

I. *Introdução*

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A TUBERCULOSE

A tuberculose é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), bactéria identificada por Robert Koch, em 1882. Esta doença acompanha o homem desde a pré-história: lesões características de tuberculose vertebral foram encontradas em esqueletos na época neolítica (TARANTINO, 1982).

Embora identificada há milhares de anos, a tuberculose tornou-se epidêmica no século XIX na Europa, com a Revolução Industrial (FREIRE, 1989).

A epidemia de tuberculose é hoje uma ameaça crescente nos países desenvolvidos e constante nos países em desenvolvimento. O empobrecimento da população, a desestruturação dos serviços de controle da tuberculose e a epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) estão entre os principais fatores associados à expansão da doença no mundo (SNIDER & MONTAGNE, 1994).

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *M. tuberculosis*, que é a causa de, aproximadamente, 8 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes por ano. Em várias regiões do mundo a tuberculose ainda é a principal causa de óbito. Cerca de 26% de todas as mortes evitáveis no mundo estão diretamente relacionadas à doença (SNIDER & MONTAGNE, 1994). Os grupos de pacientes em que a tuberculose é mais freqüente são os pacientes infectados pelo HIV, idosos, etilistas, pessoas vivendo ou residindo em locais onde a doença é comum,

contactantes de pessoas com tuberculose em atividade, pacientes com neoplasias, diabetes mellitus ou imunodeprimidos.

A tuberculose é uma das principais infecções detectadas nos pacientes com HIV, ocorrendo com maior freqüência quando os níveis de linfócitos CD4⁺ caem abaixo de 450 células/mm³ (BRASIL. Ministério da Saúde, 1997). O indivíduo co-infectado (*M. tuberculosis* e HIV) tem risco de 6 a 100 vezes maior de manifestar a doença clínica do que o indivíduo infectado apenas com o *M. tuberculosis* (São Paulo. SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE, 1995). Dados do centro de vigilância epidemiológica do estado de SP, relativos ao ano de 1994, mostravam que cerca de 14,7% dos casos novos de tuberculose apresentavam sorologia positiva para o HIV. Desde abril de 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a considerar a tuberculose uma emergência global, incentivando medidas de controle da doença em todo o mundo (ELLNER & HINMAN, *et al.*, 1993; FILHO & HIJJAR, *et al.*, 1993; SNIDER & MONTAGNE, 1994).

A infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre através de gotículas de aerossóis, provenientes de secreções de pacientes com doença em atividade, contendo microorganismos viáveis, que são inaladas por uma pessoa susceptível à doença.

A tuberculose primária é geralmente assintomática e de curso auto-limitado, permanecendo a micobactéria presente em alguns tecidos em forma latente. Entretanto, quando a resposta imune é inadequada a doença pode progredir para sua forma disseminada, o que ocorre mais freqüentemente durante a infância. A reativação de microorganismos

latentes é outra forma de etio patogenia da doença, mais comum durante a vida adulta. O acometimento pulmonar é o mais freqüente nesta modalidade da doença. Em geral, o paciente com esse quadro apresenta-se com sintomas constitucionais de fadiga, perda de peso, anorexia, febre baixa e sudorese noturna, associados a quadro respiratório crônico, com tosse, expectoração e eventualmente hemoptise. O exame físico geralmente revela um paciente com aparência de doente crônico e evidências de perda de peso, com ou sem sinais de envolvimento pulmonar.

Admite-se que a tuberculose seja atualmente no Brasil a causa mais freqüente de derrame pleural. Correspondendo a aproximadamente metade dos casos de tuberculose extrapulmonar, a pleurite tuberculosa pode ser secundária à hipersensibilidade ao bacilo e/ou à ação direta do *M. tuberculosis*, cujo acesso à cavidade pleural se tenha dado por disseminação hematogênica ou por contigüidade com foco caseoso presente no parênquima pulmonar. Essa última eventualidade constitui fator predisponente para instalação do empiema tuberculoso (FREIRE, 1989).

O derrame pleural tuberculoso ocorre de três a sete meses após a infecção primária, mas pode surgir a qualquer tempo no curso natural da doença (UEHARA, *et al.*, 1993).

