

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM TUBERCULOSE

João BENTO, Anabela Santos SILVA, Filomena RODRIGUES, Raquel DUARTE

RESUMO

O diagnóstico precoce e o início de tratamento atempado são fundamentais para minimizar a transmissão e reduzir a morbidade e mortalidade da tuberculose. O diagnóstico clínico é muitas vezes difícil, devido aos sintomas inespecíficos e frequentemente insidiosos e a apresentação radiológica pode ser muito diversificada. Actualmente, o diagnóstico de tuberculose ainda depende de exames microbiológicos, os quais requerem um manuseio cuidadoso e um transporte rápido da amostra. Apesar da baciloscopia estabelecer um diagnóstico presuntivo rápido o método *gold-standard* para diagnóstico ainda é o isolamento cultural do *Mycobacterium tuberculosis*, o qual pode demorar várias semanas. As técnicas bioquímicas (adenosina desaminase) e moleculares (testes de amplificação de ácidos nucleicos) fornecem uma informação rápida ao clínico. Vários métodos diagnósticos alternativos estão ainda em fase experimental e até à data não têm indicação clara reconhecida.

Na maioria dos casos, o diagnóstico de tuberculose assenta numa combinação adequada de diferentes métodos diagnósticos, o que requer tempo até se obter um resultado. Mesmo assim, em alguns casos não se consegue obter confirmação microbiológica, sendo o diagnóstico e o tratamento estabelecidos com base na suspeição.

O objectivo deste artigo é discutir a utilidade dos vários métodos diagnósticos disponíveis e salientar as dificuldades mais comuns encontradas pelo clínico para estabelecer um diagnóstico correcto e atempado.

SUMMARY

DIAGNOSTIC TOOLS IN TUBERCULOSIS

Early diagnosis and treatment are critical to minimize the spread and to reduce morbidity and mortality from tuberculosis. Clinical diagnosis is most time difficult resulting from non-specific and frequently indolent symptoms. Radiological presentation may be very diverse. Currently TB diagnosis still depends on microbiological exams which require a very careful and quick specimen handling. A positive acid-fast bacilli smear makes a rapid presumptive diagnosis. Nevertheless the gold-standard for diagnosis still is cultural-isolation of the *Mycobacterium tuberculosis*, which may take several weeks to attain. Biochemical (adenosine deaminase) and molecular techniques (nucleic acid amplification tests) are already approved for tuberculosis diagnosis and can provide rapid diagnostic information to the clinician. Numerous alternative diagnostic methods are still under experimentation but none of them has a recognized role.

In most cases diagnosis of tuberculosis lays on an adequate combination of different diagnostic methods which is time-consuming. Even though in some cases laboratory confirmation is never obtained and diagnosis and treatment is established on suspicious basis.

The purpose of this paper is to discuss the utility of the several diagnostic methods currently available and to point out most common difficulties found by the clinicians to the correct and timely diagnosis.

J.B.: Serviço de Pneumologia. Hospital de São João. Porto
R.D.: Centro Diagnóstico Pneumológico de Vila Nova de Gaia. Serviço de Pneumologia. Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

A.S.S., F.R.: Laboratório Nacional de Referência para Micobactérias. Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge. Porto

© 2011 CELOM

INTRODUÇÃO

Há quatro factores determinantes na transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* (MT): (1) o número de microrganismos expelidos, (2) a concentração de microrganismos no ar, determinada pelo volume do espaço e a sua ventilação, (3) o intervalo de tempo que a pessoa exposta respira o ar contaminado (≥ 8 horas), e (4) o estado imunológico do indivíduo exposto¹.

O controlo da tuberculose (TB) depende, assim, do diagnóstico precoce e do início do tratamento adequado, de modo a reduzir as fontes de infecção e o risco de transmissão.

Os sintomas e sinais classicamente relacionados com a TB, embora importantes em termos de suspeita diagnóstica, são, porém, habitualmente inespecíficos, indolentes e, por vezes, de difícil valorização. Deste modo, os meios complementares de diagnóstico desempenham um papel primordial em termos de abordagem desta doença.

Os autores fazem uma revisão sobre os métodos diagnósticos disponíveis para a TB, as suas características operativas, limitações e interpretação com vista à decisão de iniciar tratamento.

MEIOS COMPLEMENTARES DE DIAGNÓSTICO

Hemograma e bioquímica

As alterações laboratoriais eventualmente encontra-

das na TB são pouco sensíveis e inespecíficas. O hemograma pode ser normal. As alterações hematológicas mais comuns são anemia e leucocitose, presentes, cada uma, em 10% dos casos¹. A anemia, geralmente é normocrómica, normocítica e a leucocitose é geralmente ligeira e com desvio da fórmula, havendo habitualmente linfocitose e monocitose. A elevação dos marcadores bioquímicos de infecção, velocidade de sedimentação e proteína C reactiva é habitualmente ligeira a moderada. A hiponatremia, presente em cerca de 11% dos doentes, resulta da libertação de hormona anti-diurética no pulmão afectado¹.

Radiologia

A TB pulmonar cursa quase sempre com alterações na radiografia de tórax. Virtualmente qualquer alteração radiológica, ou mesmo uma radiografia aparentemente normal pode corresponder a uma TB.

