

V. Discussão

Nas últimas décadas, a tuberculose (TB) tem sido uma das principais causas de morte no mundo (quase 3 milhões de mortes anualmente) (BLOOM, *et al.*, 1992). A estimativa é de 8.8 milhões de casos novos/ano, correspondendo aproximadamente a 52.000 mortes por semana ou 7,000/dia, que traduz em mais de 1.000 casos novos por hora, diariamente (WHO, 1995; WHO, 1997). Aproximadamente, 80% destes pacientes com TB estão na idade economicamente produtiva de 15 a 49 anos.

O aparecimento da Aids e o declínio dos padrões socioeconômicos contribuíram para o ressurgimento da doença em países industrializados (BARNES, *et al.*, 1991). Na maioria dos países em desenvolvimento, embora a doença tenha sido sempre endêmica, sua gravidade aumentou por causa da pandemia da Aids. A TB, que era um grande problema de saúde pública mundial, tornou-se uma emergência global.

Entre as formas extrapulmonares da tuberculose, a pleural é a de maior incidência e, provavelmente, o diagnóstico mais freqüente dos derrames pleurais observados no país. Não existem dados publicados, no Brasil, dimensionando a ocorrência de comprometimento pleural entre as diversas formas de tuberculose extrapulmonar. No estado de São Paulo, um levantamento entre os anos de 1990 a 1994 mostrou que, de 102.770 casos notificados de tuberculose em maiores de 14 anos, 20.737 eram de formas extrapulmonares. O comprometimento pleural ocorreu em 8028 casos, que correspondem a 7,8% do total de casos e a 38,6 % das causas extrapulmonares (FIUZA DE MELO, *et al.*, 2000).

O Plano Nacional de Controle da Tuberculose / Fundação Nacional de Saúde (1999), realizou um levantamento no estado de São Paulo, onde mostrou que em 1988 ocorreram 18.379 casos novos de tuberculose, e desses casos, 2.802 eram de tuberculose extrapulmonar (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999).

O advento da pandemia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi responsável, entre outras causas, pelo aumento da incidência e morbidade da tuberculose. Tornaram-se também mais freqüentes os casos extrapulmonares entre os pacientes portadores do vírus, embora isto não esteja comprovado especificamente para a forma pleural (FIUZA DE MELO, *et al.*, 2000). BOLLELA (2000), relatou que os padrões radiológicos observados na tuberculose pulmonar de pacientes, com ou sem infecção pelo HIV, foi semelhante, no entanto, os pacientes infectados pelo HIV tiveram menor freqüência de cavitações e derrame pleural no exame radiológico de tórax que os HIV negativos.

O diagnóstico da tuberculose pleural é baseado na história clínica e epidemiológica, achados radiológicos, teste tuberculínico, análise microbiológica do fluido pleural e na detecção de granulomas em biópsias de pleura (SILVA, 1993). Entretanto, o exame direto com colorações de Ziehl-Neelsen ou auramina-rodamina tem baixa sensibilidade (6 a 10%) e, embora a biópsia pleural possua uma melhor sensibilidade (70 a 75%), o valor diagnóstico desta técnica com agulha de Cope depende da habilidade e do grau de treinamento de quem a manipula e da experiência pessoal de cada um.

Embora a introdução de técnicas radiométricas na cultura do *Mycobacterium* ou na combinação do procedimento com a hibridação de ácidos nucléicos tenha reduzido o tempo necessário para obter um diagnóstico definitivo, são ainda necessários mais de 10 dias para a identificação do *M. tuberculosis* (QUEROL, *et al.*, 1995).

O ressurgimento da tuberculose nos países desenvolvidos e seu crescimento em todo o mundo, associado à epidemia de Aids, precipitaram um enorme interesse no estudo de metodologias de diagnóstico rápido da tuberculose, como até então não havia existido (BARNES & BARROWS, 1993). Além disso, tornou-se preocupante o aumento dos casos de tuberculose diagnosticados sem a realização da baciloscopia de escarro, dando oportunidade ao diagnóstico incorreto e ao tratamento inútil. Por outro lado, a possibilidade do diagnóstico mais precoce representaria um avanço qualitativo para o Programa de Controle da Doença, permitindo o tratamento precoce, chave para a redução da transmissão da doença (FIUZA DE MELO, *et al.*, 1992).