Os sintomas e sinais de tuberculose pleural são variáveis, de acordo com o tempo de instalação da doença. A dispnéia tem intensidade diretamente proporcional ao volume da coleção líquida acumulada e é conseqüente à compressão mecânica do parênquima pulmonar. A tosse é provocada pela mobilização dos brônquicos adjacentes, sendo em geral

seca e irritativa. A dor torácica, a queixa mais comum, é do tipo ventilatório-dependente, constituindo manifestação precoce que desaparece com o aumento do derrame, em função da perda do atrito entre os dois folhetos pleurais irritados (FREIRE, 1989).

O acometimento da pleura em pacientes com tuberculose, evidenciado pela presença de derrame pleural, é de aproximadamente 31%. Aparentemente a co-infecção com o HIV é o fator principal responsável por este aumento dos casos de tuberculose e tuberculose pleural (FERRER, 1997), embora este achado não tenha sido confirmado por um trabalho realizado em nosso laboratório (BOLLELA, 2000).

É fato comprovado que aproximadamente metade dos pacientes acometidos por derrame tuberculoso e não submetidos a tratamento específico, posteriormente desenvolvem tuberculose pulmonar ativa (TARANTINO, 1987).

A prevalência da tuberculose entre todos pacientes com derrame pleural é razoavelmente elevada (22,4%), e a pleura é afetada em 23,3% dos pacientes com tuberculose (VALDÉS, *et al.*, 1995).

O diagnóstico de tuberculose pleural em pacientes idosos pode ser mais problemático, pois estes tendem a ter outras condições que podem ser responsáveis por este derrame pleural, tal como tumor maligno de pleura. Além disso, pacientes com tuberculose pleural não têm sintomas clínicos característicos (HANNA, 1996).

O diagnóstico da tuberculose pleural é feito através da análise conjunta dos dados clínicos, radiológicos, teste tuberculínico, exames bioquímicos,

microbiológicos, e citológicos do líquido pleural e da histopatologia de fragmento de pleura, obtido por punção-biópsia.

No diagnóstico de derrame pleural, a biópsia pleural é útil na diferenciação entre tuberculose e neoplasia (VALDÉS, *et al.*, 1995).

São vários os métodos microbiológicos usados atualmente na rotina diagnóstica da tuberculose.

2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

2.1. MICROSCOPIA DIRETA

Os métodos de colorações específicas para micobactérias são o de Ziehl-Neelsen, o mais convencional, permitindo a identificação do bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR), e a técnica do fluorocromo, usando-se auramina-rodamina (HANNA, 1996). Em razão de sua elevada sensibilidade, a técnica de fluorocromo pode ser utilizada como método de triagem; entretanto, por sua limitada especificidade, torna-se necessária a complementação diagnóstica com a coloração de Ziehl-Neelsen.

A baciloscopia tem algumas limitações, dentre as quais podemos citar o grande número de bacilos necessários para a positividade do teste. O exame só costuma ser positivo em amostras com uma concentração mínima de 5.000 bacilos por mililitro de secreção, o que limita sua sensibilidade. Esta concentração é alcançada apenas em lesões que tenham cavidades com pelo 2cm de diâmetro. Assim em infiltrados iniciais, dificilmente haverá positividade à pesquisa direta do bacilo. Entretanto, na prática clínica, observamos um grande número de pacientes que apresentam baciloscopia

positiva e não apresentam evidências de cavitação pulmonar. Outro inconveniente é o fato de o resultado apenas identificar o microorganismo como BAAR, visto ser ele incapaz de diferenciar espécies de micobactérias, o que pode influenciar na sua especificidade (BRASIL. Ministério da Saúde-FNS, 1994; AFIUNE, *et al.*, 1993).

A sensibilidade e especificidade da baciloscopia têm sido avaliadas periodicamente em várias revisões e, embora seus valores variem consideravelmente entre os diferentes estudos, é evidente que a baciloscopia continua sendo um passo imprescindível na avaliação diagnóstica da tuberculose (LEVY, *et al.*, 1989).

