural se atenderam a um dos seguintes critérios:

1. Diagnóstico confirmado de TB pleural: Presença de baciloscopia positiva e/ou cultura positiva para TB, no líquido pleural e/ou no fragmento pleural e/ou no escarro induzido, e/ou identificação histopatológica do granuloma, associado ou não a necrose caseosa.
2. Diagnóstico presumptivo ou clínico: Quando o paciente estivesse com suspeita clínica e radiológica de TB pleural, mas os exames da investigação foram todos inconclusivos e, que apresentou cura completa do quadro clínico e radiológico após o tratamento exclusivo com o esquema RHZ por três meses.

4.6.2 Critérios para o diagnóstico de outras doenças

Nos pacientes que não apresentaram diagnóstico final de TB pleural, outras doenças foram confirmadas de acordo com os seguintes critérios:

1. O diagnóstico de infecção respiratória inespecífica viral ou bacteriana foi realizado com base nos achados clínicos, radiográficos e laboratoriais, associados com uma evolução favorável após tratamento específico com antimicrobiano e/ou medidas de suporte clínico.
2. O diagnóstico de câncer de pulmão foi realizado a partir de exames citológicos e estudos de anatomia patológica.
3. O diagnóstico de síndrome edemigênica foi estabelecido se o derrame pleural foi caracterizado como transudato através de parâmetros clínicos, associados à avaliação radiológica e ao diagnóstico laboratorial diferencial de acordo com os critérios de Light (LIGHT *et al.*, 1972).
4. O diagnóstico de LES foi estabelecido através do teste de Fator Anti Nuclear associado a sinais e sintomas compatíveis com a doença.

4.7 Coleta e processamento das amostras

Primeiramente foi realizada uma análise radiológica, sendo adotado o critério radiológico quanto ao volume de líquido, para a classificação dos derrames (TARANTINO, 2002). A toracocentese e biópsia pleural fechada por agulha de Cope foram realizadas segundo rotina do Serviço de Pneumologia do HUCFF/UFRJ, com as quais foram coletados aproximadamente 10 mL de líquido pleural e oito fragmentos pleurais.

Os líquidos pleurais foram colocados em tubos apropriados, com citrato de sódio 3,2% e, centrifugados por cinco minutos em uma velocidade de 3000 rotações por minuto (rpm). Após o encaminhamento para os setores de diagnóstico, foram aliqüotados 500 µL do líquido pleural restante, em tubos identificados e congelados em freezer a - 20°C. Os fragmentos pleurais também foram encaminhados para os setores de diagnóstico e, os fragmentos restantes foram armazenados em tubos identificados e congelados a - 20°C.

Foi coletado, de cada paciente, um frasco de 5 mL de sangue, em tubo com ativador de coágulo e gel separador. Este tudo foi colocado em centrífuga para separação do soro, durante cinco minutos a 3000 rpm. Com o soro foi realizado o exame de proteínas totais e frações, LDH e glicose. Após, foram aliqüotados 500 µL em tubos apropriados, identificados e congelados em freezer a - 20°C. O líquido pleural foi considerado como exsudato se atendeu um ou mais dos critérios definidos por LIGHT (LIGHT *et al*, 1972; LIGHT, 1997).

Sempre que possível, os pacientes foram submetidos à realização de escarro induzido. A indução do escarro foi realizada através de nebulização com solução salina a 3%.

4.8 Procedimentos laboratoriais

4.8.1. Testes bacteriológicos

Uma aliqüota de líquido pleural, dois fragmentos pleurais e o escarro induzido (quando disponível) foram encaminhados para o laboratório de Micobacteriologia do HUCFF/UFRJ e submetidos à baciloscopia e cultura para

micobactérias. A baciloscopia foi realizada pelo método de Ziehl-Neelsen e para a cultura de micobactéria utilizou-se o meio LJ. As culturas positivas foram testadas, por métodos bioquímicos, para distinguir *M. tuberculosis* de outras micobactérias não tuberculosas. Todos os procedimentos foram realizados conforme Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994).

4.8.2 Exame histopatológico

Outra alíquota de líquido pleural e três fragmentos pleurais também foram encaminhados para o setor de Anatomia Patológica. As amostras de fragmentos pleurais foram coradas pelo método hematoxilina-eosina, para análise histopatológica. As amostras de líquido pleural foram examinadas por citologia para células malignas, pela técnica de Papanicolau.

4.8.3 Extração de DNA das amostras clínicas

A extração de DNA foi realizada conforme técnica adaptada de BOOM *et al.* (1990), de acordo com o protocolo descrito no Apêndice 3. Para as extrações foi utilizado um controle negativo de extração (tubo contendo apenas o tampão TE – Tris EDTA) e um controle positivo de extração (uma diluição da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* contendo 60 unidades formadoras de colônias – UFC). As amostras de líquido pleural estavam disponíveis em duas alíquotas de 500 µL, assim para estas amostras a extração foi realizada em duplicata.

4.8.4 Amplificação e detecção por hibridização

4.8.4.1 “Primers” utilizados

A reação de amplificação foi realizada com “primers” descritos por HERMANS *et al.* (1990 b). Os “primers” foram construídos com uma molécula de biotina e o fragmento gerado foi de 245 pb. Na Tabela 2 estão listados os “primers” utilizados para amplificação do DNA de *M. tuberculosis*.

Tabela 2 - “Primers”, seqüência, região alvo e posição no genoma de *M. tuberculosis* utilizados para amplificação do DNA.

“Primers”	Seqüência (5’- 3’)	Região alvo	Posição
INS-1 Biotinilado	CGTGAGGGCATCGAGGTGGC	IS6110	631-651
INS-2 Biotinilado	GCGTAGGCGTCGGTGACAAA	IS6110	856-875

4.8.4.2 Condições de amplificação

A PCR foi realizada em um volume de 50 µL, contendo 200 µM de cada dNTPs; 5 µL de tampão 10X; 3 mM de MgCl₂; 40 pmol de cada “primer” (INS-1 e INS-2 biotinilados); 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase e 10 µL de DNA extraído das amostras clínicas. Todas as reações foram realizadas em um aparelho termociclador (PTC 150 Mini Cyclor, MJ Research, Watertown, MA, USA), nas seguintes temperaturas e tempos: 35 ciclos de 94°C por 2 min, 68°C por 2 min e 72°C por 2 min, de acordo com o padronizado por ROSSETTI *et al.* (1997). Para cada corrida de amplificação utilizou-se um controle negativo de reação (mix de PCR contendo água) e um controle positivo (fragmento de 245 pb da região IS6110 clonado em um vetor pAMP-1).

4.8.4.3 Hibridização e detecção colorimétrica em microplaca

Após a amplificação, os fragmentos foram detectados em microplacas (Nunc Immobilizer™ Amino Surface, Nunc A/S, Roskilde, Denmark), para isso utilizou-se uma sonda complementar a uma região interna do produto amplificado (de 747 a 764) com a seguinte seqüência: TTTTTTTTTGCCCCGTCCCGCCGATCTC. Esta sonda foi construída com amina e uma seqüência poli T na região 5’, possibilitando assim a sua ligação na microplaca.

A fixação da sonda na microplaca, bem como a hibridização e a detecção foram realizadas de acordo com o descrito pelo fabricante das microplacas (Nunc Tech Note, 1999, Nunc Immobilizer™ Amino Instruction Protocol, 2005), conforme padronizado por MICHELON *et al.* (submetido à publicação). O protocolo de hibridização e detecção pode ser observado no Apêndice 4.

4.8.4.4 Ponto de corte (“Cut-off”)

Para uma distinção entre os resultados positivos e negativos, um ponto de corte (“cut-off”) foi previamente determinado por MICHELON *et al.* (submetido à publicação). Ao analisar 120 amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares, com resultados negativos na baciloscopia e na cultura, o valor de “cut-off” foi determinado em 0,250. A zona cinza foi estabilizada entre 0,225 e 0,275. Desta forma foram consideradas positivas apenas as amostras que obtiveram valor de absorbância acima de 0,250.

4.8.5 PCR em tempo real

4.8.5.1 “Primers” utilizados

A amplificação por PCR em tempo real foi realizada com os mesmo “primers” descritos na Tabela 2.

4.8.5.2 Condições de amplificação

A PCR foi realizada com o equipamento ABI Prism 7500 system (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) e os produtos amplificados foram detectados pelo marcador “SYBR Green I”. A reação foi padronizada em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) (0.8X); 5 pmol de cada “primer” (INS-1 e INS-2) e 5 µL de DNA extraído das amostras clínicas. As condições de amplificação foram: incubação inicial de 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 68°C por 1 min. Um ciclo final de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min e 95°C por 15 s foi adicionada para gerar a curva de dissociação. Para cada corrida de amplificação utilizou-se um controle negativo de reação (mix de PCR contendo água) e um controle positivo (fragmento de 245 pb da região IS6110 clonado em um vetor pAMP-1).

4.8.5.3 Análise dos fragmentos amplificados

As curvas de amplificação e dissociação foram analisadas com o programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems). Para a análise da curva de amplificação, que representa o sinal de fluorescência vs. o número de ciclos durante a PCR, utilizou-se os parâmetros “threshold” (nível de fluorescência detectável) e “baseline” (limite pré-definido de ciclos de PCR) auto definidos pelo equipamento. Desta forma, foi possível determinar o Ct de cada amostra, ou seja, o ciclo da PCR no qual o sinal de amplificação cruzou o “threshold”. A curva de dissociação foi utilizada para observar a possível amplificação de produtos inespecíficos ou dímeros de “primers”. Nesta curva, para cada amostra, avaliou-se a temperatura em que metade do produto amplificado estava dissociado (T_m).

Apenas foram consideradas positivas as amostras que apresentaram amplificação (possuíam um Ct) e que obtiveram uma T_m igual a dos controles positivos (88,8°C). As amostras de líquido pleural foram testadas em duplicata pelo PCR em tempo real, quando os resultados da duplicata foram discordantes realizou-se a triplicata do teste.

4.8.5.4 Sensibilidade analítica do teste

Para determinar o limite de detecção da PCR em tempo real foi realizada uma suspensão de cultura da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis*, com turvação compatível com o tubo número 1 da escala de McFarland e, a partir desta realizou-se uma diluição seriada (de 1 a 10). Um volume de 100 μ L de cada diluição foi semeado em meio LJ. Com este mesmo volume de cada diluição, também foi realizada a extração de DNA, pelo método descrito anteriormente no item 4.8.3 e posteriormente amplificado com o método padronizado de PCR em tempo real.

4.8.6 Teste de inibição da PCR

As amostras com resultados negativos na PCR foram testadas para a presença de inibidores. Para isto foi realizada uma PCR com os mesmos “primers” descritos na tabela 2 e as mesmas condições de amplificação descritas

no item 4.8.4.2. No entanto, para cada amostra também foram adicionados 10 fg de um controle interno (fragmento de 600 pb clonado em um vetor pAMP-1). Os resultados foram observados após eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo e visualizado em luz UV (CORTEZ-HERRERA *et al.*, 2008).

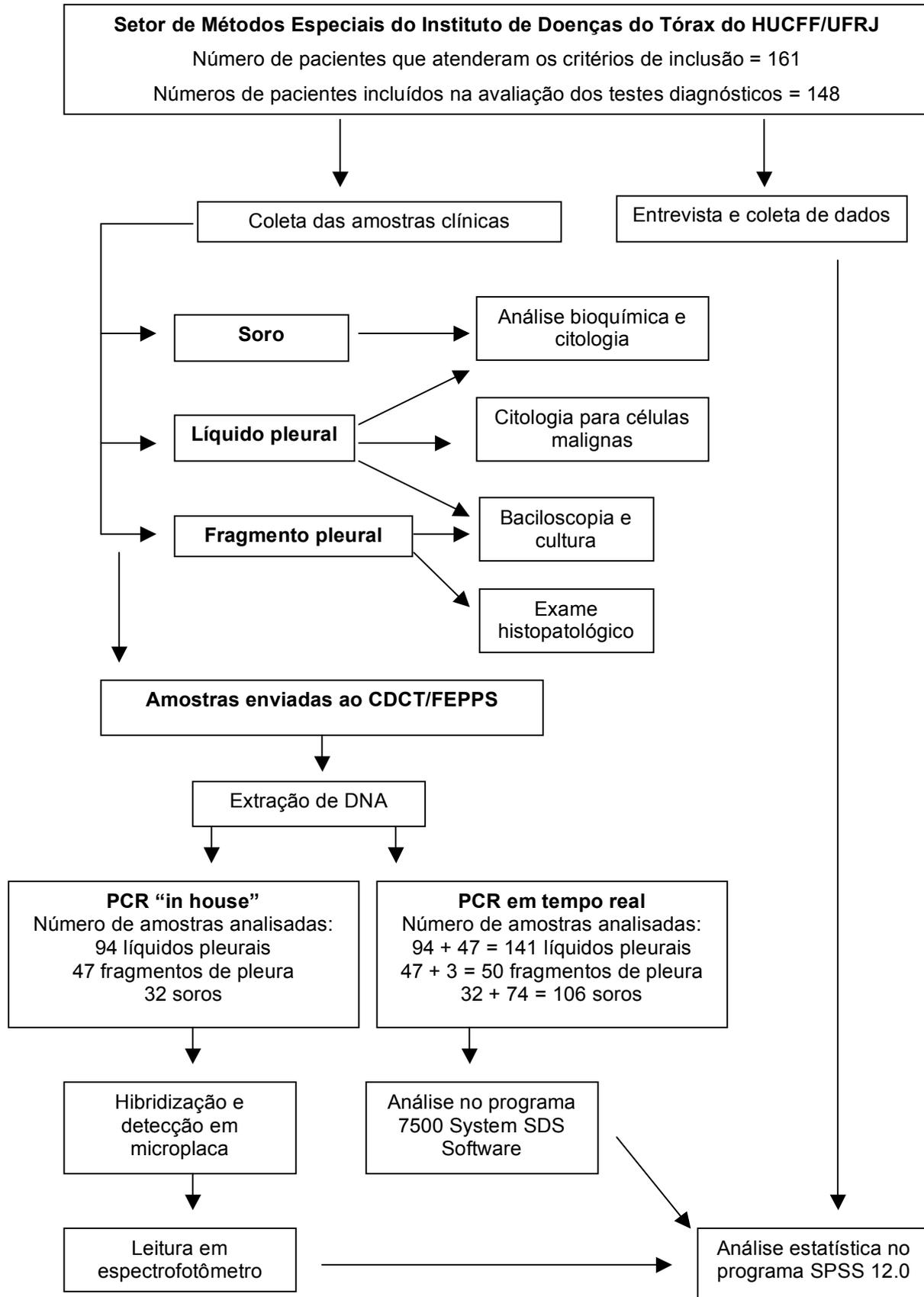
4.9 Análise estatística

A comparação entre as frequências dos grupos foi realizada utilizando o teste Chi-quadrado. Calculou-se a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos métodos diagnósticos, e para cada sensibilidade foi estimado o intervalo de confiança (IC) de 95%. As análises em paralelo foram realizadas utilizando a seguinte fórmula: Sensibilidade (S) do método A com método $B = S_{\text{método } A} + S_{\text{método } B} - (S_{\text{método } A} \times S_{\text{método } B})$ (MEDRONHO *et al.*, 2006). O VPN para diferentes prevalências foi realizado baseando-se em taxas descritas na literatura (VALDES *et al.*, 2003). As análises foram realizadas no programa estatístico SPSS versão 12.0 (SPSS Ins. Chicago, IL, USA).