O desejo do diagnóstico mais precoce e preciso leva-nos a repensar o fluxo de investigação dos suspeitos e a considerar, dentro do arsenal propedêutico, outras composições de dados que permitam o início seguro do tratamento, diante da baciloscopia de escarro negativa (AFIUNE & IDE, 1993). Não podemos deixar de considerar, nesta perspectiva, a importância de alguns outros métodos de diagnóstico que, apesar de caros, contribuiriam muito para o avanço qualitativo do diagnóstico de formas paucibacilares da doença, e, sem dúvida, das formas precoces de tuberculose pulmonar

(GRANGE, 1989). Dentre as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos, a PCR foi a mais estudada e empregada no diagnóstico das micobacterioses na última década. Os estudos sobre o emprego da PCR no diagnóstico da tuberculose foram capazes de elucidar muitos pontos a respeito das vantagens e limitações desta técnica (FORBES, 1997; IEVEN & GOSENS, 1997; ROTH, *et al.*, 1997; AMERICAN THORACIC SOCIETY WORKSHOP, 1997).

O uso da PCR na rotina diagnóstica de tuberculose deve ser avaliado, considerando todas as peculiaridades da doença em cada região, do serviço e dos métodos diagnósticos disponíveis.

Em nosso estudo, a análise de sensibilidade, especificidade, acuidade e valores preditivo positivo e negativo foram calculados levando em consideração a nossa definição de caso. É importante lembrarmos 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. Se realizado conforme padronização, esperam-se resultados reprodutíveis e constantes. No entanto, os valores preditivos positivo e negativo são variáveis dependentes da prevalência da doença na população em que o teste será empregado. A acuidade refere-se ao grau em que o exame é apropriado para medir o verdadeiro valor daquilo que é medido, observado ou interpretado. A validade ou acuidade informa se os resultados representam a “verdade” ou o quanto se afastam dela. O conhecimento sobre essa questão é fundamental na avaliação de um teste que se pretende implantar na rotina diagnóstica de doenças. A comparação

foi feita por meio de uma tabela 2X2, permitindo o cálculo direto da sensibilidade e especificidade diagnóstica.

Neste estudo, foram analisadas 58 amostras de 45 pacientes. Destes, 16 pacientes tiveram diagnóstico clínico ou laboratorial confirmado, conforme critérios descritos em definição de caso, totalizando 22 amostras.

A baciloscopia resultou negativa em todas as amostras, levando-nos a pensar no valor questionável desse exame para investigação de tuberculose pleural.

Das 22 amostras, a cultura foi positiva para *M. tuberculosis* em 3 amostras e, em outra amostra, houve a identificação apenas do gênero (*Mycobacterium* sp), sendo que as amostras identificadas como *Mycobacterium* sp e *M. tuberculosis* eram provenientes do mesmo paciente.

A sensibilidade da cultura foi de 18,2% e 18,8%, levando-se em consideração os resultados em amostras e pacientes, respectivamente.

A presença de pequeno número de resultados positivos na cultura pode ser decorrente da limitação intrínseca do cultivo que, no estudo de materiais orgânicos paucibacilares, somente é capaz de detectar amostras que possuam entre 50 e 1000 bacilos/ml (WOLINNSKY, 1994). Outras limitações do método, como contaminação ou dificuldades técnicas na identificação, podem explicar a não caracterização da espécie na quarta amostra positiva.

A baixa sensibilidade da cultura no líquido pleural também pode ser comprovada em um estudo realizado por BEGER & MEJIA (1973), em que foi constatado que, na cultura de fluido pleural, só é possível detectar a presença do *M. tuberculosis* em 20 a 30% dos pacientes com tuberculose

pleural e a biópsia de pleura em 50 a 80% dos pacientes com doença (JAY, 1985; BEGER & MEJIA, 1973).