O método da microscopia de fluorescência é mais sensível e mais rápido que o de Ziehl-Neelsen, pois pode ser lido com objetivas de menor aumento, permitindo a observação de um número maior de campos microscópicos. Tem, entretanto, menor especificidade e exige microscópio de fluorescência, equipamento caro e não disponível na maioria dos laboratórios do país (BRASIL. Ministério da Saúde-FNS, 1994; AFIUNE, *et al.*, 1993).

2.2. CULTURA

O isolamento e a identificação do *M. tuberculosis* através da cultura é a metodologia que permite a confirmação do diagnóstico, sendo por isto considerado o método “gold standard” nestas situações.

A cultura para *M. tuberculosis* pode identificar a presença de bacilos em materiais com 10 a 100 bacilos por mililitro, sendo, portanto, mais sensível

que a baciloscopia. Pelo lento crescimento bacilar, as culturas somente são passíveis de leitura após três a seis semanas de inoculação em meios líquidos e sólidos. Os meios sólidos utilizados são o de Löwenstein-Jensen e o Middlebrook 7H10 ou 7H11, e o meio líquido Middlebrook 7H9. A composição tradicional destes meios é à base de ovo e batata, como o Löwenstein-Jensen, albumina numa base de ágar como o Middlebrook 7H10 ou 7H11. Estes meios são capazes de permitir o crescimento de quantidades mínimas de microorganismos e permitem a caracterização morfológica (HANNA, 1996). E o meio líquido Middlebrook 7H9 é geralmente recomendado para subcultivos, testes *in vitro* e testes de detecção rápida de crescimento micobacteriano. O meio mais utilizado na rotina é o Löwenstein-Jensen.

A sensibilidade da cultura varia de 80% a 100%, e a especificidade, de 98% a 100%. O método não possui uma boa sensibilidade, especialmente em materiais paucibacilares, por ser incapaz de detectar o agente em amostras com menos de 100 bacilos/ml. A positividade da cultura no líquido pleural para detectar a presença do *M. tuberculosis* é de aproximadamente 20 a 30% nos pacientes com tuberculose pleural (BERGER, *et al.*, 1973). Outra limitação é a possibilidade de contaminação por bactérias ou fungos, impossibilitando o isolamento e identificação da micobactéria.

GREENBAUM *et al.* (1980) demonstraram uma sensibilidade, no estudo de escarro, de 96% da cultura para doença cavitária e 70% para tuberculose sem cavidades. Por tratar-se de procedimento mais complexo e

requintado, a cultura exige melhor estrutura física, recursos, qualificação e treinamento para sua realização.

2.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO RÁPIDA DE CULTIVOS AUTOMATIZADOS

Algumas tecnologias para detecção precoce do crescimento de micobactérias têm sido desenvolvidas visando a reduzir o tempo necessário para o diagnóstico. Estes métodos são baseados na detecção do crescimento bacteriano por meio de seu metabolismo e podem ser radiométricos ou não radiométricos.

O sistema radiométrico (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sarks, Md.) foi desenvolvido em 1977 e tem a vantagem de revelar presença do bacilo num tempo muito menor do que a cultura tradicional em meio Löwenstein-Jensen (BRASIL. Ministério da Saúde-FNS, 1994; GRANGE, 1989), antecipando, desta forma, o momento de decisão sobre o início ou não do tratamento da tuberculose.

O sistema de detecção radiométrico pelo sistema BACTEC 460TB[®] da Becton Dickinson baseia-se na detecção de gás carbônico (CO₂), marcado com carbono 14 (C¹⁴). As amostras são semeadas em meio líquido Middlebrook 7H12A e 7H12B, ao qual se adiciona ácido palmítico, marcado com C¹⁴. Esta substância é metabolizada pelo bacilo, com liberação de CO₂ também marcado. Assim, quando o bacilo está presente no material, uma câmara detectará a presença do CO₂ produzido. A detecção do *M.*

tuberculosis leva em média 10 dias (BRASIL. Ministério da Saúde-FNS, 1994; GRANGE, 1989).