Classicamente, a TB pulmonar do adulto apresenta-se como um infiltrado focal dos lobos superiores, geralmente dos segmentos apical e posterior ou do segmento apical do lobo inferior. As cavitações, o padrão miliar, as adenopatias, o derrame pleural e as atelectasias (particularmente na criança), são outras possíveis alterações radiológicas encontradas na TB. Os doentes com formas avançadas de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) e baixa contagem de linfócitos T CD4 por vezes não têm a apresentação clássica². Nestes doentes, a apresentação clínica da TB, é particularmente atípica, apresentando-se

Quadro 1 – Estudo da tuberculose extra-pulmonar de acordo com o local envolvido (adaptado de ³⁵)

Local	Imagiologia	Cultura	Biópsia
Gânglio linfático	-	Biópsia/Aspirado	Gânglio
Osso/Articulação	Rx e TAC RMN	Biópsia Aspirado líquido sinovial	Osso
Gaстрintestinal (GI)	Ecografia abdominal TAC abdominal	Líquido ascítico Biópsia	Epiplon Tracto GI
Genito-urinária	Ecografia renovesical Urografia EV	Urina (1 ^a da manhã) Biópsia	Local envolvido
Sistema Nervoso Central	TAC cerebral RMN cerebral	Liquor (LCR) Biópsia	Tuberculoma
Pericárdio	Ecocardiograma	Líquido pericárdico Biópsia	Pericárdio
Outro órgão	Adequada ao local	Biópsia	Local envolvido
Disseminada	TAC-AR tórax Ecografia abdominal	Lavado brônquico Biópsia Sangue	Pulmão Fígado Medula óssea

frequentemente com formas não cavitárias, infiltrados nos lobos inferiores, linfadenopatias hilares e derrame pleural². Por outro lado, os doentes co-infectados com MT e VIH apresentam mais frequentemente, e em cerca de 10 a 20% dos casos, uma radiografia de tórax normal¹. Nas formas extrapulmonares disseminadas, a radiografia de tórax é anormal na maioria dos doentes¹. Nestas, variando de acordo com os estudos, entre 50 e 90% dos casos apresentavam padrão miliar¹.

Por outro lado, é geralmente difícil determinar apenas pela radiografia, o grau de actividade da doença (antiga *versus* recente). Imagens com densidade cicatricial e mesmo com granuloma calcificado podem estar presentes na TB activa.

Dada a sua maior sensibilidade, a tomografia computadorizada (TC) pode ser necessária no diagnóstico de TB, nomeadamente para esclarecimento de adenopatias, estenoses brônquicas e formas miliares.

Estudo micobacteriológico

A suspeita de TB pode ser baseada na clínica e nas alterações radiológicas, no entanto, o diagnóstico definitivo requer o isolamento do agente etiológico, efectuado em amostras respiratórias ou extra-respiratória ou, no caso de amostra respiratória detecção de TAAN e baciloscopia positiva³. No entanto, o exame *gold-standard* para o diagnóstico de TB continua a ser o isolamento do MT em exame cultural.

As secreções brônquicas são o produto mais frequentemente enviado ao laboratório, perante suspeita de TB pulmonar. O doente deve ser instruído sobre o método adequado de colheita de expectoração, bem como a proceder ao seu rápido transporte para o laboratório, ou caso tal não seja possível, proceder ao seu acondicionamento a uma temperatura de 4 a 5°C, por um período que não exceda os cinco dias. A amostra deverá ser colhida para um frasco esterilizado de boca larga e com tampa de enroscar, de modo a que não ocorram derrames¹.

Idealmente, a colheita de expectoração deveria ser presenciada por um profissional treinado, de modo a promover uma técnica de colheita adequada^{1,2}. Regra geral, preconiza-se a colheita de três amostras de expectoração, após tosse produtiva profunda, com um volume mínimo de 5 ml, no início da manhã e em três dias consecutivos. A colheita de amostras seriadas baseia-se no facto de menos de metade dos casos serem detectados numa única amostra de expectoração^{3,4}. Alguns estudos têm demonstrado, porém, que o valor da terceira amostra é questionável, dado que na quase totalidade dos casos em que se obteve diagnóstico, o agente foi isolado nas duas primeiras amos-

tras⁵. Na realidade, o ganho em termos de sensibilidade da segunda para a terceira amostra é de 2 a 5%^{6,7}. Por outro lado, cerca de 90% dos casos de TB ocorrem em países com baixos recursos económicos e profissionais e o diagnóstico baseia-se, sobretudo em exames micobacteriológicos directos⁸. Nesta sequência, a OMS reviu recentemente as suas indicações, recomendando que o número de amostras aconselhadas para pesquisa de MT seja reduzido de três para dois, nos países com elevadas solicitações de exames e baixos recursos humanos nos laboratórios^{6,9}. No entanto, o risco de falhar o diagnóstico por limitar o número de amostras deve ser equacionado face à gravidade clínica do doente e ao risco para a comunidade resultante de o doente não ser tratado.

Em doentes que não conseguem emitir espontaneamente expectoração poderá ser necessário recorrer à indução da expectoração através da inalação de uma solução salina hipertónica, à broncofibroscopia (BFC) com lavado brônquico (LB) e lavado broncoalveolar (LBA), à colheita de expectoração após BFC e à realização de aspirado gástrico.

Todas estas técnicas, à excepção do aspirado gástrico, promovem a libertação de aerossóis potencialmente contendo MT, acarretando elevado risco de transmissão, pelo que devem ser realizadas em cabinas adequadamente ventiladas, preferencialmente com pressão negativa, por pessoal usando equipamento de protecção da via aérea adequado. No caso particular da expectoração induzida, uma vez que torna a tosse e a expectoração particularmente violentas e não controladas, deve ser realizado em instalações próprias, equipadas com filtro de partículas de ar de alta eficácia (HEPA) e os técnicos estarem equipados com protecção respiratória adequada^{1,10,11}. Por outro lado, também a BFC é indutora de tosse e passível de gerar gotículas potencialmente infectantes, aumentando a exposição ao MT^{10,11}.