Em um outro estudo, o rendimento da cultura no líquido pleural apresentou-se mais baixo para *M. tuberculosis*, 13% na tuberculose pleural e 75% para tuberculose associada ao câncer (CONDE & KRITSKI, 1995).

O exame histopatológico foi realizado em 27 dos 45 pacientes, sendo feito apenas um exame por paciente. O resultado foi sugestivo de tuberculose (pleurite granulomatosa) em 5 e negativo em 22 pacientes. A sensibilidade do histopatológico foi de 55,6%. Para este cálculo, consideramos o exame histopatológico sugestivo (pleurite granulomatosa) como positivo, mesmo sem haver a visualização do agente. Dos 16 pacientes com tuberculose, o histopatológico foi realizado em apenas 9 casos, sendo sugestivo de TB em 5 e negativo em 4, podendo isto, talvez, dificultar uma melhor interpretação e uma comparação adequada com os outros métodos. O resultado confirma uma boa sensibilidade do método e uma especificidade alta por inclusão do histopatológico na definição de caso. Em 2 amostras, a cultura foi positiva, e a PCR foi negativa. Estas amostras eram purulentas, e, devido a isto, pode ter ocorrido a inibição da PCR, levando a um resultado falso-negativo. Nos casos de amostras purulentas, há liberação de proteases e nucleases que digerem as proteínas e DNA do *M. tuberculosis*, contribuindo para os resultados falsos-negativos na PCR. Em outras 2 amostras com o diagnóstico de tuberculose, o histopatológico foi inespecífico, e a PCR foi positiva. A baixa realização do exame histopatológico pode ser explicada pelo fato de tratar-se de um método

invasivo, necessitando de equipamento adequado e presença de profissional médico tecnicamente habilitado para o procedimento, e ser contra-indicado nos casos em que se suspeita de empiema.

A média dos valores da dosagem da ADA nas amostras com diagnóstico de tuberculose foi de 53 U/L \pm 35/L e a mediana foi de 40U/L,e, nas amostras restantes foi de 37 U/L \pm 31U/L com uma mediana de 29U/L. A sensibilidade foi de 50% e 68,8% para as amostras e pacientes, e a especificidade foi 75% e 72,4%, respectivamente.

Este dado sugere uma baixa especificidade deste método comparada à PCR, que foi de 97,2% e 96,6 para as amostras e pacientes. A ADA pode estar com valores aumentados devido à presença de pacientes com outras entidades patológicas. Se fossem excluídas as duas amostras provenientes de uma paciente com linfoma de pleura, condição reconhecidamente associada a altas concentrações da enzima, o valor médio nas amostras da pleurite não-tuberculosa seria de 33 \pm 27U/L. Na literatura, os valores médios encontrados para a dosagem da ADA para tuberculose foram de 62,2 \pm 27,4U/L e da pleurite não-tuberculosa 13,8 \pm 10,3 U/L (FIUZA DE MELO, *et al.*, 2000).

Considerando o cut-off de 40U/L, o teste foi considerado positivo em 11 amostras de pacientes com tuberculose, demonstrando uma melhor sensibilidade do que a PCR. Nas amostras de pacientes em que o diagnóstico de tuberculose foi descartado, 9 amostras apresentaram dosagem superior a 40U/L, denotando uma baixa especificidade. Quanto ao valor de corte da ADA indicativo de TB, a literatura internacional apresenta

uma grande variação. A maioria se situa entre 30 e 50 U/L. Valores de corte mais altos (70 U/L) são referidos por BAÑALES, *et al.* (1991). No Brasil, provavelmente influenciados pelo trabalho pioneiro de CESTARI FILHO, *et al.* (1987), vem sendo usado o valor de corte de 40U/L. OLIVEIRA, em 1989, estudando 147 portadores de derrame pleural, aplicou o corte indicativo de 70U/L, porém este mesmo autor usa o valor de 40U/L, ao publicar um estudo, junto com ROSSATO, *et al.*, (1994) com amostra ampliada para 276 pacientes.

