

Principais acrónimos utilizados

ADA – Adenosina Deaminase

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

LCR – Líquido cefalo-raquidiano

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

NPCR – “*Nested*” *Polymerase Chain Reaction*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

QNRT – *Quantitative “Nested” Real-Time Polymerase Chain Reaction*

RMN – Ressonância Magnética

RT-PCR – *Real Time Polymerase Chain Reaction*

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema Nervoso Central

TB – Tuberculose

TC – Tomografia computadorizada

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

WR-QNRT – *Wide Range Quantitative “Nested” Polymerase Chain Reaction*

Índice

| | |
|--|----|
| 1) Introdução | 1 |
| 2) Epidemiologia..... | 2 |
| 2a) Uma visão global | 2 |
| 2b) Portugal..... | 3 |
| 2c) Co-Infecção VIH/TB..... | 4 |
| 3) Fisiopatologia | 5 |
| 4) Diagnóstico de Meningite Tuberculosa..... | 7 |
| 4a) Clínica | 7 |
| 4b) Análise do LCR..... | 9 |
| 4c) Exames imagiológicos..... | 17 |
| 5) Influência da infecção por VIH | 18 |
| 5a) Clínica | 19 |
| 5b) Análise do LCR..... | 21 |
| 5c) Exames de imagem..... | 22 |
| 5d) Anatomopatologia | 23 |
| 5e) Prognóstico | 23 |
| 6) A PCR na Meningite Tuberculose | 24 |
| 6a) Validação da técnica..... | 28 |
| 6b) Sequências alvo do genoma..... | 29 |
| 6c) As diferentes técnicas de PCR | 30 |
| 6d) PCR na avaliação do prognóstico | 43 |
| 6e) A baixa sensibilidade da PCR..... | 43 |
| 7) Conclusão/Discussão..... | 47 |
| 8) Referências bibliográficas | 54 |

1) Introdução

A meningite é a forma mais comum de infecção do Sistema Nervoso Central (SNC), apresentando-se como uma tríade clássica de cefaleias, febre e meningismo. A análise do líquido cefalo-raquidiano (LCR) revela pleocitose linfocítica moderada. Clinicamente, pode ser distinguida em doença aguda e crónica. A meningite aguda desenvolve-se ao longo de horas ou dias, ao passo que a crónica ocorre ao longo de semanas ou meses.¹ É nestas últimas que se enquadra a meningite tuberculosa, ou seja, infecção das meninges por *Mycobacterium tuberculosis*.

Se o diagnóstico não for feito em tempo útil, é uma doença fatal. Apesar de responder à terapêutica específica, as sequelas neurológicas são documentadas em 25% dos casos tratados, correspondendo estes, na sua maioria, a diagnósticos tardios.²

Numa situação em que o tempo disponível para iniciar a terapêutica é escasso, são necessárias técnicas com elevada sensibilidade e rapidez de execução, de forma a evitar sequelas ou até mesmo a morte. Os métodos convencionais são considerados insuficientes, em virtude da sua alta taxa de falsos negativos e da sua morosidade. É neste sentido que têm sido desenvolvidas diversas técnicas, entre as quais as de amplificação molecular, como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), a qual se espera venha a constituir uma mais-valia em termos de diagnóstico precoce.

Tendo em conta que esta doença apresenta uma incidência mais elevada em indivíduos infectados por VIH, é pertinente particularizar a investigação neste grupo de doentes. Este trabalho inclui também uma reflexão sobre a influência desta infecção na apresentação clínica e alteração dos resultados laboratoriais das técnicas convencionais e, especialmente, da PCR.

2) Epidemiologia

2a) Uma visão global

A Tuberculose (TB) mantém-se como um problema global de saúde a nível mundial.³

Ainda que estudos epidemiológicos sugiram que o número de casos de TB e a mortalidade por esta patologia, em indivíduos infectados por VIH, tenha atingido a sua expressão máxima em 2005, com 1,39 milhões e 0,48 milhões respectivamente, as últimas estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam 9,27 milhões de novos casos de tuberculose em 2007, incluindo 1,37 milhões de casos em doentes infectados por VIH.³

A mortalidade por TB situa-se em 1,32 milhões de mortes em doentes não infectados por VIH e 0,46 milhões nos infectados. A prevalência situa-se nos 13,7 milhões de casos, estando 687 000 infectados por VIH.³

Tem ocorrido um incremento da infecção em termos absolutos, como resultado do aumento populacional. Contudo, a incidência de casos por cada 100 000 habitantes tem vindo a declinar a nível global, com excepção da Europa (mais particularmente da Europa do Leste), onde a taxa permanece estável.³

O incremento de casos de TB em indivíduos infectados por VIH tem também aumentado a transmissão de *Mycobacterium tuberculosis* a nível da comunidade, tornando-se uma ameaça até para os indivíduos não infectados por VIH.⁴

Na Região Africana da OMS (maioritariamente África Subsariana), o impacto do VIH é tal que as taxas de incidência de TB estão fortemente associadas à prevalência da infecção por VIH nos adultos. Estima-se que cerca de 31% dos casos de TB em adultos sejam atribuídos à infecção por VIH. Nesta mesma região, calcula-se que os indivíduos infectados por VIH sejam responsáveis por cerca de 7% de toda a transmissão de tuberculose.⁴