Apesar de ter caído em desuso face ao fácil acesso à BFC, a expectoração induzida apresenta uma boa rentabilidade diagnóstica para a TB, sendo, nomeadamente, superior à expectoração espontânea e ao aspirado gástrico^{11,12}. A expectoração induzida através da nebulização com um aerossol de solução salina hipertónica (3 a 15%) aumenta o volume de expectoração e facilita a sua mobilização, melhorando a qualidade da amostra, comparativamente à expectoração espontânea, mesmo que supervisionada^{1,2,12}. As amostras obtidas por esta técnica são habitualmente muito fluidas e aquosas, pelo que devem ser referenciadas como obtidas por *expectoração induzida*, para não serem interpretadas, pelo laboratório, como amostras inadequadas e, portanto rejeitadas¹.

A BFC pode ser necessária para estabelecer o diagnóstico de TB nos casos em que este não é possível através da expectoração. No entanto, mesmo nos casos com doença pulmonar extensa, o LBA pode ser negativo¹. Tem sido referido que os anestésicos locais habitualmente usados na BFC podem inviabilizar o MT, devendo ser usados criteriosamente¹. A expectoração produzida logo após a BFC e na manhã seguinte deve ser, igualmente, enviada para o laboratório. Por vezes, o efeito indutor de expectoração da BFC persiste durante vários dias, devendo essas amostras ser colhidas e analisadas¹.

Apesar de os resultados não serem consensuais, alguns estudos têm sugerido que a acuidade diagnóstica do exame directo e cultural da expectoração colhida por indução tem uma sensibilidade de cerca de 90%, equivalente à do LB e LBA^{12,13}. Outros estudos, porém, apontam para uma maior sensibilidade do LBA, reservando a expectoração induzida para os casos em que o acesso à BFC é mais difícil⁴. Por outro lado, a expectoração induzida é um método mais bem tolerado pelo doente, mais barato e que pode ser repetido com maior facilidade do que a BFC.

A acuidade diagnóstica da expectoração induzida pode ser aumentada pela realização de múltiplas (três ou mais) induções⁴. Pela colheita de amostras seriadas de expectoração induzida, têm sido descritas taxas de detecção de 91 a 98% pelo exame directo e de cerca de 99% no exame cultural, o que é superior à de uma BFC isolada⁴. Tal pode dever-se ao facto de a sensibilidade do exame micobacteriológico de uma única amostra ser baixa, mesmo que esta seja colhida por BFC⁴. Alguns autores têm sugerido que, desde que se respeitem as medidas de isolamento respiratório, a estratégia com melhor relação risco-benefício para o diagnóstico de TB em doentes com dificuldade em expectorar é a colheita de expectoração induzida, idealmente três amostras, e reservar o LBA para os casos em que a indução de expectoração foi ineficaz ou em que se colocam diagnósticos diferenciais, nomeadamente neoplásica, que tornam inaceitável a demora na obtenção de amostras.

O aspirado gástrico pode ser necessário nos doentes, particularmente crianças, incapazes de colaborar na colheita ou que não conseguem expectorar, mesmo após inalação de aerosol¹. Baseia-se na presença de MT nas secreções respiratórias que são deglutidas durante a noite e se acumulam no conteúdo gástrico. Devem aspirar-se cerca de 50 ml de conteúdo gástrico, logo no início da manhã, após jejum de 8 a 10 horas, com o doente ainda deitado.¹ Geralmente procede-se à colheita de três amostras, em três dias consecutivos que devem ser enviadas de imediato ao laboratório, até quatro horas após a colheita, ou em alter-

nativa conservadas num frasco com agente neutralizante da acidez gástrica (100 mg de carbonato de sódio)¹². Nas crianças, é possível o isolamento de MT no aspirado gástrico em cerca de 40% dos casos com doença pulmonar radiologicamente significativa¹.

Apesar da diminuição do número total de casos de TB, nos países desenvolvidos, tem-se verificado um aumento gradual e contínuo da proporção das formas extra-pulmonares, principalmente devido ao número crescente de doentes imunocomprometidos. Virtualmente, qualquer tecido orgânico pode ser atingido, pelo que o tipo de amostras colhido para diagnóstico depende do local da doença. Os produtos extra-pulmonares mais frequentemente enviados ao laboratório para pesquisa de MT são os aspirados, incluindo pús, as biópsias, a urina e os líquidos estéreis, nomeadamente, o líquido pleural, o líquido pericárdico, o líquido peritoneal, o líquido cefalo-raquidiano (LCR) e o líquido sinovial. Os produtos extra-pulmonares são habitualmente pobres em bacilos (paucibacilares), o que acarreta problemas extra em termos de colheita, condicionamento e transporte, assim como torna a pesquisa do MT, quer em exame directo, quer em exame cultural particularmente difícil⁶. Devem ser colhidos em recipientes estéreis, para minimizar a contaminação com outras bactérias, sem conservantes, para não comprometer a viabilidade dos bacilos e enviados rapidamente para o laboratório, a fim de evitar a proliferação de outros microrganismos. Na impossibilidade do envio imediato da amostra, esta pode ser acondicionada à temperatura de 4 a 5°C.

No caso particular da TB pleural, a pobreza em bacilos no líquido pleural limita, na maioria dos casos, a obtenção de positividade no exame directo a menos de 5% dos casos e culturas positivas a menos de 58% dos casos^{1,14,15}. Por seu lado, a biópsia pleural mostra granulomas inflamatórias em cerca de 60% dos doentes¹. Há estudos que sugerem uma capacidade de diagnóstica próxima dos 90% com a combinação da análise do líquido e da biópsia pleural¹. Na verdade, os exames micobacteriológicos (directo e cultural) do líquido pleural, combinados com a biópsia pleural para estudo micobacteriológico (directo e cultural) e anatomopatológico (detecção de granulomas) parecem ser, actualmente, a forma mais sensível para diagnosticar a TB pleural, apesar dos resultados falsos negativos ocorrerem em 15 a 20% dos casos^{14,15}.