Os resultados do BACTEC para identificação e teste de sensibilidade são comparáveis aos métodos convencionais, no entanto, mais rápidos (PFALLER, 1994). O tempo necessário para a recuperação do *M. tuberculosis* por essa metodologia variou de 8 dias contra 18 dias da cultura convencional, para as amostras com baciloscopia positiva. Para as amostras com baciloscopia negativa, o tempo de recuperação no BACTEC foi de 14 contra 26 dias dos meios convencionais (MORGAN, *et al.*, 1983). Esse método tem algumas desvantagens, como o alto custo, não permitir avaliação morfológica das colônias, utilização de material radioativo e possibilidade de contaminação cruzada no manuseio.

O sistema de detecção não radiométrica, por exemplo, BBL-*Mycobacteria* Growth Indicator Tube[®] (MGIT), da Becton Dickinson, tem como princípio a detecção do consumo de oxigênio (O₂) por fluorescência, como indicador de crescimento micobacteriano. O MGIT utiliza meio de cultura líquido, Middlebrook 7H9 modificado, enriquecido com ácido oléico, albumina, dextrose e catalase. Um composto fluorescente, sensível à presença de oxigênio, que está presente no fundo do frasco embebido em silicone, é o indicador de crescimento da micobactéria. O MGIT não é indicado para cultura de sangue inoculado diretamente no frasco, mas pode ser realizado se a amostra for previamente submetida ao processo de lise-centrifugação.

3. TESTE TUBERCULÍNICO

O teste tuberculínico, desenvolvido por Koch foi o primeiro teste de imunodiagnóstico empregado no homem, e foi posteriormente padronizado com as tuberculinas purificadas (BRASIL. Ministério da Saúde-FNS, 1994). Utiliza-se, para o teste tuberculínico, a técnica de Mantoux, que consiste na injeção intradérmica de um antígeno do *M. tuberculosis*, convencionalmente na face ventral do antebraço esquerdo. O antígeno usado atualmente para o teste é o antígeno protéico purificado (PPD). O PPD usado no Brasil é o Rt23, aplicado na dose de duas unidades de tuberculina (2UT) (BRASIL. Ministério da Saúde, 1995; RUFINO, 1979).

A resposta ao teste é classificada segundo o tamanho do nódulo e tem a seguinte interpretação:

- ❖ 0 – 4mm – *não reator* – indivíduo não infectado pelo bacilo;
- ❖ 5 – 9mm – *reator fraco* – indivíduo infectado pelo bacilo ou por outras micobactérias;
- ❖ Maior ou igual a 10mm – *reator forte* – indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis*, doente ou não.

A interpretação do teste tuberculínico deve ser criteriosa, um resultado positivo nunca deve ser considerado diagnóstico de doença, exceto em regiões de baixa prevalência da doença onde não é usada a vacinação, já que nestes locais, na presença de quadro clínico compatível, o PPD positivo pode ser considerado diagnóstico. Por outro lado, a reação negativa do PPD não afasta a possibilidade de infecção pelo *M. tuberculosis* (AFIUNE, *et al.*, 1993; BRASIL. Ministério da Saúde, 1995; LORDI, *et al.*, 1988; RUFINO,

1979; DUNLAP, *et al.*, 1993). É um teste limitado para o diagnóstico da tuberculose, pois apesar da alta sensibilidade é pouco específico (BRASIL. Ministério da Saúde-DNPS, 1994).

O teste tuberculínico não é capaz diferenciar o indivíduo com enfermidade ativa, da condição de infectado por *M. tuberculosis* ou outras micobactérias. A reação tuberculínica pode ser negativa em pacientes severamente debilitados, desnutridos, imunosuprimidos, e na tuberculose disseminada (BRASIL. Ministério da Saúde-DNPS, 1994).

4. DETERMINAÇÃO DA ADENOSINA DEAMINASE (ADA)

A adenosina deaminase (ADA) é uma enzima liberada pelo linfócito ativado, em menor quantidade pelos macrófagos e também encontrada nas hemácias. Na ativação do sistema timo-dependente, existe aumento da utilização da enzima e, portanto, de sua concentração nos locais onde se desenvolve o processo inflamatório (CESTARI, *et al.*, 1987; AFIUNE, *et al.*, 1990).