Inevitavelmente, o alastrar da infecção por VIH está a contribuir para o aumento da incidência da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.⁴

2b) Portugal

Portugal apresenta uma tendência decrescente da incidência de tuberculose, se bem que a uma velocidade menor que os seus congéneres europeus. Em 2008, foram notificados 2 916 novos casos, menos 6% que no ano anterior.⁵

Desde 1980 que a taxa de incidência notificada em Portugal tem vindo a decrescer de uma forma lenta, mas consistente, passando de um valor de cerca de 60/100 000 habitantes para 25,3/100 000 habitantes em 2007.⁶ Da mesma forma que os restantes países com alto índice de desenvolvimento humano, a maior incidência concentra-se preferencialmente em grandes centros urbanos, sendo causada principalmente por focos migratórios provenientes de países onde a incidência é elevada (ex. países da Europa do Leste) e onde prevalece uma situação socioeconómica mais débil.⁷

A região Norte de Portugal apresenta a situação mais crítica, pois o ritmo de decréscimo da infecção é o mais lento, tendo sido considerado, em 2005, um problema de saúde de intervenção prioritária nesta região.⁸ Em 2006, a taxa de incidência na região Norte foi de 37,3/100.000 habitantes, 24% superior à observada no resto do país. Nesta região, o distrito do Porto apresenta a maior incidência da infecção, com 45,4/100.000 habitantes.⁹

2c) Co-Infecção VIH/TB

A contribuição da TB para as mortes por SIDA é substancial: 11% das mortes por SIDA são mortes primariamente por TB.

A infecção por VIH aumenta não só o risco de reactivação de uma infecção por *Mycobacterium tuberculosis*,¹⁰ mas também a possibilidade de uma progressão rápida após infecção ou reinfeção por *M. tuberculosis*.^{11,12} O risco anual de desenvolver doença activa em pessoas co-infectadas por *M. tuberculosis* e VIH pode exceder os 10%.^{10,13,14}

O risco de mortalidade por TB em doentes co-infectados encontra-se estimado entre 30-40% nos países africanos, locais onde o VIH tem um impacto elevado.⁴

Mesmo em regiões com baixa incidência de tuberculose, a infecção por VIH desempenha um papel importante.⁴

Nos Estados Unidos da América, 26% dos casos de TB foram atribuídos à infecção por VIH, valor superior a outros países onde as prevalências da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e da por VIH é maior. Este facto está relacionado com a tendência de ambas infecções se concentrarem em determinados grupos (toxicodependentes ou certas etnias).⁴

Nos países desenvolvidos, uma proporção alta de doentes sem infecção por VIH mas com infecção por *M. tuberculosis* encontra-se em estratos etários mais elevados, uma vez que adquiriram a primo-infecção no passado, quando as taxas de transmissão de TB eram maiores, tratando-se de reactivação. Tal causa um aumento na diferença das taxas de não infectados por VIH comparativamente com os infectados.⁴

A meningite tuberculosa é responsável por cerca de 5% de todas as formas de tuberculose extrapulmonar, sendo a que apresenta uma maior morbidade e mortalidade¹⁵. O papel da infecção por VIH adquire relevância particular nesta infecção pois um indivíduo co-infectado

por VIH e por *Mycobacterium tuberculosis* apresenta uma probabilidade cinco vezes superior à de um indivíduo não infectado por VIH de desenvolver meningite tuberculose.¹⁶

3) Fisiopatologia

A meningite tuberculosa, provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é a causa mais importante de meningite crónica, podendo ocorrer quer por uma infecção primária, quer por um processo de reinfecção.¹

Subsistem ainda dúvidas relativamente ao mecanismo fisiopatológico da meningite tuberculosa. Em 1933, Rich e McCordock sugeriram que a patologia seria provocada pela libertação de bacilos a partir de lesões focais prévias em comunicação com as meninges, propondo assim um modelo estático para a fisiopatologia. As lesões referidas são actualmente conhecidas por *focos de Rich*, frequentemente subpiais ou subependimais, no sulco lateral.¹⁷

Actualmente, acredita-se que a origem desta invasão bacilar possa ocorrer quer por disseminação hematogénea a partir de uma infecção pulmonar primária ou pós-primária, ou por ruptura de um tubérculo subependimal para o espaço subaracnóideu, estabelecendo-se, portanto, um modelo dinâmico.²

A capacidade do *Mycobacterium tuberculosis* em disseminar por via hematogénica aparenta ser um componente chave da patogénese da meningite tuberculose. No entanto, a forma como abandona os pulmões e entra na corrente sanguínea é uma incógnita. A bactéria provavelmente penetra o epitélio alveolar, havendo já dados que apoiam a hipótese de o microorganismo invadir e sobreviver no interior de células epiteliais alveolares do tipo II.¹⁸

Foi, inclusive, sugerido que a micobactéria pode aceder aos tecidos mais profundos por translocação através de células epiteliais e deslocar-se dentro de monócitos, sendo este o

mecanismo mais plausível de transporte de *Mycobacterium tuberculosis* do lúmen alveolar para o sangue.¹⁹