Na suspeita de TB renal, a análise micobacteriológica de três amostras da primeira urina da manhã, do jacto médio, colhidas em três dias consecutivos, após higiene cuidadosa, poderá ser solicitada. O exame cultural é aquele que assume maior importância diagnóstica, uma vez que o exame directo da urina é habitualmente negativo, haven-

do autores que não lhe reconhecem vantagem em termos de relação custo-benefício¹.

Em determinadas circunstâncias, quando não for possível a obtenção de diagnóstico por técnicas menos invasivas, pode ser necessário o exame micobacteriológico e histológico de amostras obtidas por aspirado e biópsia de lesões suspeitas (pulmonar, pericárdica, peritoneal, de gânglios linfáticos, óssea, de articulações, intestino, epididimo, etc.). A porção da amostra conservada em formaldeído para exame histológico não pode ser usada para exame cultural.

Nos doentes com imunossupressão grave, particularmente nos infectados pelo VIH, o exame micobacteriológico de fezes pode ser útil, quando se suspeita de TB intestinal ou de infecção por *Mycobacterium avium*. A pesquisa de MT em amostras de sangue ou medula óssea deverá ser solicitada, perante a suspeita de TB disseminada. Nestes casos deve ser solicitado ao laboratório o meio de cultura adequado e a amostra deve ser colhida directamente para este e enviada rapidamente ao laboratório.

Exame micobacteriológico directo

O exame micobacteriológico directo é uma técnica rápida, que desempenha um importante papel no diagnóstico presumptivo de TB. Baseia-se nas características da parede celular das micobacterias, com elevado teor em lípidos, o que lhes confere resistência à descoloração por álcool-ácido. A maioria dos programas de luta contra a TB enquadra o exame micobacteriológico directo na avaliação inicial dos casos suspeitos. Para além da positividade do exame directo, o microbiologista deverá fornecer também uma noção quantitativa da carga bacilar. De acordo com a nova definição da OMS, a definição de um caso de TB, a partir de um exame directo positivo baseia-se na presença de pelo menos um bacilo álcool ácido resistente (BAAR), em pelo menos uma amostra de expectoração¹⁶. Trata-se de um exame rápido, de fácil execução e de baixo custo. É, porém, uma técnica com baixa sensibilidade, exigindo a presença de, pelo menos, 10^4 bacilos/ml para se obter um exame positivo. As taxas de positividade variam entre 20 e 80% dos casos confirmados por exame cultural¹. A sensibilidade é mais reduzida nas formas paucibacilares, nas crianças, idosos e imunossuprimidos. Por outro lado, o seu valor preditivo positivo para TB é baixo (50 a 80%) nos locais onde o isolamento de Micobactérias não tuberculosas (MNTB) é comum¹.

O exame micobacteriológico directo pode ser realizado por diferentes métodos. A técnica de Ziehl-Neelsen (ZN), uma das mais utilizadas, baseia-se na coloração pela fucsina básica que confere aos BAAR uma cor avermelhada após

lavagem por álcool-ácido. A técnica de fluorescência baseia-se na coloração pela auramina, permitindo a visualização dos BAAR como bacilos amarelo-fluorescentes quando observados em microscopia de fluorescência. A técnica de ZN requer uma observação com ampliação de 1000x, ao passo que para a coloração fluorescente basta uma ampliação de 250 ou 450x. Embora, de acordo com a maioria da literatura, as sensibilidades das duas técnicas sejam sobreponíveis, alguns autores, têm considerado mais sensível o método da fluorescência, justificando-o pelo facto de ser uma técnica mais rápida e menos fatigante⁵.

Um exame micobacteriológico directo positivo, num doente com alto risco, faz o diagnóstico de presunção de TB, apesar de não diferenciar o tipo de BAAR, nem permitir distinguir bacilos vivos de bacilos mortos. Assim, a positividade em exame directo deve ser interpretada no contexto clínico e epidemiológico, de modo, a fazer o diagnóstico presuntivo de TB e permitir o início de tratamento antes de ser feita a confirmação pelo exame cultural.

Apesar das limitações apontadas, o exame directo mantém-se útil, quer na avaliação inicial e detecção de novos casos, quer através de uma leitura quantitativa da carga bacilar, ao avaliar o grau de infecciosidade e, como exame de monitorização da resposta à terapêutica, através da variação da carga bacilar.

Exame micobacteriológico cultural

Conforme já foi referido, o exame micobacteriológico directo não confirma o diagnóstico de TB, já que outras MNTB também são álcool-ácido resistentes. Por outro lado, o exame cultural é o único método que confirma a viabilidade das micobactérias¹⁷.

Mesmo nos casos assintomáticos, ou com radiografia de tórax normal, um resultado cultural positivo define um caso activo, com necessidade de tratamento, uma vez excluída a possibilidade de contaminação da amostra por MT.

Assim, o exame cultural continua a ser fundamental, dado que uma cultura positiva para MT faz o diagnóstico de TB. Basta a presença de 10 bacilos/ml de amostra para se obter um exame cultural positivo, sendo, assim, uma técnica mais sensível que o exame directo. Em geral, a sensibilidade do exame cultural é de 80-85% e a especificidade de aproximadamente 98%¹. Um exame cultural positivo permite avaliar a sensibilidade aos fármacos antibacilares e demonstrar a eficácia do tratamento, ao determinar quando um doente deixa de ser contagioso. Apesar de o exame cultural se manter como *gold-standard* no diagnóstico e seguimento das infecções micobacterianas é, porém, um processo muito demorado, podendo requerer até 60 dias

para se obter um resultado definitivo. Tal facto advém do crescimento lento do MT.