4.10 Considerações éticas

Aos pacientes elegíveis foram dadas informações detalhadas sobre o estudo e os que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1). O projeto referente a este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FEPPS de acordo com o parecer número 15/2006.

4.11 Fluxograma do estudo e número de amostras analisadas



5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da população de estudo

Durante o período de estudo, 161 pacientes com achados clínicos e radiológicos suspeitos de derrame pleural atenderam aos critérios de inclusão para participarem do estudo. Cento e sete (66,5%) pacientes apresentaram diagnóstico final de TB pleural e 41 (25,5%) apresentaram diagnóstico de outra doença. Treze (8,0%) pacientes obtiveram diagnóstico como indeterminado, desta forma 148 pacientes foram incluídos na avaliação dos testes diagnósticos. O diagnóstico e as características demográficas dos 161 pacientes elegíveis para o estudo podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Diagnóstico e características demográficas dos 161 pacientes elegíveis para o estudo.

Diagnóstico	N total = 161	Sexo masculino	Idade (anos)
	N (%)	N (%)	(Média ± DP)
Tuberculose	107 (66,5%)	75 (70,1%)	36,97 ± 14,31
Confirmado	103 (64,0%)	73 (70,9%)	37,36 ± 14,36
Presumptivo	4 (2,5%)	2 (50,0%)	27,00 ± 9,59
Não tuberculose	41 (25,5%)	25 (61,0%)	60,71 ± 14,85
Câncer	31 (19,3%)	18 (58,1%)	62,60 ± 15,67
Derrame parapneumônico	6 (3,7%)	4 (66,7%)	51,50 ± 12,82
LES	1 (0,6%)	0 (0%)	60,0 ± 0
Síndrome edemigênica	3 (1,9%)	3 (100%)	50,70 ± 1,53
Etiologia indeterminada	13 (8,0%)	8 (61,5%)	53,23 ± 19,66

N = número de amostras; DP = desvio padrão; LES = lúpus eritematoso sistêmico.

Entre os pacientes com TB pleural, a média de idade foi de 36,97 ± 14,31 anos (mínima de 18 e máxima de 74 anos) e 70,1% (75/107) eram do sexo masculino. Noventa e um (85%) dos 107 pacientes demonstraram na radiografia de tórax, derrame unilateral de tamanho médio a moderado e, todos os derrames eram exudativos. Entre os pacientes com TB pleural, 24,3% (26/107) relataram

contato, nos últimos três anos, com pacientes que apresentavam TB pulmonar. Dos 161 pacientes incluídos, o resultado do teste anti-HIV (ELISA) estava disponível para 37 (23%) pacientes; 32 com diagnóstico de TB pleural (sete anti-HIV positivo) e cinco com diagnóstico de outras doenças (todos anti-HIV negativos).

5.2 Avaliação dos métodos convencionais

A TB pleural foi confirmada em 96% (103/107) dos pacientes através dos métodos bacteriológicos ou histopatológicos e, assim estes pacientes foram considerados com TB pleural confirmada. Quatro pacientes apresentaram resultados negativos nos testes bacteriológicos e histopatológicos, mas o diagnóstico clínico (presumitivo) para TB pleural foi estabelecido. O rendimento dos métodos convencionais para os diferentes tipos de amostras no diagnóstico dos 107 pacientes com TB pleural, pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Rendimento dos métodos convencionais para o diagnóstico dos 107 pacientes com TB pleural.

Métodos de diagnóstico/ Amostras clínicas	TB pleural confirmada N total = 103 (N positivas/ N analisadas)	TB pleural clínica N total = 4 (N positivas/ N analisadas)	TB pleural total N total = 107 (N positivas/ N analisadas)
Baciloscopia			
Líquido pleural	1/99 (1,0%)	0/4	1/103 (0,97%)
Fragmento de pleura	1/101 (0,99%)	0/4	1/105 (0,95%)
Escarro induzido	2/56 (3,57%)	0/3	2/59 (3,39%)
Cultura			
Líquido pleural	29/97 (29,89%)	0/4	29/101 (28,71%)
Fragmento de pleura	69/101 (68,31%)	0/4	69/105 (65,71%)
Escarro induzido	13/52 (25,00%)	0/3	13/55 (23,63%)
Exame histopatológico	95/102 (93,14%)	0/4	95/106 (89,62%)

N = número de amostras

5.3 Hibridização e detecção colorimétrica em microplaca

Das 94 amostras de líquido pleural testadas pela técnica de PCR “in house” e detecção colorimétrica através da hibridização em microplaca, 65 eram de pacientes com diagnóstico de TB pleural, e em cinco amostras observou-se resultado positivo. Das 47 amostras de fragmentos pleurais analisadas, 32 eram de pacientes com diagnóstico de TB pleural, e cinco amostras apresentaram resultado positivo na detecção colorimétrica. Das 32 amostras de soro testadas, 19 eram de pacientes com diagnóstico final de TB pleural, e nenhuma apresentou resultado positivo na detecção colorimétrica. Na Figura 3, pode ser observada uma fotografia de uma microplaca após hibridização e detecção colorimétrica.

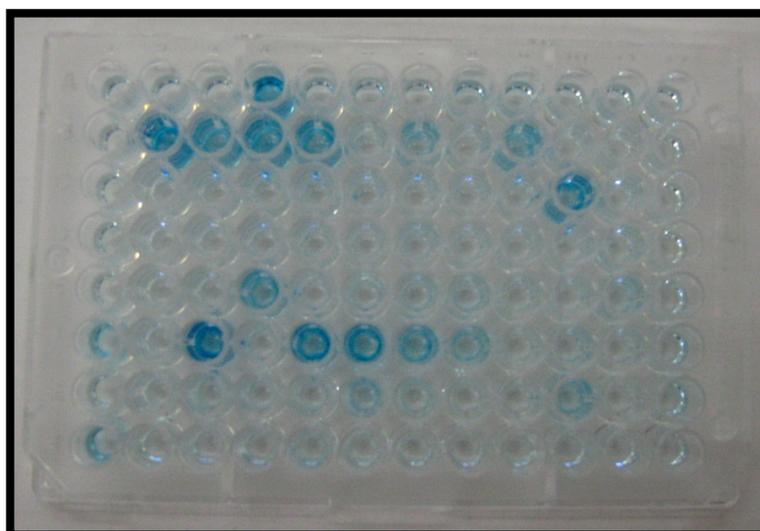


Figura 3 – Fotografia de uma microplaca após hibridização e detecção colorimétrica.

5.4 Padronização da PCR em tempo real

Para a padronização da PCR em tempo real foram testadas diferentes concentrações de “primers”, números de ciclos de amplificação e volume de DNA extraído das amostras clínicas. Assim, a reação foi padronizada para obter a melhor cinética de amplificação, ou seja, para que a menor quantidade possível de DNA presente em uma amostra pudesse ser amplificada, sem formar produtos inespecíficos e dímeros de “primers”. Após o teste de sensibilidade analítica da

PCR em tempo real padronizada, observou-se que o teste foi capaz de detectar, aproximadamente, 60 UFC, sendo que a diluição seguinte, que apresenta 10 UFC não foi detectada pelo teste.

Na Figura 4, está um exemplo de uma curva de amplificação, na qual podem ser observados os Ct das diferentes amostras que apresentaram amplificação. Também podem ser observadas algumas curvas de amostras que não amplificaram, pois não obtiveram a fluorescência mínima para cruzarem o “threshold”. As amplificações das amostras clínicas que obtiveram resultado positivo ocorreram entre os Ct 13 e 38. Na Figura 5, está um exemplo da curva de dissociação obtida nos testes, na qual pode ser observada apenas uma Tm para todas as amostras amplificadas.



Figura 4 – Exemplo de uma curva de amplificação da PCR em tempo real.

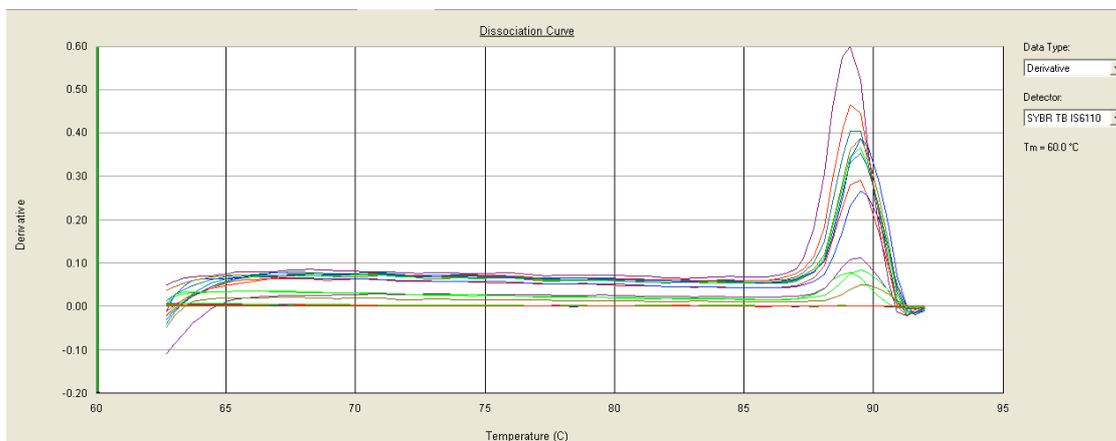


Figura 5 – Exemplo de uma curva de dissociação da PCR em tempo real.

5.5 Sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real

As mesmas amostras analisadas pela hibridização e detecção colorimétrica também foram analisadas pela técnica de PCR em tempo real. Na Tabela 5, podem ser observadas as diferenças de positividade entre os testes de hibridização e detecção colorimétrica e PCR em tempo real.

Tabela 5 – Comparação dos resultados entre as técnicas de hibridização e detecção colorimétrica em microplaca e PCR em tempo real obtidos nas amostras de líquido pleural, fragmento de pleura e soro.

Amostras clínicas (N TB pleural / N analisadas)	Hibridização em microplaca (N positivas)	PCR em tempo real (N positivas)
Líquido pleural (65/94)	05	33
Fragmento de pleura (32/47)	05	17
Soro (19/32)	00	01

N = número de amostras

Além destas amostras, a PCR em tempo real também foi aplicada em mais 47 amostras de líquido pleural, três fragmentos de pleura e 74 soros. Assim, o total de amostras analisadas por PCR em tempo real foi de 141 líquidos pleurais, 50 fragmentos de pleura e 106 soros. Desta forma, a maioria (141) dos 148 pacientes incluídos nas análises de avaliação dos testes diagnóstico possuíam amostras de líquido pleural disponível para serem testadas pela PCR em tempo real, mas nem todas as amostras de fragmento de pleura e de soro estavam disponíveis para os testes moleculares.

Das 141 amostras de líquido pleural analisadas, 100 eram de pacientes com diagnóstico final de TB pleural e destas, 46 foram positivas na PCR em tempo real. Nenhuma amostra com outro diagnóstico apresentou resultado positivo na PCR em tempo real. Assim, calculou-se uma sensibilidade de 46% (IC 95%, 36%-56%) e especificidade de 100%. A PCR em tempo real do líquido pleural foi positiva em três dos quatro pacientes que apresentaram resultados

negativos em todos os testes diagnósticos, mas que o diagnóstico de TB pleural foi estabelecido pelo critério clínico.

Das 50 amostras de fragmentos de pleura analisadas, 38 eram de pacientes com diagnóstico final de TB pleural e destas, 16 foram positivas na PCR em tempo real. Nenhuma amostra de um paciente com outro diagnóstico, que não TB pleural, apresentou resultado positivo na PCR em tempo real. Assim, calculou-se uma sensibilidade de 42% (IC 95%, 26%-59%) e especificidade de 100%. Das 106 amostras de soros analisadas, 77 eram de pacientes com diagnóstico final de TB pleural e destas, duas amostras foram positivas na PCR em tempo real. Assim, calculou-se uma sensibilidade de 2,6% (IC 95%, 1%-6%) e especificidade de 100%.

Na Tabela 6, pode ser observada a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da PCR em tempo real para os diferentes tipos de amostras testadas. Na Figura 6, pode ser observado o VPN da técnica de PCR em tempo real para as amostras de líquido pleural ou fragmento de pleura baseando-se na prevalência de TB entre pacientes com derrame pleural. Nesta figura observa-se que quanto menor a prevalência da doença, maior será o VPN. Para a população estudada, a qual possui uma prevalência de aproximadamente 65% de TB, encontrou-se um VPN de 50% para a técnica de PCR em tempo real testada em amostras de líquido pleural e de 48% para amostras de fragmento de pleura.