Um estudo realizado por Davis JM e Ramakrishnan L sugerem que as estirpes virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* iniciam a formação rápida de granulomas através da atracção e agregação de macrófagos não infectados aos já invadidos pelas micobactérias. Uma vez infectados, os macrófagos são capazes de abandonar os granulomas e migrar pelo sangue e tecido para formar um foco secundário distante de infecção.²⁰

Por outro lado, a libertação de *Mycobacterium tuberculosis* no espaço subaracnóideu resulta numa resposta local dependente de linfócitos T, caracterizada macroscopicamente como uma inflamação granulomatosa caseosa.²¹

O número e tipo de leucócitos no LCR ajuda a diferenciar a meningite tuberculosa dos outros tipos de meningite, mas sabe-se pouco acerca do papel destes na patogenia. Tipicamente, o LCR apresenta altas contagens de leucócitos (até 1000-1500/mm³). No entanto, os neutrófilos podem ser predominantes, especialmente na fase inicial da doença, e altas proporções destes têm sido associadas a uma maior probabilidade de diagnóstico bacteriológico e maior sobrevivência. Assim, os neutrófilos podem desempenhar um papel importante na patogenia.¹⁷

Três processos são responsáveis pela maioria dos deficits neurológicos mais comuns na meningite tuberculosa: 1) o exsudato adesivo pode obstruir o fluxo de LCR, provocando hidrocefalo e compromisso dos nervos cranianos eferentes; 2) os granulomas podem coalescer para formar tuberculomas (ou um abscesso em doentes com doença incharacterística) os quais podem ocasionar consequências distintas, dependendo da sua localização; 3) vasculite obliterativa pode resultar em isquémia e consequente enfarte tecidual ou provocar sintomatologia de doença vasoclusiva. A gravidade destas complicações encontra-se

dependente da resposta inflamatória intracerebral, sendo esta altamente preditiva do prognóstico.²²

4) Diagnóstico de Meningite Tuberculosa

4a) Clínica

As manifestações clínicas instalam-se ao longo de 1 a 3 semanas.^{2, 23} As suas características são semelhantes às de muitas meningoencefalites, acabando por causar dificuldades no diagnóstico.²⁴ Por outro lado, a sintomatologia pode ser mais ténue, com ausência de cefaleias, febre ou qualquer outro sintoma ou sinal constitucional no período prodrómico, dificultando o diagnóstico.^{1, 24}

Apresenta-se frequentemente de forma subtil com cefaleias e alterações ligeiras do estado mental após um pródromo de várias semanas de febres baixas, mal-estar, anorexia e irritabilidade.^{2, 24}

As queixas mais frequentes ao longo do período de instalação da doença são os sinais de irritação meníngea (rigidez cervical, sinal de Kernig, sinal de Brudzinski) associadas aos sintomas prodrómicos referidos,^{2, 23, 24} podendo surgir todos durante a primeira semana²³. Numa fase mais tardia, os doentes podem também apresentar cefaleia intensa, letargia e alteração sensorial.²

Após este período inicial, podem surgir sinais de aumento da pressão intracraniana com hidrocefalia, seguidos de paralisia dos nervos cranianos (III, VI e VII) e convulsões²³, com o envolvimento das artérias cerebrais a provocar lesões isquémicas focais.² A doença pode evoluir até ao estado comatoso, associado a febre altas e morte ao fim de um período de 5 a 8 semanas após o início da sintomatologia.^{2, 24}

Em mais de metade dos doentes, são encontradas evidências de lesões pulmonares antigas, ou um padrão miliar na telerradiografia do tórax.²

Quando presente, a hidrocefalia caracteriza-se por cefaleia e, por vezes, vómitos, podendo evoluir rapidamente para coma, com postura em extensão dos membros, sinais de Babinski bilaterais, pupilas mióticas não reactivas e défice dos movimentos óculo-cefálicos na direcção vertical.²

Com o intuito de desenvolver um algoritmo de diagnóstico clínico, Thwaites et al, identificaram 5 variáveis preditivas de meningite tuberculosa, estabelecendo um esquema de pontuação no qual um *score* inferior ou igual a 4 corresponderia a meningite tuberculosa. Este sistema de pontuação atingiu uma sensibilidade de 86% e uma especificidade de 79% quando testado em 75 doentes.²⁴ (Figura 1)

| | Diagnostic index |
|--|-------------------------|
| Age (years) | |
| ≥36 | 2 |
| <36 | 0 |
| Blood WCC (10³/mL) | |
| ≥15 000 | 4 |
| <15 000 | 0 |
| History of illness (days) | |
| ≥6 | -5 |
| <6 | 0 |
| CSF total WCC (10³/mL) | |
| ≥900 | 3 |
| <900 | 0 |
| CSF % neutrophils | |
| ≥75 | 4 |
| <75 | 0 |

WCC=white-cell count; CSF=cerebrospinal fluid.

Figura 1 – Sistema de pontuação para meningite tuberculosa proposto por Thwaites et al ²⁴.