No líquido pleural de pacientes com suspeita de pleurite tuberculosa, tem sido usada com sucesso no diagnóstico diferencial de quadros que cursam com derrame pleural (BAÑALES, *et al.*, 1991).

A utilidade da ADA em países com baixa prevalência de tuberculose é limitada por sua baixa especificidade, pois esta enzima é encontrada nos derrames pleurais associados a diversas patologias (e.g. artrite reumatóide, linfoma, enfisema, mesotelioma, etc. (BAÑALES, *et al.*, 1991; PFALLER,

1994). No entanto, esse método não apresenta bons resultados quando utilizado em escarro, sangue e outras amostras clínicas.

Na forma pulmonar, há perspectiva de dosagem da ADA no aspirado brônco, nos casos de baciloscopia de escarro negativa. Sua dosagem tem-se mostrado, em alguns estudos, particularmente útil no líquido pleural e líquido cefalorraquidiano, nas suspeitas de tuberculose pleural e meningoencefálica. Tratando-se de método colorimétrico, a determinação da atividade da enzima é passível de execução em laboratórios sem grande aparato tecnológico (CESTARI, *et al.*, 1987; AFIUNE, *et al.*, 1990).

5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A pesquisa crescente nas técnicas de hibridação do DNA lançou uma ampla e nova perspectiva no estudo de várias doenças. A especificidade do material genético permite, após sua extração e análise, diagnósticos precisos, inclusive das mutações gênicas dos indivíduos em estudo (BRASIL. Ministério da Saúde, 1995; BRASIL. Ministério da Saúde-FNS, 1994; ROSEMBERG, 1993; MARKS, 1993; SHANKAR, *et al.*, 1991).

Na tuberculose, estas técnicas representaram uma verdadeira revolução no estudo da doença. Sua aplicação dá-se em qualquer área, desde a epidemiologia até a prevenção, mas é no diagnóstico que se faz sentir sua grande importância (BRASIL. Ministério da Saúde, 1995; BRASIL. Ministério da Saúde-FNS, 1994; ROSEMBERG, 1993; MARKS, 1993; SHANKAR, *et al.*, 1991).

Partindo-se das possibilidades de uso da reibridação do DNA, obteve-se, com a técnica de Southern-Blot, a partir de culturas de *M. tuberculosis*, uma especificidade próxima de 100%, mas sem sensibilidade suficiente para o uso clínico. A evolução dos conhecimentos permitiu o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que aliou à alta especificidade já conseguida com uma sensibilidade impressionante (BRASIL. Ministério da Saúde, 1995; BRASIL. Ministério da Saúde-FNS, 1994; ROSEMBERG, 1993; MARKS, 1993; SHANKAR, *et al.*, 1991).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi introduzida em 1985 por SAIKI e colaboradores e MULLIS, *et al.*, (1986). É uma técnica que permite a amplificação *in vitro*, e de forma exponencial, de segmentos de DNA, levando à produção de grande quantidade deste fragmento. É, portanto, extremamente útil na amplificação e detecção de moléculas de DNA presentes em baixo número de cópias em uma amostra biológica. Basicamente, a PCR realiza *in vitro* um processo que as células fazem *in vivo*, ou seja, duplicação do DNA. Os requisitos básicos são: uma máquina termocicladora, uma DNA-polimerase termorresistente, *primers* apropriados, os quatro nucleotídeos e a amostra contendo o DNA a ser amplificado. O processo ocorre em três etapas. Inicialmente, a amostra é aquecida a cerca de 95°C por um tempo ao redor de 30 a 60 segundos, para que haja desnaturação do DNA, ou seja, separação das duas fitas complementares. A seguir, a reação é resfriada a cerca de 50-65°C por aproximadamente um minuto. Nesta etapa, ocorre o anelamento ou ligação dos *primers* às regiões complementares das fitas separadas de DNA. A reação é levada a 72°C por