Tabela 6 – Sensibilidade, especificidade e valores preditivos da PCR em tempo real para diferentes tipos de amostras.

Amostras clínicas (N TB pleural / N amostras analisadas)	S	E	VPP	VPN
Líquido pleural (100/141)	46%	100%	100%	43%
Fragmento de pleura (38/50)	42%	100%	100%	35%
Soro (77/106)	2,6%	100%	100%	28%

N = número de amostras; S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo.

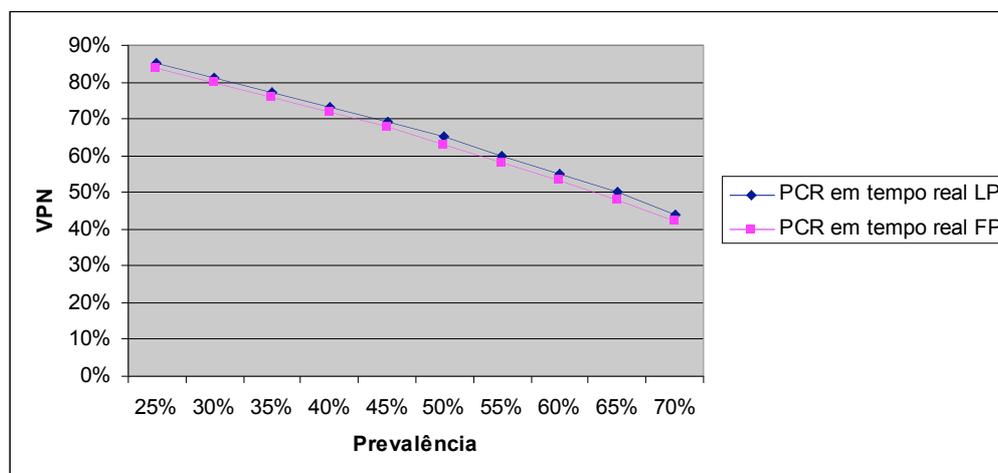


Figure 6 – Valor preditivo negativo (VPN) da PCR em tempo real para amostras de líquido pleural (LP) ou fragmento de pleura (FP) de acordo com a prevalência de TB pleural em pacientes com derrame pleural.

5.6 Teste de inibição

O teste de inibição foi realizado em todas as amostras com resultado negativo em ambos os protocolos de PCR utilizados neste estudo. De todas as amostras testadas, quatro amostras de líquido pleural apresentaram inibição e assim foram excluídas das análises de acurácia dos testes moleculares. Observou-se que estas quatro amostras eram de pacientes com TB pleural, de acordo com o padrão-ouro estabelecido. Para as amostras de fragmento de pleura e soro nenhuma amostra apresentou inibição pela PCR. Na Figura 7, pode ser observado o resultado em eletroforese de uma PCR para testar inibição.

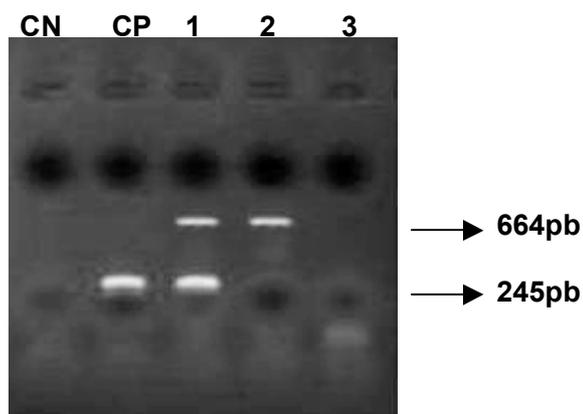


Figura 7 – Teste de inibição da PCR. Eletroforese realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizada em transiluminador UV. CN: controle negativo da reação. CP: controle positivo da reação. Canaleta 1: amostra clínica positiva para *M. tuberculosis* (245 pb) amplificada juntamente com o controle interno (664 pb). Canaleta 2: amostra clínica negativa para *M. tuberculosis* amplificada juntamente com o controle interno (664 pb). Canaleta 3: amostra clínica com inibição, pois o fragmento correspondente ao controle interno não pôde ser visualizado.

5.7 Análise da sensibilidade da PCR em tempo real e dos métodos convencionais

Na Tabela 7, pode ser observada a sensibilidade, o IC e o VPN dos métodos isolados e da combinação entre PCR em tempo real e cultura realizada no líquido pleural e também da PCR em tempo real realizada em ambas as amostras. Esta análise em paralelo de dois métodos foi realizada considerando um resultado positivo em um dos dois métodos como indicativo de um diagnóstico positivo para TB pleural.

Considerando apenas amostras de líquido pleural, a cultura combinada com a PCR em tempo real mostrou uma sensibilidade de 60% (IC 95%, 50%-70%) e assim foi significativamente mais sensível que apenas a cultura (29% - IC 95%, 20%-38%). Com a PCR em tempo real foi possível detectar TB pleural em 33 pacientes que apresentaram resultados negativos na cultura. Quando

consideradas apenas amostras de fragmento de pleura, o exame histopatológico apresentou a maior sensibilidade (90% - IC 95%, 84%-96%). Quando considerados os dois tipos de amostras (líquido pleural e fragmento de pleura) de um mesmo paciente, a PCR em tempo real realizada nas duas amostras do mesmo paciente obteve uma sensibilidade de 72% (IC 95%, 55%-88%).

Tabela 7 – Sensibilidade, intervalo de confiança e valor preditivo negativo dos métodos isolados e das análises em paralelo.

Amostras clínicas e métodos de diagnóstico	S	IC 95%	VPN
(N com TB pleural/N amostras analisadas)			
Líquido pleural (LP)			
Baciloscopia (103/154)	1%	---	---
Cultura (101/151)	29%	20% - 38%	39%
PCR tempo real (100/141)	46%	36% - 56%	43%
PCR tempo real + cultura (96/138)	60%	50% - 70%	53%
Fragmento de pleura (FP)			
Baciloscopia (105/144)	1%	---	---
Cultura (105/144)	66%	56% - 75%	57%
Histopatológico (106/145)	90%	84% - 96%	90%
PCR tempo real (38/50)	42%	26% - 59%	35%
Líquido pleural + fragmento de pleura (LP + FP)			
PCR tempo real LP + PCR tempo real FP (32/50)	72%	55% - 88%	67%

N = número de amostras; S = sensibilidade; IC = intervalo de confiança; VPN = valor preditivo negativo; LP = líquido pleural; FP = fragmento de pleura.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico da TB pleural possui várias limitações e permanece um desafio na prática clínica. Esta dificuldade tem levado à busca de novos métodos de diagnóstico que poderão otimizar a abordagem dos pacientes com derrame pleural e suspeita de TB. Assim, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a contribuição de um método alternativo no diagnóstico de TB pleural. Para isso, duas metodologias de PCR (hibridização e detecção colorimétrica em microplaca e PCR em tempo real) foram utilizadas na detecção de DNA de *M. tuberculosis* em diferentes amostras clínicas.

Uma das dificuldades em determinar a causa de um derrame pleural deve-se, principalmente, à grande variedade de doenças que podem ocasionar este derrame. Desta forma, mesmo com o advento de critérios específicos e da aplicação de novas técnicas de diagnóstico, cerca de 10 a 20% dos casos permanecem sem diagnóstico etiológico definido, mesmo depois de esgotados os métodos diagnósticos atualmente disponíveis e, assim são caracterizados como derrames pleurais de origem indeterminada (VILLENA *et al.*, 2002). Neste estudo, dos 161 pacientes recrutados, 13 (8,0%) foram excluídos da avaliação dos testes de diagnóstico, pois ao final das investigações o derrame pleural permaneceu com etiologia desconhecida.

A etiologia do derrame pleural varia conforme a prevalência das doenças na região estudada. Segundo VALDÉS *et al.* (2003), em países da Europa, como na Espanha e na França, a TB pleural representa 23% a 25% dos casos de derrame pleural, já nos Estados Unidos uma frequência muito inferior é reportada (aproximadamente 5%). Em outro extremo, em países da África até 85% dos casos de derrame pleural podem ser devido à TB. A prevalência de TB no Brasil é alta, em 2006 calculou-se 55 casos para 100.000 habitantes (WHO, 2008), sendo que a TB pleural representa, aproximadamente, 6% de todos os casos (BARREIRA, D. Comunicação pessoal. Dados GT-SINAN 2006).

Neste estudo, dos 161 pacientes com derrame pleural, 107 (66,5%) apresentaram diagnóstico final de TB pleural. Esta alta prevalência foi similar a outros dois estudos também realizados com pacientes da cidade do Rio de

Janeiro; KAISEMANN *et al.* (2004) e TRAJMAN *et al.* (2007) estudaram um grupo de 137 pacientes e encontraram uma prevalência de 72%. Mas a prevalência encontrada foi maior do que a identificada por NEVES *et al.* (2007), a qual foi de 48% ao estudarem 215 pacientes. No presente estudo, a segunda maior causa de derrame pleural foi o câncer, que acometeu 31 (19,3%) dos 161 pacientes. Este dado também está de acordo com outros trabalhos realizados no Brasil; KAISEMANN *et al.* (2004) e TRAJMAN *et al.* (2007) encontraram uma prevalência de 13% e NEVES *et al.* (2007) de 19% para câncer.

Observou-se que a idade dos pacientes foi associada às diferentes etiologias. A TB pleural foi associada com uma idade mais jovem ($36,97 \pm 14,31$), enquanto as outras etiologias foram associadas com uma maior idade ($60,71 \pm 14,85$). Outros estudos também descreveram que a TB pleural acomete principalmente pessoas jovens, com menos de 45 anos (VILLENA *et al.*, 2002; IBRAHIM *et al.*, 2005). Também, como já relatado na literatura (LOPES *et al.*, 2006), a maioria dos pacientes com TB pleural (85%) apresentaram derrame unilateral e com volume que variou de pequeno a moderado.

Neste estudo, os métodos bacteriológicos realizados no líquido pleural apresentaram uma sensibilidade de apenas 1% para a baciloscopia e de 29% para a cultura. O teste com maior capacidade de detectar casos de TB pleural foi o exame histopatológico do fragmento de pleura (90%), seguido da cultura do fragmento (66%). Esta baixa positividade para as amostras de líquido pleural e um melhor rendimento para as amostras de fragmento já eram esperados (CHAKRABARTI & DAVIES, 2006; GOPI *et al.*, 2007).

Como observado, os métodos convencionais como baciloscopia e cultura, apresentam limitações quanto à demora na obtenção dos resultados e ao baixo rendimento. Mesmo com a análise histopatológica do fragmento, que atualmente é considerado o melhor método diagnóstico de TB pleural, os resultados podem ser negativos em, aproximadamente, 10% dos casos. Além disso, principalmente em países com menor prevalência de TB, o diagnóstico pelo exame histopatológico deve ser avaliado com atenção, pois a demonstração do granuloma também pode ser observada em outras doenças. Desta forma,

doenças causadas por fungos, sarcoidose, artrite reumatóide e infecção por *Nocardia* devem ser excluídas (GOPI *et al.*, 2007).

Para a realização das técnicas de amplificação, inicialmente é necessário realizar a extração dos ácidos nucleicos presentes nas amostras clínicas, sendo esta uma etapa fundamental na acurácia do teste. Neste estudo, optou-se por uma extração realizada sem auxílio de kits comerciais, e sim com reagentes preparados no próprio laboratório. A metodologia de extração utilizada já havia sido padronizada pelo laboratório (CDCT) e mostrado bons resultados com amostras de escarro (MICHELON *et al.* – submetido à publicação).

Esta metodologia baseia-se na propriedade do DNA ligar-se às partículas de sílica na presença de agentes caotrópicos, como o hidrocloreto de guanidina. Além de ser uma metodologia simples e rápida, possui a vantagem de um baixo custo, pois se estima um custo em reagentes de R\$ 0,50 para cada amostra, enquanto que nas extrações que utilizam kits comerciais este custo é de R\$15,00 por amostra aproximadamente.

Teoricamente, a purificação em colunas é o método que deixa o DNA mais purificado e sem inibidores e, assim pode apresentar uma maior sensibilidade do que outras metodologias (ALDOUS *et al.*, 2005). Desta forma, neste estudo, inicialmente foi realizado um teste em que alíquotas de 500 µL de amostras de líquido pleural, sabidamente negativas para TB, foram contaminadas com 100 µL de cada diluição seriada (de 1 a 10) realizada com uma cultura da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* (ver item 4.8.5.4). Cada uma destas amostras foi processada de acordo com a metodologia de extração utilizada neste trabalho (Apêndice 3) e também com o kit “Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, Santa Mônica, Califórnia) e após foram amplificadas pelas duas metodologias de PCR testadas neste trabalho. Ao comparar os resultados, não observou-se diferença na sensibilidade entre os dois métodos de extração (resultados não mostrados).

Como região alvo para amplificação utilizou-se a seqüência de inserção IS6110. Este alvo é específico para o complexo *M. tuberculosis* e está presente de 4 a 20 vezes em mais de 95% das linhagens de *M. tuberculosis*. Assim, estudos mostram que as técnicas de PCR que utilizam este alvo podem ser mais

sensíveis (PAI *et al.*, 2004) e específicas (DINNES *et al.*, 2007), quando comparadas com protocolos que utilizam outras seqüências para a amplificação.

Inicialmente, a proposta deste trabalho era avaliar a utilidade da técnica de hibridização e detecção colorimétrica em microplaca, em diferentes amostras clínicas, no diagnóstico de TB pleural. Esta técnica foi escolhida, pois a detecção por gel de agarose e a hibridização em membranas possuem limitações intrínsecas, devido aos procedimentos bastante laboriosos e interpretação subjetiva dos resultados. Com o objetivo de superar estas limitações, técnicas de hibridização em microplaca vêm sendo desenvolvidas e avaliadas no diagnóstico de TB. Esta técnica já havia sido testada em 303 amostras de escarro induzido e a sensibilidade e especificidade encontrada para o diagnóstico de TB pulmonar foi de 88% e 98% respectivamente (MICHELON *et al.* – submetido à publicação). No entanto, como observado esta técnica quando utilizada em amostras clínicas para o diagnóstico de TB pleural, não obteve resultados satisfatórios.