A sensibilidade da ADA foi de 50% e 68,8% para amostras e pacientes, respectivamente, e estes dados estão de acordo com os observados por QUEROL, 1995, onde os resultados da ADA foram mais sensíveis do que os outros métodos, confirmando, desta forma, a utilidade da ADA como um método simples e rápido, porém, indireto, para o diagnóstico de tuberculose pleural. Entretanto, em áreas de baixa prevalência de tuberculose, a utilidade da ADA é limitada pela baixa especificidade, porque esta enzima é encontrada no fluido pleural associado a linfoma, empiema e mesotelioma (VAN, *et al.*, 1987).

Difícilmente haverá um valor de corte universal para a atividade da ADA, devendo o mesmo ser validado para cada região e, eventualmente, para o serviço em que se realiza o exame, de acordo com a técnica e metodologia empregadas, prevalência de tuberculose e presença de pacientes imunodeprimidos (WOLINNSKY, 1994).

O método de PCR empregado neste estudo foi baseado na amplificação de uma porção do genoma localizado na inserção IS6110.

THIERRY e colaboradores (1990) descreveram que esta seqüência é repetida de 1 a 20 vezes no genoma da micobactérias e é específico para o complexo *M. tuberculosis*. Usando esta seqüência, EISENACH *et al.* (1991), estudaram 162 amostras de escarro e obtiveram uma excelente correlação entre os resultados da cultura e da PCR: 50 de 51 pacientes com cultura positiva foram também positivos na PCR, e nenhum falso positivo foi relatado. Entretanto, em situações em que a cultura para *M. tuberculosis* não tem uma alta positividade, o PCR pode ajudar no diagnóstico de tuberculose.

Nesse estudo, das 22 amostras com o diagnóstico de tuberculose conforme descrito em definição de caso, a PCR foi positiva em 6 amostras de 6 pacientes. Em todas as amostras foram realizadas as extrações no material total, no sobrenadante e no sedimento, para, desta forma, verificarmos o melhor material a ser extraído, e também em qual deles teríamos um melhor resultado. Uma amostra foi positiva apenas no sedimento, 3 amostras foram positivas apenas no material total, e as outras 2 amostras foram positivas no material total, no sobrenadante e no sedimento. Desta forma, podemos concluir que o material total foi onde obtivemos um melhor resultado, mas não podemos desprezar os outros materiais, pois, estes também contribuíram para a positividade da PCR. Quando se centrifuga o material, os bacilos concentram-se no sedimento e, junto, também alguns inibidores da reação, como a hemoglobina, inibindo desta forma a reação. Em algumas de nossas amostras, tivemos dificuldades para extrair o sedimento pela coluna de sílica em gel QIAamp,

pois a amostra tornava-se muito espessa, dificultando a sua passagem pela membrana de sílica.

Das 36 amostras provenientes de 29 pacientes, em que o diagnóstico de TB foi descartado, a PCR foi positiva em apenas uma. Este paciente encontra-se atualmente em tratamento hospitalar com diagnóstico de envolvimento neoplásico da pleura. O mesmo tem antecedentes de tuberculose há 20 anos, não estando excluída a possibilidade de uma reativação da doença, talvez pela sua baixa imunidade. Outra explicação seria da detecção pelo PCR de um *M. tuberculosis* presente no líquido pleural e que não estivesse sendo responsável pela doença atual. Por outro lado, mesmo que tenhamos tido cuidado em criarmos uma definição ampla de caso, e definirmos como caso de tuberculose o paciente que apresentasse um dos vários parâmetros descritos no material e métodos, este paciente pode representar uma falha na nossa definição de caso. Podemos levantar a possibilidade de contaminação cruzada que, devido a sensibilidade da PCR, poderia ser responsável pelo resultado falso-positivo. Entretanto, nos nossos experimentos sempre usamos materiais descartáveis e incluímos um controle negativo para nos precavermos de eventual contaminação.

A utilidade da PCR para tuberculose depende da situação clínica no qual o ensaio é realizado. No estudo de SCHLUGER e colaboradores, foi demonstrado que, a PCR pode não ser capaz de identificar a infecção ativa de uma reinfecção, particularmente em pacientes com dilatação crônica dos brônquios. A reação da PCR para tuberculose é extremamente sensível,

mas falta especificidade para identificar a tuberculose ativa (SCHLUGER, 1994). Para tanto, a alternativa seria o estudo da expressão gênica, do *M. tuberculosis* como foi feito por EISENACH, *et al.* (1999).