Os meios de cultura sólidos, dos quais o meio de Löwestein-Jensen (LJ) é o mais usado, permitem uma leitura quantitativa, através da contagem do número de colónias, o que o torna o mais adequado para a monitorização do tratamento. O crescimento é porém muito demorado, sendo necessárias cerca de 2 a 3 semanas para obter um resultado positivo.

Os meios de cultura líquidos (meio Middlebrook) são meios mais enriquecidos, o que lhes confere uma maior sensibilidade. O aparecimento de sistemas automáticos e semi-automáticos de leitura do crescimento das micobactérias em meio líquido constituíram um importante avanço na micobacteriologia. Estes sistemas permitem uma detecção mais precoce do crescimento utilizando diferentes métodos: (1) radiométrico (libertação de CO₂ marcado por Carbono 14, no Bactec 460TB[®]), (2) fluorimétrico (libertação de um composto fluorescente devido ao consumo de O₂, no MGIT[®] e no Bactec MGIT 960[®]), (3) colorimétrico (baseado na aquisição de cor por parte do meio de cultura, através de uma reacção de redução secundária ao consumo de O₂ pelo MT, no MB Redox[®]). Desta forma consegue-se obter uma cultura positiva entre 5 a 15 dias, sendo os meios mais indicados para a detecção de novos casos. No entanto, os meios líquidos não permitem a quantificação do crescimento das micobactérias e são particularmente propícios à contaminação por outras bactérias. Para melhorar a especificidade pode ser utilizada concomitantemente a cultura em meio sólido¹.

Atendendo ao possível crescimento de bactérias contaminantes nos meios de cultura (líquidos e sólidos), a constatação de uma cultura positiva implica confirmação de se tratar de uma micobacteria. Tal pode ser efectuado macroscopicamente pelo aspecto morfológico das colónias, tipicamente rugosas e não pigmentadas no caso de MT, e microscopicamente por coloração de ZN, identificando BAAR agrupados em cordas.

Identificação das estirpes

Actualmente conhecem-se um grande número de espécies de micobactérias, mais de 100, algumas patogénicas (MT, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*), outras potencialmente patogénicas e outras saprófitas, cujo isolamento não tem implicações patológicas ou terapêuticas. Assim, o isolamento de um BAAR implica sempre a identificação da espécie micobacteriana.

O aspecto morfológico da colónia em meio de cultura sólido, rugoso e não pigmentado, e o aspecto microscópico em lâmina com BAAR agrupados em cordas são sugestivos de MT.

Contudo a identificação definitiva requer outros métodos. Os métodos fenotípicos ou bioquímicos baseiam-se em reacções bioquímicas, nomeadamente a actividade catalásica, presença de nitrato reductase e acumulação de niacina, que o tornam um processo lento, podendo demorar 1 a 4 semanas. Os métodos genotípicos ou moleculares baseiam-se na detecção do ácido ribonucleico do MT (*Accu-probe*[®]) ou na amplificação do ácido desoxirribonucleico (*Genotype*[®]), o que permite um resultado mais rápido, com sensibilidade e especificidade próximas dos 100%¹.

Testes de Diagnóstico Rápido: Testes de amplificação de ácidos nucleicos

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN), surgiram com o intuito de fornecer ao clínico um resultado mais rápido e preciso. Os TAAN, dos quais o mais vulgarmente usado é a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), são testes de detecção rápida, que permitem uma resposta em 24 a 48 horas e são específicos para o *MT-complex*. Há vários kits de TAAN comercializados, cada um deles utilizando um método diferente para amplificar regiões específicas dos ácidos nucleicos que permitirem encurtar o tempo necessário ao diagnóstico.

Os TAAN requerem um laboratório com técnicos experientes e equipamento específico, o que encarece o procedimento, sendo cerca de 14 vezes mais caro que um exame directo.

A sensibilidade e a especificidade dos TAAN têm sido extensivamente estudadas, tendo-se observado divergências de resultados¹⁵.

A grande maioria dos estudos aponta para uma especificidade muito alta no diagnóstico da TB pulmonar e extrapulmonar^{1,6,15,18-20}. Os TAAN podem dar resultados positivos em amostras com menos de 10 bacilos¹. Alguns estudos têm revelado elevadas sensibilidades e com valores sobreponíveis, independentemente da amostra colhida ser pulmonares ou extra-pulmonares¹⁵. Outros, porém, têm revelado resultados mais variáveis, em termos de sensibilidade, dependendo do tipo de amostra^{6,18-20}. Vários estudos têm demonstrado que a sensibilidade dos TAAN dependem no número de bacilos na amostra, sendo a sensibilidade maior em amostras com mais de 50 colónias / cultura. A sensibilidade tem sido mais baixa nas formas paucibacilares, TB pulmonares com exame directo negativo e TB extra-pulmonares¹⁸⁻²⁰. Em contrapartida, a sensibilidade tem sido maior nas amostras pulmonares onde o exame directo é positivo.