Diante destes resultados, buscou-se uma metodologia que possibilitasse um aumento na sensibilidade. Como alternativa, uma técnica de PCR em tempo real foi padronizada e testada nas amostras clínicas. Como sistema de detecção optou-se pelo “Sybr Green”, devido ao menor custo e a facilidade de implementação da técnica. A molécula de “Sybr Green” emite fluorescência quando intercalada em DNA de fita dupla e esta fluorescência é detectada pelo equipamento. Outros sistemas, que utilizam sondas, podem ser mais específicos que o “Sybr Green”, no entanto, analisando a curva de dissociação pode ser observado claramente se amplificações inespecíficas estiveram ocorrendo.

No teste de sensibilidade analítica da PCR em tempo real, observou-se que o teste foi capaz de detectar, aproximadamente, 60 UFC, sendo este teoricamente o limite de detecção do teste. No entanto, ressalta-se uma limitação deste teste, pois como esta diluição seriada é realizada na proporção de 1/10, a diluição seguinte ao limite de detecção encontrado apresentou, aproximadamente, 10 UFC e, assim não pôde ser detectada pelo teste. Porém, acredita-se que existe um intervalo entre 60 UFC e 10 UFC que pode ser detectado pelo teste.

Ao comparar os resultados obtidos nas amostras testadas pelas duas técnicas de amplificação (hibridização em microplaca e PCR em tempo real),

observou-se que com a PCR em tempo real ocorreu um significativo aumento na positividade, como pode ser observado na Tabela 5. HILLEMANN *et al.* (2006) testaram outro tipo de amostra (amostras histopatológicas de tecido pulmonar) para detecção de *M. tuberculosis*, mas também encontraram que a PCR em tempo real pode ser duas vezes mais sensível do que uma PCR convencional. Além da maior sensibilidade, a PCR em tempo real possui as vantagens de menor risco de contaminação e de ser uma técnica simples e rápida, podendo se obter resultados em até duas horas após a extração de DNA.

Após observar estes resultados, a técnica de hibridização em microplaca não foi mais utilizada neste estudo e o restante das amostras foram testadas apenas pela técnica de PCR em tempo real. Os resultados mostraram que para o total de 141 amostras de líquidos pleurais testadas a PCR em tempo real obteve sensibilidade de 46% e especificidade de 100%. Uma baixa sensibilidade da PCR quando testada em amostras de líquido pleural já havia sido encontrada por outros trabalhos, a qual variou de 17% a 44% (CHAN *et al.*, 1996; VILLENA *et al.*, 1998; GUNISHA *et al.*, 2001; NAGESH *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2003; MOON *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007). Outro estudo, também realizado com amostras de pacientes da cidade do Rio de Janeiro avaliou a técnica de PCR em 105 amostras de líquido pleural e encontrou uma sensibilidade de 82%, sendo assim superior a encontrada neste estudo, no entanto, a especificidade encontrada foi de 85%.

Um resultado de baixa sensibilidade no líquido pleural era esperado devido ao fato de que o derrame pleural, nos pacientes com TB, ocorre como resultado de uma reação de hipersensibilidade tardia às proteínas do bacilo, e não devido à presença de *M. tuberculosis* no espaço pleural. Assim, como o número de bacilos no líquido pleural normalmente é baixo, acredita-se que os resultados falso-negativos devem-se principalmente a esta natureza paucibacilar do líquido pleural. Também, pode ter ocorrido uma distribuição irregular dos bacilos nas amostras durante a homogeneização. Entretanto, mesmo não sendo possível identificar todos os casos de TB pleural, os resultados mostraram que a PCR em tempo real quando realizada com líquido pleural foi mais sensível do que qualquer outro teste aplicado neste tipo de amostra (baciloscopia e cultura).

Dos 107 pacientes com TB pleural, apenas 32 apresentavam resultado de anti-HIV disponível, pois este não é um exame realizado rotineiramente no setor do HCFF/UFRJ, no qual este estudo foi realizado. Assim, não foi possível realizar associações entre a co-infecção HIV/TB pleural e os resultados dos métodos de diagnóstico. No entanto, sabe-se que o HIV altera a apresentação clínica da TB pleural e, desta forma pacientes com a co-infecção podem apresentar amostras de líquido ou fragmento de pleural com maior número de bacilos, aumentando a positividade nos testes.

A avaliação da eficiência de um método de diagnóstico alternativo é conduzida com referência ao melhor teste padrão disponível, que é conhecido como “padrão-ouro”. No caso da TB pleural e de outras formas paucibacilares da infecção por *M.tuberculosis*, o “padrão-ouro” (cultura e exame histopatológico) pode apresentar significativas limitações (VILLEGAS *et al.*, 2000). Assim, neste estudo o diagnóstico de TB pleural foi baseado nos exames bacteriológicos, histopatológicos e também em achados clínicos (melhora clínica após três meses de tratamento com fármacos anti-TB). Em países com alta incidência de TB, como no Brasil, o quadro clínico de TB pleural tem alto VPP. Entretanto, há um risco maior de uso equivocado de fármacos potencialmente tóxicos por período prolongado nos países em que a prevalência de TB é mais baixa (KAISEMANN *et al.*, 2004). No presente estudo, apenas quatro pacientes obtiveram diagnóstico de TB pleural baseado nos achados clínicos, contudo a PCR em tempo real testada em amostras de líquido pleural, foi positiva em três destes pacientes, representando assim um ganho sobre o “padrão-ouro”.

Para amostras de fragmento pleural analisadas por PCR em tempo real observou-se uma sensibilidade de 42% e especificidade de 100%. Até o momento, poucos estudos utilizando este tipo de amostra para o diagnóstico por PCR foram encontrados na literatura. Em dois estudos, que utilizaram PCR “in house”, também se observou uma alta especificidade, porém a sensibilidade foi de, aproximadamente, 90% (TAKAGI *et al.*, 1998; HASANEEN *et al.*, 2003).

Um recente estudo, realizado com amostras de fragmentos pleurais em parafina utilizou uma técnica de PCR em tempo real para detecção de *M. tuberculosis*. Ao comparar os resultados com o diagnóstico clínico, observou uma

sensibilidade de 68% e uma especificidade de 73% (BABA *et al.*, 2008). Quando os estudos utilizam fragmentos pleurais em parafina, torna-se necessário adicionar uma etapa inicial para desparafinar as amostras. No entanto, já foi observado que técnicas de PCR utilizando estas amostras apresentam uma menor sensibilidade, devido à inibição na PCR, quando comparadas com a utilização de fragmentos frescos (RUIZ-MANZANO *et al.*, 2000; HASANEEN *et al.*, 2003). Neste estudo, foram utilizados fragmentos pleurais sem parafina e, isto pode ter colaborado para que nenhuma amostra apresentasse inibição na PCR.

Quando amostras de fragmento de pleura são utilizadas em comparação com amostras de líquido pleural, a chance de obter resultados positivos podem ser maiores, pois na TB pleural o bacilo localiza-se preferencialmente no tecido, causando a infecção. Porém, esta maior sensibilidade em amostras de fragmentos pleurais não foi observada no presente estudo, isto pode ter ocorrido, pois mesmo que o bacilo localize-se preferencialmente no tecido pleural este tipo de material também pode ser paucibacilar. Outra causa da baixa sensibilidade também pode ser o pequeno tamanho disponível da amostra. O material disponível para a análise era apenas um fragmento de cada paciente, de 2 mm aproximadamente, assim, a extração de DNA desta pequena amostra pode ter sido insuficiente e isto pode ter comprometido os resultados. Nos estudos que encontraram uma maior sensibilidade para a PCR em amostras de fragmento de pleura, foram analisados de dois a três fragmentos por paciente de 2 mm cada (TAKAGI *et al.*, 1998; HASANEEN *et al.*, 2003).

Dos 106 pacientes que possuíam amostras de soro para serem analisadas, 77 eram de pacientes com diagnóstico final de TB pleural. Na PCR em tempo real, apenas duas destas amostras apresentam resultado positivo, sendo que estes pacientes já apresentavam resultados positivos de PCR em tempo real tanto para o líquido pleural como para o fragmento de pleura. Neste estudo, uma das abordagens iniciais era avaliar se amostras obtidas de formas menos invasivas poderiam ser úteis no diagnóstico de TB pleural. Entretanto, para esta finalidade estavam disponíveis apenas amostras de soro, com as quais não se obteve um bom resultado. Como observado na literatura, a utilização de amostras de sangue total seriam mais apropriadas, pois com estas seria possível realizar a

extração de DNA presente nos leucócitos, que são as células preferencialmente infectadas por *M. tuberculosis* quando está na corrente sanguínea (FOLGUEIRA *et al.*, 1996; AHMED *et al.*, 1998; TACI *et al.*, 2003).

Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico de TB, alternativas como a detecção de *M. tuberculosis* em mais de um tipo de amostra clínica do mesmo paciente (REBOLLO, *et al.*, 2006) ou a associação da técnica de PCR com métodos convencionais (LIU *et al.*, 2007) vêm sendo utilizadas. No presente estudo, um método convencional (cultura) e um método alternativo (PCR em tempo real), ambos utilizando amostras de líquido pleural, foram avaliados individualmente e em conjunto. Esta análise em paralelo explorou uma combinação de métodos a qual oferecem uma opção que pode ser utilizada como alternativa para um diagnóstico com uma coleta de amostra menos invasiva que a biópsia pleural.

Quando o único tipo de amostra disponível for o líquido pleural, a combinação entre PCR em tempo real e cultura mostrou ser a melhor opção de diagnóstico, detectando 60% dos casos. Com esta associação, dos 96 pacientes com TB pleural analisados, 33 foram diagnosticados apenas pela PCR em tempo real, pois apresentaram resultados negativos na cultura. Estes resultados suportam a utilização da PCR em tempo real no líquido pleural como uma das primeiras opções de diagnóstico, nos casos em que se suspeita de TB pleural, mas o acesso a procedimentos como a biópsia pleural estiver limitado.

No caso de estarem disponíveis apenas amostras de fragmento pleural, a melhor opção de diagnóstico neste estudo foi o exame histopatológico. Para a coleta das amostras de fragmento pleural é necessário um procedimento mais invasivo que a toracocentese. Neste estudo, sempre que possível, foi realizada a técnica de biópsia pleural por agulha, utilizando a agulha de Cope. Segundo as Diretrizes Brasileiras para Tuberculose (BRASIL, 2004), a biópsia está indicada apenas nos casos de derrame pleural exsudativo que permanecerem com etiologia desconhecida. Assim, os exames de microbiologia, citologia e PCR devem ser preferencialmente realizados nas amostras de escarro e líquido pleural. Entretanto, quando os resultados destes exames forem negativos e o

diagnóstico permanecer inconclusivo, a análise do fragmento pleural pode ser necessária e bastante útil para a definição do caso.

Uma das vantagens da PCR é a rapidez para obter os resultados. Desta forma, a PCR em tempo real para o líquido pleural e para o fragmento de pleura, de um mesmo paciente, também foi analisada. Com esta técnica observou-se que dos 38 pacientes com TB analisados, 13 pacientes apresentaram resultado positivo apenas no líquido pleural, nove apenas no fragmento de pleura e, seis apresentaram resultado positivo em ambas as amostras, totalizando 28 pacientes com resultados positivos pela PCR em tempo real. Assim, para as amostras analisadas em conjunto, a sensibilidade da PCR em tempo real foi de 72%. Estes resultados poderiam ter sido ainda melhores se todas as amostras de fragmentos pleurais coletadas pudessem ter sido analisadas. No entanto, sempre foi dada prioridade para os exames laboratoriais de rotina (cultura, histopatológico), assim, eventualmente, o fragmento pleural coletado de alguns pacientes foi insuficiente para a realização dos testes moleculares.

A técnica de PCR em tempo real apresentou VPN de 43% e VPP de 100% quando testada em amostras de líquido pleural e, VPN de 35% e VPP de 100% quando testada em amostras de fragmento de pleura. Embora a técnica apresente um baixo VPN, o qual indica que uma PCR com resultado negativo não pode ser utilizada para excluir totalmente um caso de TB pleural, o VPP indica que um resultado positivo na PCR em tempo real é bastante confiável.

É importante ressaltar que a sensibilidade e especificidade de um determinado teste diagnóstico não dependem da população ou localidade em que o teste será utilizado, pois são características do teste. Assim, se o teste for realizado conforme padronizado espera-se resultados reprodutíveis e constantes. Diferentemente, o VPP e o VPN são variáveis dependentes da prevalência da doença na população em que o teste será empregado. Desta forma, também foi calculado os VPN das técnicas testadas considerando-se diferentes prevalências de TB pleural em pacientes com derrame pleural, utilizando-se para isso valores de prevalência descritos na literatura. Assim, como pode ser observado nas Figuras 6, 8 e 9, quando o teste é utilizado em cenários de menor prevalência de TB maior será VPN.

Em conclusão, este trabalho confirmou que os testes de AAN possuem alta especificidade e VPP e, esta característica confere um grande benefício para confirmar a TB pleural. Porém, como possuem uma sensibilidade heterogênea e baixo VPN, um resultado negativo não pode excluir a TB pleural e a investigação deve continuar (PAI & LING, 2008). Ainda, ressalta-se que quando estes testes são empregados e interpretados em conjunto com os testes convencionais um aumento na sensibilidade pode ser observado.