Neste estudo a sensibilidade da PCR nas amostras foi de 22,7% com intervalo de confiança de 7% a 45%, e para os pacientes a sensibilidade foi de 31,3% com intervalo de confiança de 11% a 58%, resultando em uma baixa sensibilidade, e estes dados estão de acordo com os observados por FOLGUEIRA, *et al.*,1993; PAO, *et al.*,1990; SHANKAR, *et al.*,1991; DE WIT, *et al.*,1992, em que os resultados da PCR oscilaram entre 13% e 100%, e a especificidade, de 88% a 100%.

PIERRE, *et al.* (1991) e SOINI *et al.* (1992) relatam uma baixa sensibilidade de 63% e 55,9%, em amostras de escarro que apresentam uma quantidade de bacilos muito maior do que em amostras paucibacilares como foi realizado neste estudo. Nossos resultados também sugerem uma baixa sensibilidade da PCR comparada ao ADA, por outro lado, a especificidade da PCR foi muito melhor.

A PCR é reconhecida como um método de alta sensibilidade, podendo detectar até 3 bacilos/ml (BOLLELA, *et al.*,1999), porém os seus resultados têm variado significativamente conforme o material estudado, assim como o método de extração utilizado (PFALLER,1994).

A PCR pode ser positiva em duas situações em que a cultura pode dar negativa. Uma delas envolve o paciente submetido a tratamento em que a PCR permanece positiva, em alguns casos, até mesmo depois de 6 meses (BRISSENOEL, *et al.*, 1989). Uma outra possibilidade (ainda não

demonstrada) é decorrente da existência de lesões quiescentes, particularmente em áreas com elevada prevalência da infecção. Em tais casos, embora o bacilo possa estar metabolicamente inativo seus genomas poderiam ser detectados pela PCR (DE WIT, *et al.*, 1992)

O fato de os derrames pleurais serem líquidos paucibacilares pode explicar, em parte, os poucos resultados positivos neste estudo. Estudos utilizando materiais com tais características (e.g. líquido, líquido ascítico, etc.) têm demonstrado uma baixa sensibilidade do método.

Em um estudo realizado por SHANKAR, *et al.* (1991), em líquido, a sensibilidade variou de 43% a 75%, enquanto na série descrita por CONDE & KRITSKI, *et al.*(1995), de 26% a 85%. Em outros trabalhos, também utilizando líquido, a sensibilidade e a especificidade oscilam entre 26% e 100% e de 88% a 92%, respectivamente (KOX, *et al.*,1994; SHANKAR, *et al.*,1991). No líquido, a sensibilidade da técnica também variou de acordo com o critério diagnóstico adotado para tuberculose. No aspirado gástrico, a sensibilidade esteve entre 60% e 100% e a especificidade em torno de 100% (THIERRY, *et al.*, 1990; PIERRI, *et al.*, 1993).

O diagnóstico pela PCR é limitado, em parte, pela presença de inibidores em amostras biológicas que podem interferir na lise celular, inativando a DNA polimerase, e/ou interferirem com os ácidos nucleicos (ABU, *et al.*, 2000; AKANE, *et al.*, 1994; KATCHER, *et al.*,1994; WILSON, *et al.*, 1997). Alguns materiais biológicos, como sangue, pus e escarro, têm sido relatados como a causa de resultados falso-negativos (BOLLELA, *et al.*, 1999). A hemoglobina pode inibir a PCR, devido à ligação dos grupamentos

heme e/ou porfirina à *Taq* DNA polimerase, inativando a enzima (HIGUCHI,1989). Outros exemplos de inibidores são o humor aquoso (WIEDBRAUK, *et al.*, 1995), a heparina (HOLODNIY, *et al.*, 1991), e a urina (KHAN, *et al.*, 1991), entre outros. Para lidar com este problema, os inibidores da PCR devem ser inativados ou removidos da amostra.