Comparativamente ao exame directo, o valor acrescentado dos TAAN baseia-se no seu maior valor preditivo

positivo (> 95%) nas amostras com exame directo positivo e capacidade de detectar mais precocemente o MT, em 50 a 80% das amostras com exame directo negativo e cultura positiva^{1,21}. Comparativamente ao exame cultural, a mais valia dos TAAN consiste na precocidade de diagnóstico, em 80 a 90% dos doentes com suspeita de TB, posteriormente confirmada em exame cultural^{1,21}. Nas amostras não respiratórias, a sensibilidade é mais baixa, entre 43 e 76%¹⁵. A especificidade da técnica é muito elevada para o MT-complex, cerca de 95% e independente da pesquisa ser efectuada em amostras respiratórias ou extra-respiratórias.¹⁵ As principais limitações dos TAAN, advêm dos resultados falsos positivos e falsos negativos associados a esta técnica. Os resultados falsos positivos devem-se, sobretudo, a problemas de contaminação da amostra. Por outro lado, o DNA do MT persiste na amostra, durante vários meses após o início ou mesmo fim do tratamento antibacilar, não sendo possível, por esta técnica, distinguir, bacilos vivos de bacilos mortos.

A presença de inibidores da amplificação enzimática na amostra, pode ser responsável pela obtenção de resultados falsos negativos nos TAAN¹⁵. A presença de inibidores é mais frequentemente em amostras extra-pulmonares, particularmente no líquido pleural, o que juntamente com o facto de serem produtos paucibacilares e com uma distribuição não uniforme dos bacilos, podem levar a resultados falsos negativos, limitando a sensibilidade dos TAAN nestes produtos. Têm também sido detectados em cerca de 3 a 7% das amostras de expectoração²¹. Assim, deverá ser sempre pesquisada a presença de inibidores em todas as amostras. Se não forem detectados inibidores e, face a um TAAN negativo, uma positividade em exame directo poderá corresponder a infecção por MNTB²¹.

De acordo com a literatura, os TAAN não podem substituir os exames micobacteriológicos directos ou culturais, devendo antes ser interpretados em conjunto com estes e com a clínica^{5,18,19,22}. Os *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* defendem a realização de TAAN em, pelo menos, uma amostra respiratória em doentes com suspeita de TB pulmonar²¹. Num doente com exame directo positivo, um TAAN positivo confirma o diagnóstico de TB^{3,21}. O CDC defende, porém, uma atitude mais cautelosa, referindo que os TAAN não são suficientemente sensíveis para excluir o diagnóstico de TB em doentes com exame directo negativo, uma vez que só detectam 50 a 80% dos casos, posteriormente confirmados por cultura²¹. Duas meta-análises reforçam a baixa sensibilidade dos TAAN nos doentes com exame directo negativo, opondo-se, por isso à sua utilização para excluir TB nestes doentes¹⁸. Quando os resultados obtidos por TAAN e

por exame directo são discordantes, a sensibilidade do TAAN continua a ser aceitável (82%), contudo a baixa especificidade (18%) traduz-se num valor preditivo quase nulo²². Num caso com exame directo negativo e TAAN positivo (caso provável), a integração clínica é fundamental no sentido de se iniciar ou não tratamento antes da obtenção do resultado da cultura.

Os TAAN não se encontram validados para monitorização da resposta à terapêutica, uma vez que se verifica persistência do DNA mesmo após a morte do bacilo e, por vezes por períodos superiores a 12 meses. No entanto, mais recentemente, alguns estudos têm sugerido que uma nova técnica, o PCR em tempo real, baseada na determinação seriada quantitativa do DNA do MT e na avaliação do seu perfil evolutivo, ao longo do tempo, poderá ser útil na monitorização da resposta ao tratamento e na avaliação do curso da TB^{17,23}. Por um lado, um valor inicial elevado do número de cópias de DNA do MT poderá ter valor preditivo de mau prognóstico¹⁷. Por outro lado, foi demonstrada uma diminuição estatisticamente significativa do número de cópias de DNA de MT no decurso do tratamento bem sucedido¹⁷. Assim, segundo estes autores, o PCR em tempo real, apesar de não avaliar directamente a viabilidade das bactérias, ao analisar o perfil evolutivo da quantidade de DNA do MT no decurso do tratamento antibacilar, possibilita inferir acerca de uma resposta favorável ou desfavorável à terapêutica^{17,23}.

Sensibilidade aos Antibacilares

Para além do isolamento da micobactéria e da sua identificação é igualmente papel do laboratório de micobacteriologia a determinação da sensibilidade aos fármacos antibacilares.

As estirpes de MT resistentes aos fármacos antibacilares constituem um fenómeno emergente em todo o mundo e que acarreta problemas em termos de tratamento e de medidas de saúde pública²⁴. Nesta perspectiva, após o isolamento do MT em exame cultural é fundamental a avaliação do seu perfil de sensibilidade à terapêutica. A Direcção Geral de Saúde (DGS) estabelece que devem ser realizados testes de sensibilidade aos antibacilares (TSA) de primeira linha em todos os casos de isolamento de MT complex, tanto nos novos casos como nos retratamentos²⁵. Por outro lado, os TSA devem igualmente ser repetidos se um doente mantiver culturas positivas, ao fim de três meses de tratamento, ou desenvolver culturas positivas após um período com culturas negativas¹. Mais uma vez, os meios líquidos, particularmente os novos sistemas (MGIT 960) permitem obter de uma forma mais rápida o perfil de sensibilidade do MT aos fármacos de primeira linha.

Actualmente existem ainda técnicas que permitem detectar, directamente em amostra com exame directo positivo, as mutações mais frequentes associadas a resistência à isoniazida e/ou rifampicina, através de amplificação e hibridização com sondas específicas. A DGS estabelece que devem ser realizados testes rápidos (molecular) de detecção de multirresistência sempre que se suspeite de TB multirresistente (TBMR)²⁶. São considerados casos suspeitos todas os indivíduos com tratamento antituberculoso anterior, os contactos de doentes com TBMR ou populações de risco acrescido de multirresistência (profissionais de saúde, infectados pelo VIH, toxicodependentes, reclusos, imigrantes e residentes em áreas de alta prevalência de TBMR)²⁶. Sempre que se verificar positividade no teste molecular de multirresistência, de acordo com a circular normativa da DGS, deve ser efectuado, em simultâneo, o teste de sensibilidade aos fármacos de 1ª e 2ª linha^{25,26}.