um minuto, quando a DNA-polimerase acrescenta nucleotídeos em seqüência aos *primers*, formando uma fita complementar. Assim, duas novas fitas são sintetizadas nos moldes das duas fitas originais. O ciclo é repetido, com a síntese de quatro novas fitas e, em poucas horas, têm-se milhões de cópias (ANDRADE, 1993). A chave tecnológica deste procedimento é a DNA polimerase termoestável, pois a maioria das enzimas é destruída irreversivelmente a altas temperaturas. A *Taq* DNA polimerase, isolada de uma bactéria termofílica (*Thermus aquaticus*), é a primeira de uma série de enzimas resistentes a elevadas temperaturas (SAIKI, *et al.*, 1988). Um ponto crucial na PCR são os *primers*. Só haverá amplificação de DNA, se houver hibridação do *primer* com a região do DNA a ser amplificada. Este quesito confere especificidade à reação, pois, entre as inúmeras seqüências de DNA de uma amostra, somente será amplificada aquela que contiver regiões complementares aos *primers* utilizados (ANDRADE, 1993). O ponto mais crucial de uma PCR é a temperatura de anelamento, pois, em temperatura baixa, *primers* podem se ligar ao DNA não especificamente.

A aplicação desta potente tecnologia atingiu todo os aspectos da ciência médica e da prática da medicina, do estudo da regulação gênica ao diagnóstico de doenças infecciosas, neoplásicas e hereditárias (MA, 1995). Poucas técnicas receberam a atenção da comunidade científica como aconteceu com a PCR.

Há evidências de que a eficácia da reação em cadeia da polimerase está relacionada ao tratamento aplicado nas amostras clínicas antes da amplificação, pois a extração do DNA pode ser um fator limitante para o

resultado final. Em alguns estudos, foi observada a discordância de resultados, dependendo do método de extração utilizado (PFALLER, 1994).

O interesse no desenvolvimento de técnicas de genética molecular em micobacteriologia resume-se numa simples e fundamental característica do *M. tuberculosis*: seu crescimento lento. Se a taxa de crescimento do *M. tuberculosis* fosse semelhante à da *Escherichia coli*, então poderíamos rapidamente isolar, definir espécie e a susceptibilidade a drogas, sendo de pequena valia os métodos moleculares de diagnóstico.

A detecção rápida e precisa do *M. tuberculosis* tem um forte impacto no cuidado e tratamento de pessoas infectadas e do controle da tuberculose na população (PFALLER, 1994). O ressurgimento da tuberculose, principalmente nos países desenvolvidos, precipitou uma avalanche de estudos para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais rápidos e eficazes na detecção e caracterização das micobactérias no laboratório de microbiologia clínica.

Desde que a PCR permite a detecção de até uma molécula de DNA alvo, a contaminação acidental da amostra, com uma seqüência-alvo, pode facilmente levar a um resultado falso positivo. Portanto, o alto poder de amplificação que dá à PCR uma das suas principais características, também lhe confere limitações.

Antes que a PCR pudesse ser utilizada no estudo da tuberculose, seqüências-alvo específicas para a amplificação tiveram de ser identificadas. O primeiro desafio foi identificar seqüências de DNA, que poderiam não só separar as micobactérias de outras bactérias patogênicas, mas que

pu dessem distinguir entre espécies de micobactérias. Muitos alvos de amplificação no genoma das micobactérias foram identificados. Dentre eles podemos citar os genes que codificam as proteínas de 32KDa (SOINI, *et al.*, 1992), 38 KDa (MIYAZAKI, *et al.*, 1993), 65KDa (BRISSON-NOËL, *et al.*, 1989) e os genes *dnaJ* (TAKEWAKI, *et al.*, 1993), e *mtp 40* (PARRA, *et al.*, 1991). Alguns desses são gênero ou grupo específicos e, para identificação de espécies, seria necessária a realização de hibridação ou o uso de enzimas de restrição.