Embora seja conhecido que o sangue possua substâncias que inibem a PCR (AKANE, *et al.*, 1994) muitos métodos de purificação têm sido usados para eliminar esses inibidores. Um estudo realizado por FREDRICKIS (1998) tentou remover inibidores da PCR por vários métodos padrões de purificação, e um dos métodos utilizado foi o mesmo utilizado neste estudo - a coluna de sílica em gel QIAamp - mas todos falharam. Este estudo concluiu também que o polianetol sulfonate (SPS) é um componente comum em alguns meios de cultura de sangue e é um inibidor potente da PCR, mas pode ser removido pelo método de extração que utiliza hidrocloreto de guanidina.

Neste estudo, podemos ter-nos deparado com a presença desses inibidores em algumas de nossas amostras, pois, das 58 amostras dos 45 pacientes, 13 amostras de 10 pacientes eram hemorrágicas, e 4 amostras de 3 pacientes eram purulentas. Das amostras hemorrágicas, 2 pacientes tiveram diagnóstico de tuberculose conforme os critérios descritos em definição de caso.

Das 4 amostras purulentas, apenas uma amostra foi oriunda de caso não tuberculose. As outras 3 amostras de 2 pacientes foram diagnosticadas como caso de tuberculose conforme descritos na definição de caso.

Nas amostras purulentas, a cultura foi positiva nas 3 amostras dos pacientes diagnosticados como tuberculose conforme descritos na definição de caso, sendo que, em uma amostra, foi identificado apenas *Mycobacterium* sp. Todas essas amostras foram negativas na PCR, sugerindo a presença de inibidores na reação.

O crescimento aparentemente lento das espécies de *M. avium* e *M. intracellulare* dificulta a sua identificação com os métodos convencionais. Devido a isto, essas linhagens são identificadas como complexo *M. avium* - *M. intracellulare* (MAC) (RUNYON, et al., 1974 apud TARANTINO, 1982). Linhagens MAC estão distribuídas amplamente no meio ambiente, e têm sido isolados da água, solo, pássaros, entre outros (KAZDA, 1982).

Linhagens MAC raramente causam doença ao homem imunocompetente. Entretanto, a incidência de MAC em pacientes com Aids é elevada, entre 30 a 80%, especialmente naqueles com contagem de linfócitos CD4+ menor do que 50 células/mm³.

A base diagnóstica definida por KOCH, permanece atualíssima, e somente estudos apoiados na biologia molecular poderão comparar-se ao encontro do bacilo, em termos de especificidade (AFIUNE & DE, 1993).

Em resumo: em 58 amostras de 45 pacientes, 6 amostras de 6 pacientes foram positivas na PCR para *M. tuberculosis*. A cultura foi positiva em 3 amostras, e em outra houve a identificação apenas do gênero (*Mycobacterium*). As amostras identificadas como *Mycobacterium* sp e *M. tuberculosis* eram provenientes do mesmo paciente. O exame histológico da pleura foi realizado em 27 dos 45 pacientes, sendo feito apenas um exame

por paciente. O resultado foi sugestivo de tuberculose (pleurite granulomatosa) em 5 e negativo em 22 pacientes. Na dosagem da ADA, consideramos o cut-off de 40 U/L, o teste foi positivo em 11 amostras de 11 pacientes com tuberculose; nas amostras de pacientes em que o diagnóstico de tuberculose foi descartado, 9 amostras de 8 pacientes apresentaram dosagem superior a 40U/L. Com isso, podemos concluir que a PCR foi o exame que apresentou uma melhor especificidade em comparação aos outros métodos de diagnóstico e, desta forma, pode ser mais um método que pode auxiliar no diagnóstico da tuberculose pleural. O diagnóstico foi realizado por, pelo menos, uma das técnicas disponíveis, o que não seria possível se fosse utilizada apenas uma das técnicas relacionadas.

Acreditamos que a PCR deve ser um método disponível apenas em centros de referência para o diagnóstico e tratamento da tuberculose, não devendo ser encarada, na atualidade, como um teste que substituirá os métodos já disponíveis e sim como uma ferramenta a mais no diagnóstico da tuberculose.