7. CONCLUSÕES

- A técnica de hibridização e detecção colorimétrica em microplaca apresentou uma sensibilidade muito baixa quando realizada em amostras extrapulmonares para o diagnóstico de TB pleural.
- Ao comparar a PCR em tempo real com a hibridização e detecção colorimétrica em microplaca, observou-se que com a PCR em tempo real foi possível aumentar a sensibilidade do diagnóstico de TB pleural, utilizando amostras de líquido pleural ou fragmento de pleura. Para as amostras de soro, observou-se que estas não são úteis no diagnóstico de TB pleural.
- A técnica de PCR em tempo real, analisada isoladamente, não obteve uma alta sensibilidade e VPN, assim não deve ser utilizada para excluir os casos de TB. Entretanto, o teste pode ser útil para confirmar os casos de TB pleural devido à alta especificidade e VPP.
- A PCR em tempo real do líquido pleural apresentou uma sensibilidade de 46% e pode ser útil como uma ferramenta extra para um diagnóstico mais rápido e específico de TB pleural. Este método quando associado à cultura da mesma amostra em 60% dos casos analisados poderia não haver necessidade da realização de um procedimento invasivo para coleta das amostras, como a biópsia pleural, Entretanto, é importante salientar que o uso da PCR na prática clínica deve ser avaliado considerando todas as peculiaridades da doença em cada região, bem como do serviço que está disponibilizando o teste. Em conclusão, sugere-se que os resultados da PCR em tempo real devem ser interpretados em conjunto com os métodos convencionais e os achados clínicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, N.; MOHANTY, A. K.; MUKHOPADHYAY, U.; BATISH, V. K.; GROVER, S.** PCR-Based Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Blood from Immunocompetent Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(10): 3094–3095, 1998.
- ALDOUS, W. K.; POUNDER, J. I.; CLOUD, J. L.; WOODS, G. L.** Comparison of Six Methods of Extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5): 2471–2473, 2005.
- ALMEDA, J.; GARCIA, A.; GONZALEZ, J.; QUINTO, L.; VENTURA, P. J.; VIDAL, R.; RUFÍ, G.; MARTINEZ, J. A.; JIMENEZ, A. M.T.; TRILLA, A.** Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease*, 19 (11):859-867, 2000.
- ANDERSEN, A. B.; THYBO, S.; GODFREY-FAUSSETT, P.; STOKER, N. G.** Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease*, 12 (12): 922-927, 1993.
- ANIE, Y.; SUMI, S.; VARGHESE, P.; MADHAVI, L. G. K.; SATHISH, M.; RADHAKRISHNAN, V.V.** Diagnostic approaches in patients with tuberculous pleural effusion. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59: 389–394, 2007.
- ANTONANGELO, L. & CAPELOZZI, V. L.** Coleta e preservação do líquido pleural e biópsia pleural. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 32(Supl 4):163-169, 2006.
- ATS** American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161:1371-95, 2000.
- BABA, K.; PATHAK, S.; SVILAND, L.; LANGELAND, N.; HOOPEN, A. A.; ASJO, B.; DYRHOL-RIISE, A. M.; MUSTAFA, T.** Real-time quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded pleural tissue in patients from a high HIV endemic area. *The Diagnostic Molecular Pathology*, 17(2):112-117, 2008.
- BARRERA, L.** Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007*. 1º Edição. *TuberculosisTextbook.com*, 2007.

- BARNES, P. F. & BARROWS, S. A.** Tuberculosis in the 1990's. *Annals of Internal Medicine*, 119(5): 400-410, 1993.
- BATES, J. H.** Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, 1(2):167-174, 1980.
- BAUMANN, M. H.; NOLAN, R.; PETRINI, M.; LEE, Y. C. G.; LIGHT, R. W.; SCHNEIDER, E.** Pleural Tuberculosis in the United States: Incidence and Drug Resistance. *Chest*, 131:1125-1132, 2007.
- BEHR, M. A.; WARREN, S. A.; SALAMON, H.; HOPEWEL, P. C.; PONCE DE LEON, A.; DALEY, C. L; SMALL, P. M.** Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *The Lancet*, 353(9151):444-9, 1999.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; VAN DILLEN, P. M. E.W.; VAN DER NOORDA, J.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3): 495-503, 1990.
- BRASIL.** Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2º Edição. Rio de Janeiro, 1994.
- BRASIL.** Ministério da Saúde. II Consenso Brasileiro de tuberculose. Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30 (Supl 1):1-85, 2004.
- BURGGRAF, S. & OLGEMÖLLER, B.** Simple Technique for Internal Control of Real-Time Amplification Assays. *Clinical Chemistry*, 50(5): 819–825, 2004.
- BURGGRAF, S.; REISCHL, U.; MALIK, N.; BOLLWEIN, M.; NAUMANN, L.; OLGEMÖLLER, B.** Comparison of an Internally Controlled, Large-Volume LightCycler Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples with the COBAS AMPLICOR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4): 1564–1569, 2005.
- CIMINO, G. D.; METCHETTE, K. C.; TESSMAN, J. W.; HEARST, J. E.; ISAACS, S. T.** Post PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 19 (1): 99-107, 1990.
- CHAKRABARTI, B. & DAVIES, P.D.O.** Pleural Tuberculosis. *Monaldi Archive Chest Disease*, 65(1): 26-33, 2006.
- CHAKRAVORTY, S.; SEN, M. K.; TYAGI, J. S.** Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by Smear, Culture, and PCR Using Universal Sample Processing Technology. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9): 4357–4362, 2005.

- CHAN, C. M.; YUEN, K. Y.; CHAN, K. S.; YAM, W. C.; YIM, K. H.; NG, W. F.; NG, M. H.** Single-tube nested PCR in the diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Pathology*, 49:290-294, 1996.
- CHO, S.; VAN DER VLIET, G. M. E.; PARK, S.; BAIK, S.; KIM, S.; CHONG, Y.; KOLK, A. H. J.; KLATSER, P. R.; KIM, J.** Colorimetric Microwell Plate Hybridization Assay for Detection of Amplified *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Sputum Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3): 752–754, 1995.
- COLE, S. T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHUCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HOMSBY, T.; JEGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B. G.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685):537-544, 1998.
- CONDE, M. B.; LOIVOS, A. C.; REZENDE, V. M.; SOARES, S. L. M.; MELLO, F. C. Q.; REINGOLD, A. L.; DALEY, C. L.; KRITSKI, A. L.** Yield of Sputum Induction in the Diagnosis of Pleural Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167:723–725, 2003.
- COOPER, A. & POINAR, H. N.** Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*, 289(5482):1139, 2000.
- CORTEZ-HERRERA, E., SPERHACKE, R. D., BECKER, D., KRITSKI, A., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.** Internal Control in PCR for *Mycobacterium tuberculosis* Usefulness and Improvement of the Diagnosis, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(4): 485-491, 2008.
- DANIEL, T. M.** The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: Can we figure them out? *The International Journal Tuberculosis and Lung Disease*, 4(5):395-400, 2000.
- DANIEL, T. M.** The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100:1862-70, 2006.
- DEL PORTILLO, P.; REYES, A.; SALAZAR, L.; MENÉNDEZ, M. D. C.; GARCÍA, M. J.** Chapter 4: Genomics and Proteomics. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007*. 1º Edição. *TuberculosisTextbook.com*, 2007.

- DESJARDIN, L. E.; CHEN, Y.; PERKINS, M. D.; TEIXEIRA, L.; CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.** Comparison of the ABI 7700 System (TaqMan) and Competitive PCR for Quantification of IS6110 DNA in Sputum during Treatment of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7):1964–1968, 1998.
- DESJARDIN, L. E.; PERKINS, M. D.; WOLSKI, K.; HAUN, S.; TEIXEIRA, L.; CHEN, Y.; JOHNSON, J. L.; ELLNER, J. J.; DIETZE, R.; BATES, J.H.; CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.** Measurement of Sputum *Mycobacterium tuberculosis* Messenger RNA as a Surrogate for Response to Chemotherapy. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, 160:203–210, 1999.
- DHEDA, K.; BOOTH, H.; HUGGETT, J. F.; JOHNSON, M. A.; ZUMLA, A.; ROOK, G. A. W.** Lung Remodeling in Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(7):1201–10, 2005.
- DINNES, J.; DEEKS, J.; KUNST, H.; GIBSON, A.; CUMMINS, E.; WAUGH, N.; DROBNIEWSKI, F.; LALVANI, A.** A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. Chapter 7: Results: detection of pleural tuberculosis infection. *Health Technology Assessment*, 11(3): 61-82, 2007.
- DROUILLON, V.; LAGRANGE, P. H.; HERRMANN, J. L.** Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis by automated extraction and real-time PCR on non-decontaminated pulmonary specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease*, 26(4):291–293, 2007.
- EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T.** Polymerase chain reaction amplification of a repetitive sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infection Disease*, 161 (5):977-981, 1990.
- ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A.; YAO, J. D. C.; WENGENACK, N. L.; ROSENBLATT, J. E.; COCKERILL III, F. R.; SMITH, T. F.** Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1): 165–256, 2006.
- EVANS, D. J.** The use of adjunctive corticosteroids in the treatment of pericardial, pleural and meningeal tuberculosis: Do they improve outcome? *Respiratory Medicine*, 102:793–800, 2008.
- FERNANDES, M. T. D.; ALMEIDA, A. B. S.; NASCIMENTO, D. R.** Memória da Tuberculose: acervo de depoimentos. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ Casa Oswaldo Cruz/ Fundação Nacional de Saúde/ Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/ Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária: 14-15, 1993.

- FERRER, J.** Pleural tuberculosis. *The European Respiratory Journal*, 10:942–947, 1997.
- FERRER, J. & ROLDÁN, J.** Clinical management of the patient with pleural effusion. *European Journal of Radiology*, 34(2):76–86, 2000.
- FLORES, L. L.; PAI, M.; COLFORD JR, J. M.; RILEY, L. W.** In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology*, 5:55, 2005.
- FOLGUEIRA, L.; DELGADO, R.; PALENQUE, E.; AGUADO, J. M.; NORIEGA, A. R.** Rapid Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Bacteremia by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(3): 512–515, 1996.
- GENOFRE, E.; CHIBANTE, A. M. S.; MACEDO, A. G.** Derrame pleural de origem indeterminada. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 32 (Supl 4): 204-210, 2006.
- GOPI, A.; MADHAVAN, S.; SHARMA, S.K.** Diagnosis and Treatment of Tuberculous Pleural Effusion in 2006. *Chest*, 131:880-889, 2007.
- GRECO, S.; GIRARDI, E.; MASCIANGELO, R.; CAPOCETTA, G. B.; SALTINI, C.** Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7(8):777–786, 2003.
- GUNISHA, P.; MADHAVAN, H.N.; JAYANTHI, U.; THERESE, K. L.** Polymerase chain reaction using IS6110 primer to detect *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian Journal Pathology Microbiology*, 44(2): 97-102, 2001.
- HASANEEN, N. A.; ZAKI, M. E.; SHALABY, H. M.; EL-MORSI, A. S.** Polymerase Chain Reaction of Pleural Biopsy Is a Rapid and Sensitive Method for the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusion. *Chest*, 124: 2105–2111, 2003.
- HELLYER, T. J.; DESJARDIN, L. E.; HEHMAN, G. L.; CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.** Quantitative Analysis of mRNA as a Marker for Viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2): 290–295, 1999.
- HERMANS, P. W.; SCHUIJTEMA, A. R.; SOOLINGEN, D. V; VERSTYNNEN, C. P; BIK, E. M.; KOLK, A. H.; VAN EMBDEN, J. D.** Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6):1204-1213, 1990 a.

- HERMANS, P.W.; VAN SOOLINGEN, D.; DALE, J. W.; SCHUITEMA, A. R. J.; MCADAM, R. A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J. D. A.** Insertion Element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a Useful Tool for Diagnosis and Epidemiology of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9): 2051-2058, 1990 b.
- HILLEMANN, D.; GALLE, J.; VOLLMER, E.; RICHTER, E.** Real-time PCR assay for improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissues. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(3): 340–342, 2006.
- IEVEN, M. & GOOSSENS, H.** Relevance of Nucleic Acid Amplification Techniques for Diagnosis of Respiratory Tract Infections in the Clinical Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(2): 242–256, 1997.
- IBRAHIM, W. H.; GHADBAN, W.; KHINJI, A.; YASIN, R.; SOUB, H.; AL-KHAL, A. L.; BENER, A.** Does pleural tuberculosis disease pattern differ among developed and developing countries. *Respiratory Medicine*, 99(8):1038-1045, 2005.
- JIANG, J.; SHI, H.; LIANG, Q.; QIN, S.; QIN, X.** Diagnostic Value of Interferon- γ in Tuberculous Pleurisy. A Metaanalysis. *Chest*, 131:1133–1141, 2007.
- JIMÉNEZ, D.; PEREZ-RODRIGUEZ, E.; DIAZ, G.; FOGUEW, L.; LIGHT, R. W.** Determining the optimal number of specimens to obtain with needle biopsy of the pleura. *Respiratory Medicine*, 96:14-17, 2002.
- KAISEMANN, M. C.; KRITSKI, A. L.; PEREIRA, M. F. C.; TRAJMAN, A.** Dosagem da atividade da adenosina deaminase no líquido pleural para o diagnóstico da tuberculose pleural. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30(6):549-556, 2004.
- KAUFMANN, S. H. E. & VAN EMBDEN, J. D. A.** Tuberculosis: a neglected disease strikes back. *Trends Microbiology*, 1(1):2-5, 1993.
- KIBIKI, G. S.; MULDER, B.; VAN DER VEN, A. J. A. M.; SAM, N.; BOEREE, M. J.; VAN DER ZANDEN, A.; DOLMANS, W. M. V.** Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M. tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid. *Tropical Medicine and International Health*, 12(10):1210–1217, 2007.
- KIRSCH, C. M.; KROE, D. M.; AZZI, R. L.; JENSEN, W. A.; KAGAWA, F. T.; WEHNER, J. H.** The Optimal Number of Pleural Biopsy Specimens for a Diagnosis of Tuberculous Pleurisy. *Chest*, 112:702-706, 1997.