4b) Análise do LCR

Na meningite tuberculosa, a punção lombar constitui, actualmente, a base do diagnóstico.²

Esta deve ser realizada em doentes com suspeita de meningite, mas somente após a exclusão de uma lesão expansiva, pela clínica e/ou por realização de um exame imagiológico apropriado, como uma tomografia computadorizada crânio-encefálica, uma vez que a existência de tal lesão se pode complicar com herniação cerebral.¹

A clínica sugestiva de uma lesão expansiva consiste em sinais neurológicos focais (tremores focais, defeitos sensoriais, motores e visuais) e/ou sinais ou sintomas que evidenciem aumento da pressão intracraniana (cefaleias, vômitos, alterações no estado mental, edema da papila). Após a colheita do líquido, deve-se sempre proceder à realização de culturas para detecção de fungos e bactérias.¹

- Bioquímica

As concentrações de proteínas, glucose, lactato e a contagem e características dos leucócitos no LCR podem dar indícios relativamente ao diagnóstico diferencial dos diferentes tipos de meningite. (Tabela 1)

| Diagnóstico | Pressão (cmH ₂ O) | Contagem de leucócitos (x10 ⁶ /L) | Células polimorfonucleares (%) | Glucose (taxa LCR/sangue) | Proteínas (g/L) | Lactato (mmol/L) |
|-------------------------------|------------------------------|--|--|---------------------------|-----------------|------------------|
| Normal | <20 | 1 a 2 | <1 | >0,5 | <0.45 | <2 |
| Meningite bacteriana aguda | >20 | >1000 | >50 | <0.4 | >1 | >4 |
| Meningite linfocítica benigna | <20 | <1000 | <50 | >0.4 | Variável | <2 |
| Meningite tuberculosa | >20 | <1000 | Variável (aumento nas fases iniciais e agudas) | <0,4 | >1 | >2 |

Tabela 1 – Diagnóstico diferencial a partir da análise do LCR. Adaptado de Leib SL, Martin GT¹

Apesar de se estabelecer que a meningite tuberculosa é, com base no decurso evolutivo da clínica, uma patologia crónica, as características do LCR são diferentes das da meningite crónica. O exame do LCR releva alta contagem de leucócitos (até 1000/ uL) com predomínio de linfócitos, ainda que, por vezes, possa haver o predomínio de neutrófilos nos estágios iniciais e nas fases agudas da doença; concentração proteica de 1 a 8 g/L (100 a 800 mg/dL), ou mesmo superior, no caso de obstrução do fluxo do LCR; baixa concentração de glicose

(níveis abaixo dos 40 mg/dL); aumento da concentração de lactato (>19 mg/dL). No entanto, qualquer um destes parâmetros pode estar dentro da faixa normal, dificultando o diagnóstico.^{2, 23} É comum o aumento de pressão do LCR, apresentando este um aspecto límpido e incolor – “água de rocha”.²³ A composição do LCR pode ser acelular em 3-6% dos doentes não infectados por VIH, podendo chegar aos 16% na presença deste.²⁵

O lactato não é específico para a meningite tuberculosa mas é um bom marcador do metabolismo cerebral na meningite fúngica e bacteriana. Não tem qualquer influência da concentração sanguínea, contrariamente à glucose, e é produto do metabolismo da glucose no LCR.²⁶

- Microscopia directa

Um método rápido para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* numa amostra de LCR consiste na sua coloração e posterior observação por microscopia. Uma característica típica destas bactérias é o facto de serem ácido-álcool resistentes, ou seja, a célula corada torna-se resistente à descoloração por ácido-álcool, pelo que existem métodos reservados para esse efeito. O mais conhecido e utilizado é a coloração de Ziehl-Neelsen, que requer aplicação de calor, ao passo que uma modificação deste método, o método Kinyoun, não.¹

Apesar de ser uma técnica rápida e económica, apresenta baixa sensibilidade (10-22%)^{24,27,28}, com um estudo a apresentar valores ainda inferiores, por volta dos 3%.²⁹ O principal motivo para a baixa sensibilidade deste teste é atribuído à natureza paucibacilar da amostra colhida^{30, 31}, isto porque a identificação microscópica de bacilos por técnicas como Ziehl-Neelsen ou auramina necessitam de 10⁴ organismos/mL para a obtenção de um resultado fiável.²⁵ No entanto, o LCR da maioria dos doentes apenas apresenta 10 a 100.³²

A sensibilidade acaba por ser ainda menor, por diminuição da quantidade de bactérias presentes na amostra, aquando da terapêutica para a tuberculose, sendo reduzida a escassos 2%, cinco a quinze dias após o início desta.^{17, 33}

Há indícios de que a taxa de detecção nos esfregaços pode ser aumentada através da colheita de grandes volumes de LCR (>5 mL)^{34, 35} e através da sua centrifugação a altas velocidades por um período prolongado, uma vez que o alto conteúdo lipídico da parede da célula da *M. tuberculosis* a torna mais flutuante que as outras bactérias.³¹ Para além disso, a duração prolongada e diligente da microscopia aumenta a positividade.³¹ Já Kennedy e Fallon demonstraram que a repetição da punção lombar para extracção de amostras de LCR aumentava a sensibilidade em cerca de 80%.³⁶