Estudo bioquímico das amostras

Numa meningite tuberculosa, alterações do perfil bioquímico do LCR, com elevação das proteínas (> 50% da concentração sérica), linfocitose e glicose baixa são frequentes, devendo mesmo, quando presentes, levantar a suspeita diagnóstica. Uma amostra de, pelo menos 5 ml, de LCR deve ser enviada para cultura de MT. O exame cultural pode dar resultados positivos, ao passo que o exame directo do LCR é habitualmente negativo.

Para além do líquido pleural, também o líquido peritoneal e pericárdico podem ser utilizados para diagnóstico de TB. Um valor elevado de proteínas (> 50% do valor sérico), a presença linfocitose e de níveis baixos de glicose são comuns nas inflamações tuberculosas, não permitindo, porém, fazer o diagnóstico. Vários estudos têm sustentado o papel do doseamento da adenosina desaminase (ADA) nestes líquidos para o diagnóstico de TB.

A ADA é um marcador inflamatório inespecífico libertado pelos linfócitos, macrófagos e neutrófilos, que pode ser pesquisada em vários líquidos biológicos, nomeadamente líquido pleural, pericárdico, peritoneal e LCR, produtos paucibacilares, onde o isolamento do MT pode ser difícil. Por outro lado, a realização de biópsia, que tem melhor acuidade diagnóstica, nem sempre é possível, particularmente a do pericárdio, peritoneal e do SNC. Vários estudos têm apoiado o papel do doseamento da ADA nestes líquidos biológicos no diagnóstico de TB, baseados na sua elevada acuidade diagnóstica^{6,15,27-31}. No estudo dos derrames pleurais, tem uma especificidade elevada, quando se trata de um exsudado com predomínio de linfócitos, particularmente se a relação linfócitos/neutrófilos

(L/N) for superior a 0,75^{6,30,31}. O doseamento da ADA é um procedimento simples e barato⁶. A sua determinação isolada tem elevada sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, respectivamente 91%, 81%, 84% e 89%.³¹ Tem sido sugerido que, em zonas de baixa prevalência de TB, o valor preditivo negativo da ADA seria suficiente para dispensar a realização de biópsia pleural, caso a determinação da ADA fosse negativa³¹. No oposto, em zonas de elevada prevalência de TB, a determinação positiva de ADA teria um valor preditivo positivo de TB de 99%³¹. De referir, contudo, que outras patologias, designadamente infecções bacterianas, empiemas, doenças do tecido conjuntivo (lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide) e neoplasias, particularmente do foro hematológico, podem causar elevação dos valores da ADA, o que pode limitar a seu papel no diagnóstico³¹. Esta limitação poderá ser colmatada pelo uso, em conjunto, no líquido suspeito do doseamento da ADA e da razão $L/N \geq 0,75$. Quando o valor elevado de ADA for considerado em conjunto com uma relação $L/N \geq 0,75$, no líquido pleural, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo são, respectivamente, 88%, 95%, 95% e 88%³¹.

Embora os valores possam diferir entre os vários laboratórios, os limites de referência mais habitualmente usados são de 40 U/L, nos líquidos pleural, pericárdico e peritoneal e de 10 U/L no LCR.

Vários estudos têm avaliado a acuidade da determinação de marcadores inflamatórios inespecíficos no diagnóstico de TB¹⁵. O interferão- γ (IFN- γ) tem sido a citocina mais estudada, havendo vários estudos que evidenciam o papel do seu doseamento no líquido pleural no diagnóstico de TB, tendo uma acuidade diagnóstica superior à da ADA¹⁵.

A acuidade diagnóstica do doseamento de outros marcadores inflamatórios (neopterina, leptina e lisozima) tem sido estudada, apresentando valor diagnóstico inferior ao da ADA e do IFN- γ ¹⁵.

Anatomia Patológica

As biópsias podem ter implicações diagnósticas, particularmente nas formas extra-pulmonares, dado que o valor diagnóstico de amostra histológica da serosa envolvida é superior ao estudo citológico do líquido associado¹. Particularmente, no que respeita à TB pleural, o envolvimento em toalha da serosa confere, mesmo à biópsia pleural fechada uma elevada rentabilidade diagnóstica³²⁻³⁴. Perante clínica e epidemiologia sugestivas, mesmo na ausência de isolamento microbiológico, num derrame com características de exsudado, com predomínio de linfócitos

e ADA elevada, a identificação anatomopatológica, na pleura, de granulomas epitelioides, rodeados de linfócitos, com necrose de caseificação central e a presença de células gigantes multinucleadas tipo Langerhans apoiam a suspeita de TB, apesar de não serem patognomónicas.

CONCLUSÃO

O diagnóstico rápido e preciso da TB e o início precoce do tratamento são factores de grande importância para reduzir a morbidade, mortalidade e minimizar o risco de contágio.

Os exames micobacteriológicos, apesar das suas limitações continuam a ser os exames de referência no diagnóstico de TB. A identificação de BAAR em exame directo, apesar das limitações de sensibilidade continua a ser fundamental no diagnóstico precoce. O exame cultural, apesar de demorado, continua a ser a técnica *gold-standard* no diagnóstico da TB.

Várias técnicas auxiliares de diagnóstico têm sido desenvolvidas no sentido de ultrapassar estas limitações.