- KOBAYASHI, N.; FRASER, T. G.; BAUER, T. W.; JOYCE, M. J.; HALL, G. S.; TUOHY, M. J.; PROCOP, G. W.** The Use of Real-Time Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of Skeletal Tuberculosis. *Archive Pathology Laboratory Medicine*, 130:1053–1056, 2006.
- KOCAGÖZ, T.; YILMAZ, E.; ÖZKARA, S.; KOCAGÖZ, S.; HAYRAN, M.; SACHEDEVA, M.; CHAMBERS, H. F.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6): 1435-1438, 1993.
- KOLK, A. H. J.; SCHUITEMA, A. R. J.; KUIJPER, S.; VAN LEEUWEN, J.; HERMANS, P. W. M.; VAN EMBDEN, J. D. A.; HARTSKEERL, R. A.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10):2567–2575, 1992.
- KOX, L. F. F.; NOORDHOEK, G. T.; KUNAKORN, M.; MULDER, S.; STERRENBURG, M.; KOLK, A. H. J.** Microwell Hybridization Assay for Detection of PCR Products from *Mycobacterium tuberculosis* Complex and the Recombinant *Mycobacterium smegmatis* Strain 1008 Used as an Internal Control. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9): 2117–2120, 1996.
- KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; MUZY-SOUZA, G.** Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 3ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- KRITSKI, A. & MELO, F. A. F.** Chapter 15: Tuberculosis in Adults. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. 1º Edição. TuberculosisTextbook.com, 2007.
- KWOK, S. & HIGUCHI, R.** Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339:237-238, 1989.
- LACHNIK, J.; ACKERMANN, B.; BOHRSEN, A.; MAASS, S.; DIEPHAUS, C.; PUNCKEN, A.; STERMANN, M.; BANGE, F.** Rapid-Cycle PCR and Fluorimetry for Detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9): 3364–3373, 2002.
- LASSENCÉ, A. ; LECOSSIER, D. ; PIERRE, C.; CADRANEL, J.; STERN, M.; HANCE, A. J.** Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction: comparison of two protocols. *Thorax*, 47(4):265-269, 1992.
- LAZARUS, A. A.; MCKAY, S.; GILBERT, R.** Pleural Tuberculosis. *Disease a Month*, 53:16-21, 2007.

- LEÃO, S. C. & PORTAELS, F.** Chapter 1: History. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. 1^o Edição. TuberculosisTextbook.com, 2007.
- LEMAITRE, N.; ARMAND, S.; VACHEE, A.; CAPILLIEZ, O.; DUMOULIN, C.; COURCOL, R. J.** Comparison of the Real-Time PCR Method and the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Nonpulmonary Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9): 4307– 4309, 2004.
- LIAN, C. K.; LIM, K. H.; WONG, C. M. M.** Tuberculous pleurisy as a manifestation of primary reactivation in a region with a high prevalence of tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3(9): 816-22, 1999.
- LIANG, Q.; SHI, H.; WANG, K. E.; QIN, S.; QIN, X.** Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: A meta-analysis. *Respiratory Medicine*, 102: 744–754, 2008.
- LIGHT, R.W.; MACGRAGOR, M.I.; LUCHSINGER, P.C.; BALL, W. C.** Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Annals of Internal Medicine*, 77(4):507-513,1972.
- LIGHT, R. W.** Diagnostic principles in pleural disease. *European Respiratory Journal*, 10: 476–481, 1997.
- LIGHT, R.W.** Pleural effusion. *New England Journal Medicine*, 346(25):1971-1977, 2002.
- LIGHT, R. W.** The Undiagnosed Pleural Effusion. *Clinical Chest Medicine*, 27: 309– 319, 2006.
- LIM, S.Y.; KIM, B. J.; LEE, M. K.; KIM, K.** Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of *Mycobacterium* species. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 46: 101–106, 2008.
- LIMA, D. M.; COLARES, J. K. B.; FONSECA, B. A. L.** Combined Use of the Polymerase Chain Reaction and Detection of Adenosine. Deaminase Activity on Pleural Fluid Improves the Rate of Diagnosis of Pleural Tuberculosis. *Chest*, 124: 909-914, 2003.
- LIU, K.; SU, W.; PERNG, R.** Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Smear-negative Pleural Tuberculosis. *Journal Chinese Medicine Association*, 70(4): 148–151, 2007.

- LOPES, A. J.; CAPONE, D.; MOGAMI, R.; TESSAROLLO, B.; CUNHA, D. L.; CAPONE, R. B.; SIQUEIRA, H. R.; JANSEN, J. M.** Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão Rio de Janeiro*, 15(4):253-261, 2006.
- LOSI, M.; BOSSINK, A. ; CODECASA, L.; ET AL.** Use of a T-cell interferon- γ release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *European Respiratory Journal*, 30: 1173–1179, 2007.
- MANGIAPAN, G.; VOKURKA, M.; SCHOULS, L.; CADRANEL, J.; LECOSSIER, D.; VAN EMBDEN, J.; HANCE, A. J.** Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5):1209-1215, 1996.
- MARÍN, M.; VIEDMA, D. G.; RUÍZ-SERRANO, M. J.; BOUZA, E.** Rapid Direct Detection of Multiple Rifampin and Isoniazid Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Samples by Real-Time PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11): 4293–4300, 2004.
- MARTÍN, C.; BIGI, F.; GICQUEL, B.** Chapter 10: New Vaccines against Tuberculosis. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007*. 1º Edição. *TuberculosisTextbook.com*, 2007.
- MEDRONHO, R. A.; CARVALHO, D. M.; BLOCH, K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G. L.** *Epidemiologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.
- MICHOS, A. G.; DAIKOS, G. L.; TZANETOU, K.; THEODORIDOU, M.; MOSCHOVI, M.; NICOLAIDOU, P.; PETRIKKOS, G.; SYRIOPOULOS, T.; KANAVAKI, S.; SYRIOPOULOU, V. P.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in respiratory and nonrespiratory specimens by the AmplicorR MTB PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54:121–126, 2006.
- MOON, J. W.; CHANG, Y. S.; KIM, S. K.; KIM, Y. S.; LEE, H. M.; KIM, S. K.; CHANG, J.** The Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Pleural Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 41:660–666, 2005.
- MORISSON, P. & NEVES, D. D.** Evaluation of adenosine deaminase in the diagnosis of pleural tuberculosis: a Brazilian meta-analysis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 34(4):217-224, 2008.
- NAGESH, B. S.; SEHGAL, S.; JINDAL, S. K.; ARORA, S.** Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pleural Fluid. *Chest*, 119:1737-1741, 2001.

- NEVES, D. D.; DIAS, R. M.; CUNHA, A. J. L. A.; CHIBANTE, A. M. S.** Rendimento de variáveis clínicas, radiológicas e laboratoriais para o diagnóstico da tuberculose pleural. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30(4): 409-416, 2004.
- NEVES, D. D.; DIAS, R. M.; CUNHA, A. J. L. A.** Predictive Model for the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusion. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11(1):83-88, 2007.
- NOLTE, F. S.; METCHOCK, B.; MCGOWAN JR, J. E.; EDWARDS, A.; OKWUMABUA, O.; THURMOND, C.; MITCHELL, P. S.; PLIKAYTIS, B.; SHINNICK, T.** Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(7):1777-1782, 1993.
- NOORDHOEK, G. T.; VAN EMBDEN, J. D. A.; KOLK, A. H. J.** Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (10):2522-2525, 1996.
- NUNC.** NucleoLink Procedure for Solid Phase-PCXR, Tech Note, Vol. 5 Nº. 36, 1999.
- NUNC.** Nunc Immobilizer Amino. Instruction Protocol, nº 77102 versão 1.1, 2005.
- PAI, M.; FLORES, L.; HUBBARD, A.; RILEY, L.W.; COLFORD, J.M.** Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Disease*; 4(6):1-14, 2004.
- PAI, M. & LING, D. I.** Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis using nucleic acid amplification tests: what is the evidence? *Future Microbiology*, 3(1): 1-4, 2008.
- PARANDAMAN, V.; NARAYANAN, S.; NARAYANAN, P. R.** Utility of polymerase chain reaction using two probes for rapid diagnosis of tubercular pleuritis in comparison to conventional methods. *Indian Journal Medicine Research*, 112:47-51, 2000.
- PARASHAR, D.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V.D.; KATOCH, V.M.** Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian Journal Medicine Research*, 124: 385-398, 2006.
- PORTILLO-GOMEZ, L.; MORRIS, S. L.; PANDURO, A.** Rapid and efficient detection of extra-pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4(4): 361-370, 2000.

- POUNDER, J. I.; T, ALDOUS, W. K.; WOODS, G. L.** Comparison of real-time polymerase chain reaction using the Smart Cycler and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *M. tuberculosis* complex in clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54: 217–222, 2006.
- QUEROL, J. M.; MINGUEZ, J.; GARCIA-SANCHEZ, E.; FARGA, M. A.; GIMENO, C.; GARCIA-DE-LOMAS, J.** Rapid diagnosis of pleural tuberculosis by polymerase chain reaction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 152:1977-1981, 1995.
- RAJA, A.** Immunology of tuberculosis. *Indian Journal Medicine Research*, 120:213-232, 2004.
- RAVIGLIONE, M. C.** The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis*, 83(1-3): 4-14, 2003.
- REBOLLO, M. J.; GARRIDO, R. S. J.; FOLGUEIRA, D.; PALENQUE, E.; DÍAZ-PEDROCHE, C.; LUMBRERAS, C.; AGUADO, J. M.** Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56:141-146, 2006.
- ROLFS, A.; BEIGE, J.; FINCKH, U.; KÖHLER, B.; SCHABERG, T.; LOKIES, J.; LODE, H.** Amplification of *Mycobacterium tuberculosis* from Peripheral Blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(12): 3312–3314, 1995.
- ROSSETTI, M. L. R.; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S.; MOURA, A. R.; OLIVEIRA, H.; ZAHA, A.** Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *Journal of Microbiology Methods*, 28(2):139-146, 1997.
- ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S.** Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública*, 36(4): 525-532, 2002.
- ROSSI, M. C.; GORI, A.; ZEHENDER, G.; MARCHETTI, G.; FERRARIO, G.; MADDALENA, C.; CATOZZI, L.; BANDERA, A.; ESPOSTI, A. D.; FRANZETTI, F.** A PCR-Colorimetric Microwell Plate Hybridization Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* from Culture Samples and Ziehl-Neelsen-Positive Smears. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5): 1772–1776, 2000.
- RUIZ-MANZANO, J.; MANTEROLA, J.; GAMBOA, F.; CALATRAVA, A.; MONSÓ, E.; MARTÍNEZ, C.; AUSINA, V.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Paraffin-Embedded Pleural Biopsy Specimens by Commercial Ribosomal RNA and DNA Amplification Kits. *Chest*, 118: 648–655, 2000.

- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732): 1350-1354, 1985.
- SALES, R. & ONISHI, R.** Toracocentese e biópsia pleural. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 32(Supl 4):170-173, 2006.
- SEISCENTO, M.; CONDE, M. B.; DALCOLMO, M. M. P.** Tuberculose pleural. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 32(Supl 4):174-181, 2006.
- SHARMA, S.K. & MOHAN, A.** Extrapulmonary tuberculosis. *Indian Journal Medicine Research*, 120:316-353, 2004.
- SHARMA, S. K.; MOHAN, A.; KADHIRAVAN, T.** HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis & management. *Indian Journal Medicine Research*, 121:550-567, 2005.
- SHRESTHA, N. K.; TUOHY, M. J.; HALL, G. S.; REISCHL, U.; GORDON, S. M.; PROCOP, G. W.** Detection and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacterial Isolates by Real-Time PCR . *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11):5121–5126, 2003.
- SILVA, P. A. & AÍNSA, J. A.** Chapter 18: Drugs and Drug Interactions. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007*. 1º Edição. *TuberculosisTextbook.com*, 2007.
- SINGH, M. & ESPITIA, C.** Chapter 13: Immunological Diagnosis. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007*. 1º Edição. *TuberculosisTextbook.com*, 2007.
- SMITH, P. G. & MOSS, A. R.** Chapter 4: Epidemiology of tuberculosis. In: Bloom, B. R. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington. ASM Press, 1994.
- SPERHACKE, R. D.; MELLO, F. C. Q.; ZAHA, A.; KRITSKI, A. L., ROSSETTI, M. L. R.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 8(3): 312-317, 2004.
- TACI, N.; YURDAKUL, A. S.; CEYHANY, I.; BERKTAS, M. B.; GRETENSOY, M.** Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* DNA from peripheral blood in patients with HIV-seronegative and newcases of smear-positive pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction. *Respiratory Medicine*, 97:676-681, 2003.

- TAKAGI, N.; HASEGAWA, Y.; ICHIYAMA, S.; SHIBAGAKI, T.; SHIMOKATA, K.** Polymerase chain reaction of pleural biopsy specimens for rapid diagnosis of tuberculous pleuritis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2(4): 338-341, 1998.
- TAKAHASHI, T. & NAKAYAMA, T.** Novel Technique of Quantitative Nested Real-Time PCR Assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3):1029–1039, 2006.
- TAN, M.F.; NG, W.C.; CHAN, S.H.; TAN, W.C.** Comparative usefulness of PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in different clinical specimens. *Journal Medicine Microbiology*, 46(2):164-169, 1997.
- TARANTINO, A. B.** Derrames pleurais. In: TARANTINO, A. B. Doenças Pulmonares, 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- THIERRY, D.; BRISSON-NOËL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J.; GICQUEL, B.** Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(12):2668-2673, 1990.
- TORRES, M. J.; CRIADO, A.; PALOMARES, J. C.; AZNAR, J.** Use of Real-Time PCR and Fluorimetry for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance-Associated Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9):3194–3199, 2000.
- TORTOLI, E. & PALOMINO, J. C.** Chapter 14: New Diagnostic Methods. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. 1ª Edição. TuberculosisTextbook.com, 2007.
- TRAJMAN, A.; NETO, E. B.; BELO, M. T. C, T.; TEIXEIRA, E. G.; SELIG, L.; FERRARI, G.; BRANCO, M. M. C.** Pleural tuberculosis and human immunodeficiency virus co-infection. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 1(6):498-501, 1997.
- TRAJMAN, A.; KAISERMANN, C.; LUIZ, R. R.; SPERHACKE, R. D.; ROSSETTI, M. L.; SAAD, M. H. F. R.; SARDELLA, I. G.; SPECTOR, N.; KRITSKI, A. L.** Pleural fluid ADA, IgA-ELISA and PCR sensitivities for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 67(8):877-884, 2007.
- TRAJMAN, A.; PAI, M.; DHEDA, K.; SMIT, R. Z.; ZWERLING, A. A.; JOSHI, R.; KALANTRI, S.; DALEYE, P.; MENZIES, D.** Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *European Respiratory Journal*, 31:1098–1106, 2008.