- **Cultura de *Mycobacterium tuberculosis***

Ao contrário do que acontece na doença pulmonar, principalmente nos doentes com a presença de cavitação, as quantidades de bacilos obtidos na colheita do produto biológico – LCR- são muito reduzidas.³⁷

Quando os espécimes são inoculados em meios convencionais, como o de Lowestein-Jensen ou o de Midlebrook, o tempo necessário à obtenção de resultados relevantes é de 3 a 4 semanas em média³⁷, podendo estender-se às 6 semanas.³⁸

Estão actualmente disponíveis meios comerciais de crescimento que facilitam a cultura de *M. tuberculosis*. Estes monitorizam o crescimento micobacteriano pela detecção da produção de CO₂ ou do consumo de O₂, através de indicadores radiométricos, fluorométricos e colorimétricos. Dentro destes meios, destaca-se o BACTEC, que permite a detecção do crescimento de culturas de *Mycobacterium tuberculosis* no espaço de 1 a 3 semanas, recorrendo a métodos fluorométricos.²⁸

Novos meios de cultura estão actualmente a ser desenvolvidos, dos quais se espera a possibilidade de obter resultados em 7-10 dias, com sensibilidade e especificidade semelhantes aos actuais testes comerciais.²⁸

Independentemente do meio, a cultura de *Mycobacterium tuberculosis* apresenta, actualmente, uma sensibilidade com valores que variam entre os 38-88% e com uma morosidade na obtenção de resultados incompatível com a prática clínica.^{24, 27, 28}

- ADA

A determinação da actividade da adenosina desaminase (ADA) em amostras do LCR é um exame rápido e económico, que tem sido considerado altamente específico para o diagnóstico diferencial entre meningite tuberculosa e outras causas de meningite asséptica, com uma sensibilidade de 50%.⁴⁰

Este doseamento pode ser utilizado enquanto teste de rastreio, pois os seus valores encontram-se aumentados na meningite tuberculosa.²³ Contudo, não é específica, pois pode ser encontrada em níveis elevados noutras patologias, como meningites bacterianas, linfomas, na neurobrucelose e na meningite criptocócica.⁴¹

As dificuldades desta especificidade aumentam quando se tenta avaliar a correlação entre os valores e patologia de base, pois enquanto Corral et al concluiu que os níveis de ADA na meningite tuberculosa são superiores ao dos doentes com meningite criptocócica e que a infecção por VIH não tem influência nos níveis da enzima,⁴² outros autores defendem o oposto, apresentando resultados onde os níveis de ADA são mais elevados nos doentes infectados por VIH e com meningite criptocócica, não havendo qualquer diferença entre os valores médios na meningite tuberculosa e na meningite criptocócica^{43, 44}. Corral et al atribui os altos níveis de ADA no LCR de doentes com infecção por VIH à presença de uma resposta

inflamatória não específica causada por infecções oportunistas ou linfoma, e não à acção directa do VIH.⁴²

Há resultados bastante animadores relativamente a este teste simples, com Piras et al a relatarem uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 99%⁴⁵, e López-Cortés et al a referiram uma especificidade de 100% e um valor preditivo positivo de 1 no diagnóstico de meningite tuberculosa e neurobrucelose em casos de meningite asséptica.⁴⁰

No entanto, também para este teste, os resultados não são uniformes. Uma questão constantemente presente nestes estudos é a determinação de um valor limiar acima do qual tenha significado diagnóstico, o qual tem apresentado grandes variações de acordo com o ensaio clínico realizado. Com um valor limiar estabelecido em 8,5 IU/L, Corral et al apresentam resultados com uma sensibilidade de apenas 57% e uma especificidade de 87%.⁴² Já com um valor mais elevado, como 10 IU/L, a sensibilidade aumenta, atingido 90%, mas à custa da especificidade (50%).⁴⁰

Também Cunha obteve resultados bastante positivos na utilização do doseamento da ADA, com um limiar de 6,0 IU/L, tendo atingido uma sensibilidade de 70% e uma especificidade de 90%.⁴⁶

No que respeita à relação da ADA com outros elementos bioquímicos presentes no LCR, Corral et al⁴² concluíram que o primeiro se correlaciona directamente com a contagem celular e com a concentração proteica e inversamente com a concentração de glicose, discordando de outros autores, como López-Cortés.⁴¹ Uma correlação entre elementos celulares foi também estabelecida por outros autores,⁴⁴ assim como com a concentração proteica.⁴⁷

Segundo Corral et al, o simples doseamento da glicose pode ter uma acuidade diagnóstica semelhante ao doseamento da ADA, tornando-o um método altamente inespecífico.⁴²

Contudo, e como já explicitado anteriormente, a maioria dos autores não estão de acordo com esta afirmação.^{40, 42, 45}

- Métodos imunológicos

Um dos métodos usualmente relatado, na literatura mais recente, é o “Dot-Immunobinding assay” (Dot-Iba), considerado simples e altamente reprodutível.^{48, 49}

A acção do Dot-Iba passa pela ligação directa de antígenos ou anticorpos a discos numa membrana de nitrocelulose. O material de diagnóstico das amostras biológicas colhidas (ex. LCR) é incubado neste disco, sendo a presença do complexo antígeno-anticorpo demonstrada directamente por antiglobulinas e substratos conjugados com enzima.⁴⁸