Em 1990, EISENACH, *et al.* sintetizaram um par de *primers* que amplificou um fragmento presente numa seqüência repetitiva (IS6110) do DNA do *M. tuberculosis*. O produto amplificado, um fragmento de 123 pares de bases, foi detectado pela técnica de PCR, apenas nas amostras de cepas do complexo *M.tuberculosis* e *M.simiae*. Os autores enfatizaram que a sensibilidade da técnica de PCR estaria diretamente relacionada ao número de cópias da seqüência IS6110 contida no genoma do *M. tuberculosis*, em média 6 a 20 cópias.

A seqüência de inserção IS6110 tem significado funcional desconhecido, pois não é um gene: ela pertence à classe de moléculas denominadas transposons, que são fitas de DNA capazes de auto-replicação e podem estar permanentemente integradas ao genoma do hospedeiro. O significado funcional da seqüência não tem importância para o seu uso como alvo de amplificação na PCR, desde que ela seja única ao organismo que pretendemos estudar. Além do *M. tuberculosis*, a IS6110 foi encontrada somente nas bactérias do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M.*

bovis, *M. microti* e *M. africanum*). Recentemente, *M. tuberculosis* isolados no sudeste asiático não apresentaram esta seqüência de inserção (YUEN, *et al.*, 1993).

BÖDDINGHAUS, *et al.* (1990) propuseram a amplificação de um fragmento gênico da seqüência 16S que codifica o RNA 16S ribossomal com a finalidade de uso clínico. Os autores focalizaram os seguintes aspectos: o RNA é constituinte essencial dos ribossomas das micobactérias, a seqüência de RNA é característica de cada organismo, sendo usada para estudos de filogenética, e toda célula apresenta grande número de fragmentos gênicos que codificam o RNA 16S ribossomal, proporcionando um aumento da sensibilidade da técnica de PCR. O sistema analisado detectou DNA em materiais contendo menos de dez micobactérias. Este teste foi desenvolvido comercialmente, recebendo a denominação de “Amplicor™” (Roche Molecular Systems).

Recentemente, foi desenvolvido um sistema de amplificação, mediado pela transcrição de RNA ribossomal (rRNA), com posterior detecção por quimiofluorescência do produto amplificado através de sondas de DNA. A detecção de RNA pode ser de grande importância na identificação de bactérias e fungos que devem conter milhares de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) ou rRNA (BÖDDINGHAU, *et al.*, 1990). O RNA pode ser detectado por PCR se, primeiramente, este é convertido em DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa. Esta técnica alternativa foi desenvolvida comercialmente e veiculada com a seguinte denominação: Gen probe Amplified *M. tuberculosis* Direct Test (AMTD).

Estudos iniciais demonstraram alta especificidade para detecção de *M. tuberculosis*. Como este teste é positivo apenas quando há RNA viável, presume-se que apresente correlação direta com atividade bacilar.

A reação em cadeia da polimerase tem sido usada para detectar DNA de micobactéria em líquido pleural, apresentando uma sensibilidade em torno de 20%-80%, dependendo da região que se amplifica e da técnica de extração utilizada, com especificidade de 78%-100%. O parâmetro que determina a sensibilidade da PCR é provavelmente, o número de bacilos nas amostras de líquido pleural analisadas (DE WIT, *et al.*, 1992)

QUEROL, *et al.* (1995) avaliou a utilidade da PCR no diagnóstico de tuberculose pleural, usando como DNA alvo a seqüência de inserção IS6110 do complexo *M. tuberculosis*. Neste estudo, a sensibilidade da cultura no líquido pleural foi de 69% e da PCR foi de 80%. Em outro estudo a PCR apresentou uma sensibilidade de 70% e uma especificidade de 100% no líquido pleural (NAGESH, *et al.*, 2001).

Desta forma concluímos que são vários os métodos laboratoriais usados atualmente na rotina diagnóstica da tuberculose pleural, mas esses métodos apresentam muitas limitações, dentre as quais baixa sensibilidade e longo período para a confirmação do diagnóstico. Neste contexto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) configura-se como alternativa, por ser uma técnica rápida, sensível e específica.

O objetivo deste trabalho é o emprego deste método para a detecção do *M. tuberculosis* em pacientes com suspeita de tuberculose pleural, comparando-o com as técnicas disponíveis na atualidade.