- TRAJMAN A. & LUIZ R. R.** McNemar X2 test revisited: comparing sensitivity and specificity of diagnostic examinations. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigations*, 68(1): 77-80, 2008.
- VALDÉS, L.; POSE, A.; SAN JOSE, E.; VAZQUEZ, J. M. M.** Tuberculous pleural effusions. *European Journal of Internal Medicine*, 14:77–88, 2003.
- VALENTINE-THON, E.** Quality control in nucleic acid testing-where do we stand? *Journal of Clinical Virology*, 25(suppl3):13-21, 2002.
- VAN EMBDEN, J. D.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; MCADAM, R.; SHINNICK, T. M.; SMALL, P. M.** Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(2):406-409, 1993.
- VAN COPPENRAET, E. S. B.; LINDEBOOM, J. A.; PRINS, J. M.; PEETERS, M. F.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, E. J.** Real-Time PCR Assay Using Fine-Needle Aspirates and Tissue Biopsy Specimens for Rapid Diagnosis of Mycobacterial Lymphadenitis in Children. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6):2644–2650, 2004.
- VAN DOORN, H. R.; CLAAS, E. C. J.; TEMPLETON, K. E.; VAN DER ZANDEN, A. G. M.; VIJE, A. T. K.; JONG, M. D. D.; DANKERT, J.; KUIJPER, E. J.** Detection of a Point Mutation Associated with High-Level Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Using Real-Time PCR Technology with 3'-Minor Groove Binder-DNA Probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10):4630–4635, 2003.
- VIEDMA, D. G.; INFANTES, M. D. D.; LASALA, F.; CHAVES, F.; ALCALÁ, L.; BOUZA, E.** New Real-Time PCR Able to Detect in a Single Tube Multiple Rifampin Resistance Mutations and High-Level Isoniazid Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3):988–995, 2002.
- VILLEGAS, M. V.; LABRADA, L. A.; SARAVIA, N. G.** Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase, and interferon gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest*, 118:1355-1364, 2000.
- VILLENA, V.; REBOLLO, M. J.; AGUADO, J. M.; GALAN, A.; LOPEZ ENCUESTRA, A.; PALENQUE, E.** Polymerase chain reaction for the diagnosis of pleural tuberculosis in immunocompromised and immunocompetent patients. *Clinical and Infection Disease*, 26:212-214, 1998.
- VILLENA, V.; LÓPEZ, A. E.; ECHAVE-SUSTAETA, J.; ALVAREZ, C. M.; MARTIN, P. E.** Estudio prospectivo de 1.000 consecutivos pacientes con

derrame pleural. Etiología del derrame y características de los pacientes. *Archives of Broncopneumology*, 38:21-26, 2002.

- WAARD, J. H. & ROBLEDO, J.** Chapter 12: Conventional Diagnostic Methods. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007*. 1º Edição. TuberculosisTextbook.com, 2007.
- WADA, T.; MAEDA, S.; TAMARU, A.; IMAI, S.; HASE, A.; KOBAYASHI, K.** Dual-Probe Assay for Rapid Detection of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11):5277–5285, 2004.
- WANG, N.** Anatomy of the Pleura. *Clinics in Chest Medicine*, 19(2):229-240, 1998.
- WHO** World Health Organization. The global plan to stop TB, 2006-2015 / Stop TB Partnership, 2006 a.
- WHO** World Health Organization. Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential / TDR, FIND SA, 2006 b.
- WHO** World Health Organization. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents. Recommendations for HIV-prevalent and resource-constrained settings. "WHO/HTM /TB/2007.379", 2007.
- WHO** World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing. WHO report 2008. "who/htm/tb/2008.393", 2008.
- WILSON, S. M.; MCNERNEY, R.; NYE, P. M.; GODFREY-FAUSST, P. D.; STOKER, N. G.; VOLLER, A.** Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(4):776-782, 1993.
- WONG, P.** Management of tuberculous pleuritis: Can we do better? *Respiratory*, 10: 144-148, 2005.
- YAM, W. C.; CHENG, V. C. C.; HUI, W. T.; WANG, L. N.; SETO, W. H.; YUEN, K. Y.** Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens using single-tube biotinylated nested polymerase chain reaction-enzyme linked immunoassay (PCR-ELISA). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48: 271–275, 2004.
- ZAGER, E. M. & MCNERNEY, R.** Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*, 8(10), 2008.

Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Novos testes para o diagnóstico da TB pleural: métodos convencionais no escarro induzido e métodos imunológicos e de biologia molecular no líquido pleural

A. Proposta e *background*

Marcus B. Conde, Amir Szklo, Ana Luiza C. Fernandes, Liliane Olival médicos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ estão conduzindo uma pesquisa sobre a validade de novos testes no líquido pleural e no escarro para obterem o diagnóstico de tuberculose na pleura. Como eu estou com derrame pleural e uma das possibilidades de diagnóstico para o meu problema é a tuberculose pleural, eu estou sendo convidado a participar deste trabalho.

B. Procedimentos

Se eu concordar em participar do estudo os seguintes fatos ocorrerão:

1. Eu irei responder a um questionário padrão que investigará aspectos da minha história médica e pessoal e farei uma telerradiografia torácica
2. Após ser esclarecido, eu permitirei que seja retirada uma amostra de sangue de 10 ml para a realização de vários testes, entre os quais o teste que dá o diagnóstico de AIDS (teste de HIV). Parte do soro obtido a partir do sangue que foi retirado poderá ser congelado, e utilizado futuramente para testar novos métodos diagnósticos em tuberculose.
3. Após assepsia e anestesia local com xilocaína à 1% sem vasoconstrictor, eu serei submetido a uma punção torácica para retirada uma amostra de líquido pleural. Neste mesmo ato, serei submetido à biopsia pleural (retirada de minúsculos fragmentos de pleura através de uma pinça apropriada) por agulha. Esta conduta é a habitual e a punção é feita com uma agulha de Cope. Serão retirados aproximadamente 10 ml de líquido pleural e 8 fragmentos de pleura parietal. O material usado para os procedimentos são previamente esterilizados e não re-utilizados
4. Eu concordo em submeter-me a uma indução de escarro, onde eu deverei inalar um aerosol com uma solução salina durante 15 minutos enquanto respiro profundamente e tusso.
5. A participação neste estudo gastará um total de 2 horas em um período de 1 dia.

Estes procedimentos serão realizados no Setor de Métodos Especiais (SME) do serviço de Pneumologia do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

C. Riscos/Desconfortos

1. Caso eu me sinta desconfortável com as questões que forem feitas eu poderei interromper a entrevista em qualquer momento.
2. Venopuntura: Os riscos da retirada de sangue incluem desconforto temporário, introdução da agulha, pequena ferida e, raramente, infecção.
3. Toracocentese/biopsia pleural: Os riscos deste procedimento incluem desconforto local temporário, pequena ferida no local da introdução da agulha e, raramente, infecção pneumotórax (entrada de ar no espaço pleural) ou sangramento. Estas possíveis complicações serão tratadas pela equipe médica responsável.
4. A indução de escarro produzirá tosse, mas eu poderei interromper o procedimento se julgar necessário.
5. Radiação: A quantidade de radiação a qual serei exposto é relativamente pequena. Em função disto os riscos são difíceis de serem medidos.
6. Confidencialidade: A participação em pesquisa pode resultar na perda da privacidade. Meu prontuário será manuseado tão confidencialmente quanto for possível. As informações obtidas neste estudo serão guardadas sob código e somente os Dra. Liliane/Dr Amir terá acesso aos arquivos e questionários. Não serão identificados nenhum dos pacientes em qualquer relato ou trabalho resultante deste estudo.

D. Tratamento e compensação por injúria

Se eu for lesionado como resultado deste estudo, serei submetido ao tratamento necessário. Os custos do tratamento serão cobertos pelo HUCFF/UFRJ, dependendo de alguns fatores. A UFRJ não prevê nenhuma forma de compensação financeira por possíveis injúrias. Para qualquer informação adicional o Dr. Conde deve ser contatado no telefone 25622633.

E. Benefícios

Os procedimentos médicos aos quais eu me submeterei aumentarão as possibilidades de um diagnóstico mais apurado, potencialmente evitando tratamentos inapropriados. Com isto espera-se que mais conhecimentos científicos sejam obtidos com conseqüente melhoria no tratamento futuro de pessoas que estejam na mesma condição que eu.

F. Alternativas

Se eu optar por não participar do estudo, ou mesmo sair dele durante o seu andamento, minha situação presente ou futura como paciente não será afetada.

G. Custos

Eu não serei cobrado por qualquer dos procedimentos realizados no estudo.

H. Reembolso

Eu não serei reembolsado por participar deste estudo.

I. Questões

O estudo foi explicado pelo Dr. Amir Szklo/Dra Liliane Olival e todas as minhas questões foram respondidas. Caso novas dúvidas sobre o estudo surjam, eu poderei contactar o Dr.Szklo/Dra Liliane

J. Consentimento

A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTÁRIA. Eu tenho o direito de não concordar em participar ou mesmo de me retirar do estudo em qualquer momento que eu queira, sem riscos para o meu tratamento médico. Se eu desejar participar, eu devo assinar na linha abaixo.

Data

Assinatura do voluntário

Pessoa que obteve o consentimento

Apêndice 2 – Instrumento de coleta de dados

Caso número: _____

Entrevistador: _____ Data ____/____/____

1. Fatores de não elegibilidade

A) História de tratamento anti-tuberculose por mais de uma semana nos últimos três meses?

B) Já foi submetido anteriormente à punção/biópsia pleural?

2. Identificação do paciente

Nome		
Endereço		
Números de telefone	Casa:	Recado:
	Celular:	Nome da pessoa para recado:

3. Informações preliminares

Consent (assinou termo de consentimento?)	0=não; 1=sim; 9=ignorado	
Namostra (número da amostra – preenchido apenas no laboratório)	Número do soro (<i>ano-mês-dia-amostra do dia</i>)	
Origempac (origem do paciente)	1= HUCFF/UFRJ; 2=outros(especifique) 9=ignorado	
Pront (número do prontuário)	(caso seja paciente do HUCFF)	
RG (número do registro geral)		

4. Dados demográficos

Idade do paciente	(em anos) ou 999=desconhecido	
Cor do paciente	0=branco; 1=não branco; 9=desconhecido	
Gênero do paciente	0=masculino; 1=feminino; 9=deconhecido	

5. Contato prévio com o bacilo da Tuberculose

Fezppd (Fez o PPD?)	0=não; 1= sim; 9= ignorado	
Resppd (Resposta do PPD)	Colocar o resultado do PPD em milímetros	
Pastb (sabe ter tido TB no	0=não; 1= sim; 9= ignorado	

passado?)		
Tratou corretamente a TB do passado?	0=não; 1=sim; 9=desconhecido/ não TB	
Fezbcg (tomou BCG na infância? Ou ignora, porém tem cicatriz de vacina BCG?	0=não; 1= sim; 9= ignorado	
Contato nos dois últimos anos , por mais de 100 horas, com portador de TB pulmonar?	0=não; 1=sim; 9=ignorado	

6.Sintomas gerais do paciente

Presença de sintomas gerais?	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Tempo de início dos sintomas gerais	(em dias)	
Emagrecimento? (>10% em 3 meses)	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Febre medida?	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	

7.Sintomas Respiratórios do Paciente

Tosse	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Expectoração	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Sangue na expectoração	0= não; 1= sim; 9= desconhecido/sem expectoração	
Dispneia	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Dor torácica	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Outros	Especifique:	

8. História Patológica Progressiva do Paciente

Uso de alguma droga imunossupressora nos últimos dois anos ? (especifique)	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Uso de corticóide em dose/tempo imunossupressora nos últimos dois anos?	0= não; 1= sim (prednisona >15mg/dia mais de 15 dias); 9= desconhecido	
Etilismo (usar questionário CAGE simplificado - ver anexo 2)	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Tabagismo atual?	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Ex-tabagismo?	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Carga tabágica total	(maços /ano)	

9. Diagnóstico HIV/SIDA

Fezhiv (foi submetido ao teste de HIV ?)	0=não; 1 =sim; 9=ignorado	
Reshiv (qual o resultado do teste para HIV?)	0=negativo; 1=positivo 9=ignorado/ não fez teste	

Paciente é portador de SIDA?	1=sim ; 0=não ; 9=ignorado	
Qual o critério diagnóstico para SIDA ?	0=sem SIDA ; 1=CDC modificado (anexo 2); 2=CARACAS (anexo 3); 9=ignorado	

10. Co-morbidades

Presença de co-morbidades ?	0= não; 1= sim; 9= desconhecido			
Qual a co-morbidade ?				
() sem doença de base; insuf renal;	() insuf cardíaca;	() insuf hepática;	()	
() Diabetes; reumatóide;	() Pneumonia;	() LES;	() artrite	
() pos op revascularização; linfoma não Hodking;	() linfoma Hodking;	()		
() câncer de pulmão; câncer de mama;	() câncer gástrico;	() câncer ginecológico;	()	
() câncer de cabeça e pescoço;	() outros – especifique			

11. Exame Físico do Paciente

Índice de Karnofski	(anexo 4)	
Edemas	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Icterícia	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Exame ap respiratório: Sugere Insuficiência Respiratória?	0= não ; 1= sim ; 9=ignorado	
Exame ap cardiovascular:	0=normal; 1=sugere ins cardíaca; 2=sugere derrame pericárdico; 9=ignorado	
Exame abdominal:	0=normal; 1=hepatomegalia; 2=hepatoesplenomegalia; 3=esplenomegalia; 4= ascite; 9=ignorado	