O procedimento é simples, não exigindo instrumentos sofisticados ou espaço laboratorial próprio e, para além disso, os reagentes utilizados têm uma semi-vida de mais de 6 meses, colocando-se a hipótese de ser utilizado como técnica de rotina em países em desenvolvimento.⁴⁸

Sumi et al, recorrendo a esta técnica para a detecção do antígeno micobacteriano 14 kDa, atingiram uma sensibilidade de 75,67% e uma especificidade de 100%, num estudo com apenas 45 doentes.⁴⁹

Mathai et al utilizaram a mesma técnica standardizada para o antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado pelo calor (PPD), obtendo uma sensibilidade e especificidade global de 83,3% e 95%, respectivamente.⁵⁰

A confirmar a alta especificidade desta técnica para infecções paucibacilares surge outro estudo realizado por Sumi et al, onde não encontraram quaisquer falsos negativos no ensaio realizado, apesar da baixa sensibilidade (60%).⁴⁸

Já Thomas et al direccionaram o seu estudo à detecção de células T secretoras de interferão-gama específicas para *Mycobacterium tuberculosis*, presentes no LCR de doentes com meningite tuberculosa, obtendo uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 100% no diagnóstico de meningite tuberculosa.⁵¹

À semelhança do que se passa com outras técnicas, a não uniformização das mesmas impede a avaliação de qual o melhor alvo antigénico a ser detectado. Foi concluído por Annamma et al que a determinação de um antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* poderá ser mais sensível em termos de diagnóstico do que a pesquisa direccionada de um anticorpo micobacteriano através de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).⁵²

Portanto, a alta especificidade deste tipo de ensaios não se faz acompanhar pela sensibilidade, tornando incerta a sua utilização na prática clínica.

- Métodos moleculares

Apesar da análise bioquímica necessitar da quebra da anatomia da célula, foram desenvolvidas técnicas de separação mais moderadas, com a preservação da função dos vários componentes celulares.

Os métodos de diagnóstico molecular têm como objectivo a detecção de componentes moleculares do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

O método mais importante desta secção é a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que será tratada num capítulo próprio para o efeito, tendo em conta o objectivo do presente trabalho.

4c) Exames imagiológicos

As principais características imagiológicas no contexto da meningite tuberculosa são alterações provocadas por uma infecção prévia ou actual em localizações anatómicas mais típicas, como cavitação pulmonar na telerradiografia torácica ou indícios de tuberculose miliar na Tomografia Computorizada (TC) ou na Ressonância Magnética (RMN) abdomino-pélvica.^{53, 54}

A infecção presente nas meninges traduz-se, sobretudo, num espessamento anormal destas, especialmente nas regiões mais basais,^{53, 54} sendo detectáveis tanto por RMN como por TC. Verifica-se a presença de espessamento das cisternas basais, que corresponde ao exsudato de consistência gelatinosa formado⁵³, encontrando-se ainda alargamento ventricular na maioria dos pacientes.⁵⁴ Os exsudatos basilares espessos surgem como áreas de alto contraste nas cisternas basais (aspecto de “pernas de aranha”) e nos sulcos laterais.⁵⁴

A hidrocefalia comunicante é a complicação mais comum da meningite tuberculosa. No entanto, também pode ocorrer hidrocefalia obstrutiva por obstrução do fluxo do LCR devido a doença parenquimatosa focal, estando os graus destas complicações correlacionadas com a duração da doença.^{53, 54}

Para além destes, também os enfartes isquémicos são uma complicação potencial da meningite tuberculosa. Os enfartes estão geralmente localizados nas regiões do tálamo, dos gânglios da base e da cápsula interna, resultado de uma compressão vascular e da oclusão de pequenos vasos perfurantes.^{53, 54}

Aparentemente, a TC apresenta especificidade limitada comparativamente com a RMN.⁵⁵ A frequência dos enfartes encontrados na TC varia entre os 20,5 e os 38%. A taxa de detecção destes é maior aquando da utilização da RMN. Para além disso, um grande número de

enfartes são de natureza hemorrágica na RMN, um achado não tão bem documentado na TC.⁵⁴

Os tuberculomas raramente são documentados na TC ou na RMN de pacientes com meningite tuberculosa. Davis et al encontraram tuberculomas em 16% dos doentes com cultura positiva ou meningite tuberculosa presuntiva.³² Múltiplos tuberculomas intracranianos de pequenas dimensões são mais frequentes na TB miliar.^{56,57}

Exames não direccionados à observação directa do SNC podem revelar resultados sugestivos da patologia, como a presença de alterações nos vasos do polígono de Willis, no angiograma ou na RMN da artéria carótida, onde é possível identificar um colapso uniforme de largos segmentos, um colapso de um pequeno segmento, um aspecto irregular ou ainda, oclusão completa.⁵⁸ Estes achados podem surgir por vasculite ou por compressão mecânica pelo exsudato basilar.⁵⁴

5) Influência da infecção por VIH

Uma nova infecção por *Mycobacterium tuberculosis* adquirida por um indivíduo infectado por VIH pode evoluir para a doença activa em semanas, em vez de o fazer no decorrer de meses ou anos.²