Os TAAN são testes rápidos de identificação do MT. No entanto, apresentam sensibilidade muito variável, em função do tipo de amostra e da carga bacilar da mesma. A sua correcta interpretação requer integração com dados clínicos e micobacteriológicos.

A ADA e o IFN- γ são os biomarcadores inflamatórios, cujo doseamento em líquidos biológicos potencialmente infectados apresenta maior acuidade no diagnóstico da TB.

Uma vez que nem sempre é possível isolar o MT, o diagnóstico e a decisão de iniciar tratamento dependem da integração de dados epidemiológicos, clínicos, imagiológicos e laboratoriais.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

BIBLIOGRAFIA

1. American Thoracic Society: CDC; Council of the Infectious Disease Society of America. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95
2. CHANG KC, LEUNG CC, YEW WW, TAM CM: Supervised and induced sputum among patients with smear-negative pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 2008;31:1085-90
3. J Oficial da União Europeia L159 de 18/6/2008, pg 85

4. SCHOCH OD, RIEDER P, TUELLER C et al: Diagnostic Yield of sputum, induced sputum and bronchoscopy after radiologic tuberculosis screening. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:80-86
5. BONNET M, RAMSAY A, GAGNIDZE L, GITHUL W, GUERIN PJ, VARAINE F: Reducing the number of sputum samples examined and thresholds for positivity: an opportunity to optimise smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:953-8
6. PAI M, RAMSAY A, O'BRIEN R: Evidence-based tuberculosis diagnosis. *PLoS Medicine* 2008;5:1043-9
7. MASE SR, RAMSAY A, NG V et al: Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:485-495
8. WANCHU A, DONG Y, SETHI S et al: Biomarkers for clinical and incipient tuberculosis: Performance in a TB-endemic country. *PLoS ONE* 2008;3:e2071
9. World Health Organization: Reduction of number of smears for diagnosis of pulmonary TB. 2007 (<http://www.who.int/tb/dots/laboratory/policy/en/print.html>)
10. VINH DC, MENZIES D: Sputum induction for diagnosis of pulmonary tuberculosis: ready for prime time? *Chest* 2006; 130:1626
11. LARSON JL, RIDZON R, HANNAN MM: Sputum induction versus fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1279-80
12. LONG R, ELLIS E: Canadian Tuberculosis Standards. 6th Edition 2007
13. CONDE MB, SOARES SLM, MELLO FCQ et al: Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2238-40
14. Light RW: Useful tests on the pleural fluid in the management of patients with pleural effusions. *Curr Opin Pulm Med* 1999;5:245-9
15. TRAJMAN A, PAI M, DHEDA K et al: Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *Eur Respir J* 2008;31:1098-1106
16. World Health Organization: Definition of a new sputum smear-positive TB case. 2007 (<http://www.who.int/tb/dots/laboratory/policy/en/print.html>)
17. TAKAHASHI T, TAMURA M, ASAMI Y et al: Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for mycobacterium tuberculosis DNA: clinical application for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2008;46:1698-1707
18. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006;61:783-790
19. LING DI, FLORES LL, RILEY LW, PAI M: Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS ONE* 2008;3(2):e1536
20. PAI M, FLORES LL, HUBARD A, RILEY LW, COLFORD JM Jr: Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2004;4:6-19
21. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis: CDC Morbidity and Mortality Weekly Report 2009;58:7-10
22. LIM TK, ZHU D, GOUGH A, LEE KH, KUMARASINGHE G: What is the optimal approach for using a direct amplification test in the routine diagnosis of pulmonary tuberculosis? A preliminary

assessment. *Respirology* 2002;7:351-7

23. TAKAHASHI T, NAKAYAMA T: Novel technique of quantitative bested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *J Clin Microbiol* 2006;44:1029-39

24. World Health Organization Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis 2006 (http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546956_eng.pdf)

25. Direcção-Geral de Saúde: Circular Normativa n.º 9/DT, de 29/5/2000: Resistência aos antibióticos em tuberculose (<http://www.dgs.pt>)

26. Direcção-Geral de Saúde: Circular Normativa n.º 12/DSCS/PNT, de 17/7/2008: Detecção rápida de Tuberculose Multirresistente (<http://www.dgs.pt>)

27. PEREZ-RODIGUEZ E, CASTRO DJ: The use of adenosine deaminase and adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr Opin Pulm Med* 2000;6:259-266

28. TUON FF, LITVOC MN, LOPES MIBF: Adenosine deaminase and tuberculous pericarditis – A systematic review with meta-analysis. *Acta Trop* 2006;99:67-74

29. KASHYAP RS, KAINTHLA RP, MUDALIAR AV, PUROHIT HJ, TAORI GM, DAGINAWALA HF: Cerebrospinal fluid adeno-

sine deaminase activity: A complementary tool in the early diagnosis of tuberculous meningitis. *Cerebrospinal Fluid Research* 2006;3:5-10

30. DIACON AH, VAN DE WAL BW, WYSER C et al: Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *Eur Respir J* 2003;22:589-591

31. BURGESS LJ, MARITZ FJ, LE ROUX I, TALJAARD JJF: Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/neutrophil ratio: increased specificity for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest* 1996;109:414-9

32. BAUMANN MH: Closed pleural biopsy: not dead yet! *Chest* 2006;129:398-1400

33. BAUMANN MH: Closed needle biopsy of the pleura is a valuable diagnostic procedure. Pro closed needle biopsy. *J Bronchol* 1998;5:327-331

34. KOEGELENBERG CFN, DIACON AH: Diagnosis of TB Pleural effusions. *Intl Pleural newsletter* 2007;5:6-7

35. National Collaborating Centre for Chronic Conditions. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: Royal College of Physicians 2006