12. Exames Complementares**1º Avaliador**

Possui Telerradiografia de Tórax?	0=não; 1=sim; 9=ignorado	
Localização do derrame pleural na telerradiografia	0=sem derrame; 1=derrame unilateral; 2=derrame bilateral; 9=desconhecido/não realizado	
Tamanho do derrame telerradiografia	0= sem derrame; 1=pequeno (1/3 inferior); 2=moderado (2/3 inferiores); 3=grande; 9=desconhecido/ não realizado	
Telerradiografia de Tórax 1- () normal exceto pelo derrame 4- () sugestivo de CA de pulmão 2- () sugestivo de TB em atividade; 5- () outros 3- () sugestivo de sequela de TB 6- () ignorado/não realizado		
Laurell	0=não realizado; 1=realizado, líquido não correu (espessamento) ou linha de líquido livre <10 mm altura; 2= linha de líquido livre >=10 mm altura ; 9=desconhecido	
Fez Tomografia computadorizada?	0=não; 1=sim; 9=desconhecido	
Tomografia computadorizada: 1- () normal exceto pelo derrame 4- () sugestivo de CA de pulmão 2- () sugestivo de TB em atividade; 5- () outros 3- () sugestivo de sequela de TB 6- () ignorado/não realizado		

Toracocentese:	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Data da toracocentese	(dia xx /xx mês/ xxxx ano)	
Volume retirado	(em mililitros)	
Aspecto inicial do líquido:	0= sem líquido; 1=amarelo citrino; 2=amarelo turvo; 3=serohemático; 4=hemorragico; 5=purulento; 6=quiloso; 7=achocolatado; 9=ignorado	
Citologia do líquido pleural para células malignas	0= negativo; 1=positivo; 9= ignorado/não realizado	
Biopsia de pleura por agulha de Coppe	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Data da biopsia de pleura	(dia xx /xx mês/ xxxx ano)	
Número de fragmentos retirados		
Realizado exame histopatológico do fragmento pleural?	0= não; 1= sim; 9= desconhecido	
Laudo histopatológico do fragmento pleural	0= não realizou biópsia; 1= sugestivo de TB; 2=	

	neoplasia; 3= inflamatório inespecífico; 9= ignorado	
Complicações toracocentese+biopsia	0=não; 1=sim	
Quais complicações?	1=pneumotórax s/drenagem; 2=pneumotórax c/drenagem; 3=sangramento no local punção; 4=lipotimia; 5=edema de reexpansão; 6=hemotorax 9=s/complicação ou s/relato	

2° Avaliador

Possui Telerradiografia de Tórax?	0=não; 1=sim; 9=ignorado	
Localização do derrame pleural na telerradiografia	0=sem derrame; 1=derrame unilateral; 2=derrame bilateral; 9=desconhecido/não realizado	
Tamanho do derrame telerradiografia	0= sem derrame; 1=pequeno (1/3 inferior); 2=moderado (2/3 inferiores); 3=grande; 9=desconhecido/ não realizado	
Telerradiografia de tórax 1- () normal exceto pelo derrame 2- () sugestivo de TB em atividade; 3- () sugestivo de sequela de TB 4- () sugestivo de CA de pulmão 5- () outros 6- () ignorado/não realizado		
Laurell	0=não realizado; 1=realizado, líquido não correu (espessamento) ou linha de líquido livre <10 mm altura; 2= linha de líquido livre >=10 mm altura ; 9=desconhecido	
Fez Tomografia computadorizada?	0=não; 1=sim; 9=desconhecido	
Tomografia computadorizada: 1- () normal exceto pelo derrame 2- () sugestivo de TB em atividade; 3- () sugestivo de sequela de TB 4- () sugestivo de CA de pulmão 5- () outros 6- () ignorado/não realizado		

13. Resultados Laboratoriais

Bioquímica	Soro	Líquido Pleural
Glicose (mg/dl)		
LDH (U/l)		
Proteínas totais (g/dl)		

Citometria global (líquido pleural): _____ células

Citometria específica (líquido pleural)

PMN: _____% Mononucleares: _____%

Preencher: 0= negativo 1= positivo 9= ignorado/ não realizado		
Tipo de material	Resultado do BAAR	Resultado da Cultura para BK
Líquido pleural		
Fragmento pleural		
Escarro espontâneo		
Escarro induzido		

14. Diagnóstico Final

Diagnóstico final da doença pleural:

- () sem diagnóstico () Tuberculose () câncer metastático
 () Sínd. Edemigênica () outros

Forma de diagnóstico:

- () micobacteriologia do líquido pleural () micobacteriologia do fragmento pleural
 () citologia do líquido pleural () micobacteriologia do Escarro
 () histopatologia do fragmento pleural () diagnóstico de presunção

Apêndice 3 – Protocolo de extração de DNA

Inicialmente, alíquotas de 500 μL de líquido pleural e 500 μL de soro foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi retirado com auxílio de ponteira. Ao pellet foram adicionados 100 μL de Solução de lise (Hidroclorato de Guanidina 8 M; Tris HCl 0,08 M; EDTA 0,04 M; Triton X-100 2%) e homogeneizado rapidamente em vórtex. Nas amostras de fragmentos de pleura (um fragmento por paciente de aproximadamente 2 mm de diâmetro) foram adicionados 100 μL de solução de lise e o tecido foi fragmentado. Após esta etapa inicial, realizou-se o mesmo procedimento para ambos os tipos de amostras. As amostras foram colocadas a 100°C por 10 minutos, centrifugadas rapidamente a 13.000 rpm e o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo contendo 2,5 μL de resina (suspensão de dióxido de sílica). Os tubos foram homogeneizados em vórtex, centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi retirado com auxílio de ponteira. O pellet foi lavado com 200 μL de solução de lavagem (Hidroclorato de Guanidina 8 M; Tris HCl 0,08 M) por duas vezes e uma vez com 200 μL de etanol 70%. O etanol foi retirado com ponteira, e os tubos fechados foram colocados a 56°C por 10 minutos, após este tempo as tampas dos tubos foram abertas dentro da capela de fluxo laminar, e o pellet foi seco a temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado ao pellet 33 μL de TE 1X (Tris-EDTA), os tubos foram homogeneizados em vórtex e colocados a 56°C por 10 minutos. Após, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto, e o sobrenadante (30 μL) foi retirado e transferido para um tubo novo, previamente identificado com o número da amostra e a data. Estes foram armazenados a -20°C para os experimentos posteriores.

Apêndice 4 – Protocolo de hibridização e detecção colorimétrica em microplaca

A fixação da sonda na placa foi realizada pela adição, em cada poço, de 100 µL de uma solução contendo; 100 mM de Carbonato de Sódio pH 9,6 e 100 µg da sonda aminada, e incubação a 2 – 8 °C por 24 horas. A solução foi aspirada e cada poço foi lavado 3 vezes com 300µL de solução PBST. O produto amplificado foram desnaturados a 100°C por 5 minutos e imediatamente colocada em gelo. Em cada poço foram adicionados 100 µL de solução de hibridização (SSC 5X; 0,5% BSA; 0,1% Tween 20) e 15 µL do produto amplificado desnaturado, a placa foi então incubada a 50°C a por 45 minutos. Os poços foram lavados três vezes com a 300 µL de solução de lavagem 1 (SSC 0,5X; 0,1% Tween 20), então 300 µL desta solução de lavagem pré-aquecida foi colocada em cada poço e a placa foi incubada a 50°C por 15 minutos, e após este tempo, lavada novamente por três vezes com 300 µL de solução de lavagem 1. Foi adicionado 100 µL do conjugado enzimático estreptavidina (peroxidase horseradish) em cada poço, e incubado a 37°C por 30 minutos. Os poços foram lavados três vezes com 300 µL de solução de lavagem 2 (Tris HCl 100 mM; NaCl 150 mM; 0,1% Tween 20), então 300 µL desta solução de lavagem foi colocada em cada poço e a placa foi deixada a temperatura ambiente por 5 minutos, e após este tempo, lavada novamente por três vezes com 300 µL de solução de lavagem 2. Foi adicionado 100 µL de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) e após 15 minutos a temperatura ambiente foi adicionado 100 µL de solução de parada (ácido sulfúrico 0,1 M). Os resultados foram mensurados em um espectrofotômetro (leitora de ELISA) a 450 nm e re-filtro de 620 nm.

Apêndice 5 – Currículo do autor

CURRICULUM VITAE resumido

ROSSO, F.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Franciele Rosso

Local e data de nascimento: Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, 04/12/1982.

Endereço profissional: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Avenida Ipiranga, 5400 - 3º andar. Jardim Botânico - Porto Alegre, RS – Brasil.
CEP: 99610-000.

Telefone profissional: (51) 3352-0336

E-mail: francielerosso@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO

Graduação

Curso: Farmácia – Farmacêutico Bioquímico.

Instituição: Universidade de Passo Fundo

Período: 2000-2004

Pós-graduação *stricto sensu*

Curso: Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Período: 2006-Atual

Cursos de curta duração

Curso: PCR Real Time: Aplicações na quantificação relativa.

Instituição: Applied Biosystems, Brasil.

Período: Agosto de 2006

Carga horária: 20 horas

Curso: Métodos de pesquisa clínica-epidemiológica em DST/AIDS.

Instituição: Centro de Estudos de AIDS/DST do Rio Grande do Sul (CEARGS) e “Center for AIDS Prevention Studies”, da Universidade da Califórnia em São Francisco.

Período: Abril a agosto de 2007

Carga horária: 100 horas

Curso: Metodologia do ensino superior

Instituição: Universidade de Passo Fundo

Período: Abril a julho de 2008

Carga horária: 60 horas

3. ESTÁGIOS

- **2005 – Atual.** Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Participando dos seguintes projetos:

- 2007 – Atual: “Caracterização da diversidade genotípica do HIV-1 na co-infecção HIV/Aids e tuberculose” (OBS: Projeto financiado pelo Centro de Estudo de AIDS/DST do Rio Grande do Sul (CEARGS) e Universidade da Califórnia em São Francisco).
- 2006 – Atual: “Novos métodos de diagnóstico molecular para a tuberculose: Desenvolvimento, validação e utilização na rotina”.
- 2006 – Atual: “Contribuição da detecção molecular de *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras do mesmo paciente no diagnóstico da tuberculose pleural”.

- 2005 – 2007: “Avaliação das técnicas moleculares: PCR Dot-Blot e PCR GM em amostras de pacientes co-infectados com HIV/TB”.
- 2005 – 2007: “Avaliação do custo efetividade e aplicabilidade na rede pública de saúde das metodologias moleculares GM PCR e Dot-Blot PCR na detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas”.
- **2006 – 2008.** Bolsista do CNPq – Desenvolvimento Tecnológico Industrial. Participação no projeto “Desenvolvimento de um kit para detecção molecular do Papiloma vírus humano – HPV”.
- **08/2004 – 11/2004.** Estágio curricular em análises clínicas no Laboratório Central da Prefeitura de Porto Alegre. Totalizando 300 horas.
- **03/2004 – 06/2004.** Estágio curricular em farmácia hospitalar no Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS. Totalizando 300 horas.
- **06/2003 – 06/2004.** Estágio extra-curricular em análises clínicas no Laboratório Hórus, Passo Fundo, RS. Totalizando 1400 horas.
- 06/2002 – 06/2003. Estágio extra-curricular em análises clínicas no Laboratório Lavoisier, Passo Fundo, RS.

4. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- **ROSSO, F.; Michelin, C. T.; Sperhackle, R. D.; Gregianini, T.; Conde, M.; Olival, L.; Szklo, A.; Zaha, A.; Rossetti, M. L. R.** Detecção colorimétrica e por PCR em tempo real de *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras do mesmo paciente no diagnóstico de tuberculose pleural. In: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Porto Alegre. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41:13-274, 2008.
- **Michelin, C. T.; Schmid, K. B.; ROSSO, F.; Sperhackle, R. D.; L.; Zaha, A.; Rossetti, M. L. R.** Desenvolvimento de uma metodologia molecular para o diagnóstico de tuberculose. In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. Gramado, RS, 2008.
- **Michelin, C.; ROSSO, F.; Sperhackle, R. D.; Kritski, A. L.; Oliveira, M. M.; Rossetti, M. L. R.** Desenvolvimento de um método de purificação e detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando hibridização em microplacas de Elisa. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Brasília, DF, 2007.

-
- **ROSSO, F.; Michelon, C. T.; Sperhackle, R. D.; Conde, M.; Olival, L.; Szklo, A.; Zaha, A.; Rossetti, M. L. R.** Detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras do mesmo paciente no diagnóstico de tuberculose pleural. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, p.60, 2007.

 - **Michelon, C.; ROSSO, F.; Schmid, K.; Sperhackle, R. D.; Zaha, A.; Rossetti, M. L. R.** Desenvolvimento de um método de detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando microplacas. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, p.18, 2007.

 - **Michelon, C.; Sperhackle, R. D.; ROSSO, F.; Rezende JR, L.; Rossetti, M. L. R.** Aperfeiçoamento da extração de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas. In: II Encontro Nacional de Tuberculose. São Paulo. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 32:135-162, 2006.

 - **Scherer, L. C.; Sperhackle, R. D.; Jarczewski, C.; ROSSO, F.; Michelon, C.; Rossetti, M. L. R.; Kritski, A.L.** Avaliação das técnicas da PCR Dot-Blot Colorimétrico e PCR-GM no diagnóstico de tuberculose pulmonar em pacientes HIV soropositivos. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Santos - SP, 2005.

 - **ROSSO, F.; Siqueira, L. O.** Hepatites virais em pacientes infectados com HIV. In: 38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial. Florianópolis - SC, 2004.

 - **ROSSO, F.; Siqueira, L. O.** Co-Infecção entre hepatites virais em pacientes infectados com HIV. In: 38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial. Florianópolis - SC, 2004.

 - **ROSSO, F.; Siqueira, L. O.** Hepatites virais e hepatotoxicidade em pacientes infectados com HIV. In: XIV Mostra de Iniciação Científica da Universidade de Passo Fundo, 2004, Passo Fundo. XIV Mostra de Iniciação Científica da Universidade de Passo Fundo, 2004.