A tuberculose extrapulmonar é comum entre doentes infectados por VIH. Em alguns estudos, foi registado a ocorrência de tuberculose extrapulmonar – isoladamente ou em associação com doença pulmonar – em 40 a 60% dos casos em indivíduos co-infectados. As formas mais comuns são a linfática, a disseminada, a pleural e a pericárdica.²

O diagnóstico em doentes infectados por VIH pode ser complicado pela presença de um maior número de resultados negativos nos esfregaços, ou por resultados radiológicos atípicos, como a ausência da formação clássica de granuloma.²

A prevalência de meningite tuberculosa é significativamente mais elevada nos doentes infectados por VIH do que nos sem co-infecção, sendo relatada uma incidência cinco vezes superior da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* nos doentes do primeiro grupo.^{16, 59, 60}

Para além disto, a presença do VIH pode complicar o diagnóstico diferencial pela incidência de outras infecções oportunistas neste contexto como, por exemplo: pneumonia intersticial linfocítica ou bronquiectasias, no caso de afecção pulmonar; ou granulomas de toxoplasmose, no caso de alteração a nível do sistema nervoso central.¹⁰²

Conhecidos estes factos, é plausível a questão de que a presença das duas infecções possa influenciar a apresentação clínica, analítica, imagiológica e anatomopatológica, contribuindo assim para um acréscimo nas dificuldades já existentes de diagnóstico para a meningite tuberculosa isolada.

5a) Clínica

Como referido anteriormente, a presença do VIH num indivíduo infectado por *M. tuberculosis* predispõe o mesmo a uma maior probabilidade de tuberculose extrapulmonar activa. Assim, é mais comum nestes o desenvolvimento de tuberculose linfática, disseminada, pleural, pericárdica e do SNC.²

A infecção por VIH pode também condicionar a apresentação clínica de cada um dos órgãos afectados. A título de exemplo, o órgão mais infectado, pulmão, apresenta achados atípicos, caracterizando-se por um exsudato infiltrativo inespecífico, que contrasta com a formação de cavitações em indivíduos imunocompetentes.¹

Como demonstrado anteriormente, as principais complicações da meningite tuberculosa são componentes importantes no diagnóstico clínico. Contudo, estas ocorrem pela resposta imunológica do hospedeiro à infecção, pelo que os doentes infectados por VIH recorrem aos serviços de saúde com uma apresentação clínica representativa de um estadio mais tardio da doença, associada a uma bacteriémia elevada.⁶²

A maioria dos autores descreve que a infecção por VIH não altera a apresentação clínica dos doentes com meningite tuberculosa.^{55,59,60,61}

Azuaje et al confirmam a afirmação anterior, mas constataam que os indivíduos infectados por VIH demonstram uma maior tendência para afecção pleuropulmonar e presença de adenopatias noutras localizações; alertando assim para a possibilidade de infecção simultânea de vários órgãos, como pulmão ou gânglios linfáticos, e conseqüente sintomatologia de origem focal a adicionar ao quadro clínico geralmente observado em cada uma destas enfermidades.⁶⁰

Relativamente ao quadro clínico da meningite tuberculosa propriamente dito, Katrak et al refere a possibilidade de ser mais frequente os doentes com meningite tuberculosa co-infectados por VIH apresentarem defeitos cognitivos, uma vez que, no estudo realizado por estes autores, apenas este grupo continha esta alteração.⁶²

Estudos realizados exclusivamente com crianças com meningite tuberculosa^{63,64} concluíram que os critérios de diagnóstico clínico e laboratorial da meningite tuberculosa podiam ser aplicados com sucesso tanto em doentes infectados por VIH como nos não infectados. Topley et al⁶⁴, no entanto, demonstrou que os co-infectados são, regra geral, mais jovens, e apresentam uma evolução temporal mais prolongada, factor decisivo para um prognóstico mais sombrio, em termos de morbi-mortalidade.

Finalmente, van der Weert et al, descreve ser mais comum que os doentes com meningite tuberculosa co-infectados por VIH apresentem hepatomegália, linfadenopatia generalizada, otorreia e mau estado geral. No entanto, atribui a presença destes achados à infecção por VIH e não à infecção por *M. tuberculosis*.⁶³

5b) Análise do LCR

A análise do LCR geralmente não apresenta diferenças significativas entre o grupo de doentes infectados por VIH e o grupo dos doentes não infectados.^{55, 59, 61} A maioria dos autores acredita que há uma maior dificuldade em isolar *M. tuberculosis* de amostras biológicas proveniente de doentes infectados por VIH, uma vez que a resposta imunológica deprimida permite uma maior dispersão dos bacilos nos fluidos, levando a uma maior incidência de falsos negativos nos testes.^{1, 2}

Yechoor et al sugerem a existência de hipoglicorraquia com valores menores nos indivíduos infectados por VIH. No entanto, referem que isto nem sempre se verifica, tornando a análise do LCR pouco específica.⁵⁵

Nos casos de infecção por VIH, a resposta imunocelular fundamental para o controlo da TB não está ao seu nível máximo, permitindo a libertação de factores quimiotáxicos para neutrófilos e persistência da resposta de fase aguda.⁶⁵ Isto levou van der Weert et al a indiciarem que seria a infecção por VIH a conferir o predomínio neutrofílico na meningite tuberculosa, caracterizado por uma presença inicial e persistente (com intervalo mínimo de 7 dias) de uma pleocitose neutrofílica (50%), alta concentração proteica no líquido espinal (>40 mg/dL) e baixa concentração de glicose no líquido espinal (<2/3 glicemia).⁶³

No entanto, já outros estudos referem que a análise bioquímica e bacteriológica do LCR, como a contagem de linfócitos, os valores de ADA e a prova definitiva de meningite

tuberculosa (culturas e coloração de Ziehl-Neelsen) se encontra presente nos doentes dos dois grupos, sem existirem diferenças significativas entre estes.^{24, 55, 59}

5c) Exames de imagem

É possível encontrar algumas diferenças entre o grupo de doentes infectados por VIH e o grupo dos que não têm a co-infecção. Contudo, a maioria dos autores acredita que estes não são relevantes para o diagnóstico da patologia seja em que grupo for.^{55, 62, 63}

Alterações a nível da telerradiografia torácica, ou seja, alterações por tuberculose pulmonar, são mais frequentes na co-infecção por VIH, sendo úteis para alertar o médico para a eventual existência de tuberculose extrapulmonar, na evidência de clínica de meningite.^{62, 63} As alterações acabam por ter uma baixa sensibilidade, pelo diagnóstico diferencial no doente infectado por VIH ser diversificado, podendo estas ter como base outro tipo de patologia, como pneumonia intersticial linfocítica ou bronquiectasias.⁶³

Há estudos que mostram uma maior incidência de aumento meningovascular basal, tuberculomas, hidrocéfalo obstrutivo e dilatação ventricular no indivíduo não infectado por VIH, como consequência de uma resposta inflamatória preservado neste grupo, sendo a atrofia cerebral mais frequente nos co-infectados por VIH, aquando da realização de Tomografia Computorizada cerebral.^{60, 62, 63}

Outros autores apresentam dados que contrariam estes, ao demonstrarem uma maior incidência de lesões de massa, hidrocéfalo, dilatação ventricular e enfartes na região dos gânglios da base em doentes infectados por VIH^{28, 33, 55, 60, 61}

5d) Anatomopatologia

Os estudos onde esta avaliação *post-mortem* foi realizada, indicam uma incidência igual nos dois grupos dos achados morfológicos encontrados.

No entanto, Katrak et al descreveu que o espessamento meníngeo proeminente e o hidrocefalo comunicante pode ocorrer somente nos doentes sem infecção por VIH encontrando-se, no grupo co-infectado, dilatação ventricular média, secundária a atrofia cerebral. Também neste estudo, a formação de adesões e vasculite obliterante, devido à presença do denso exsudato meníngeo basal, ocorreu de forma mais perceptível nos indivíduos sem infecção por VIH, assim como a formação de granulomas. Nos indivíduos com infecção por VIH, predominou um espessamento mínimo das meninges e, apesar das artérias se apresentarem livres de exsudato, a evidência de arterite foi observada microscopicamente, com enfartes detectados na região dos gânglios da base e no parênquima cerebral, na total ausência de tuberculomas.⁶² Também Yechoor et al descreveu que a imunossupressão provocada pela infecção por VIH faz com que os granulomas não surjam tão bem definidos nos indivíduos por VIH.⁵⁵

5e) Prognóstico

A maioria dos estudos realizados até à data aponta para uma resposta ao tratamento semelhante em ambos os grupos.⁵⁹

Apesar da duração dos sintomas ser comparável, o estadio da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* nos doentes co-infectados tende a ser mais avançado, indicador importante de doença mais grave.⁶²

O prognóstico tende essencialmente a ser estabelecido com base na apresentação clínica dos doentes, tendo em especial atenção as morbidades neurológicas. Ocorre uma maior taxa de morbidade nos doentes co-infectados, possivelmente justificada por reacções inflamatórias

paradoxais. Assim, múltiplos granulomas intracerebrais dispersos, detectados por RMN, e alvos de fármacos bactericidas, como a isoniazida, podem causar a libertação difusa do conteúdo destes, ocorrendo inflamação e edema, que pode contribuir para a degradação clínica.⁵⁹

Thwaites et al refere ainda que no grupo dos doentes co-infectados por VIH, para além da apresentação clínica, a alteração do estado de consciência e a presença de enfartes cerebrais são os factores mais importantes para o prognóstico, sendo a existência de hidrocefalia obstrutiva, nos indivíduos infectados por VIH, o melhor indicador de prognóstico, independentemente da existência de enfarte.⁵⁹

Contudo, a Escala de Coma de Glasgow pode ser o critério mais válido para estabelecimento de prognóstico em indivíduos de ambos os grupos, apesar de não ser revelador de um exame de imagem anormal. Uma pontuação igual ou inferior a 8 sugere prognóstico sombrio, ao passo que uma pontuação entre 14 e 15 prevê um bom prognóstico do ponto de vista neurológico em 80% dos casos. A contagem de linfócitos CD4+ aparenta ser irrelevante para o prognóstico⁶¹

6) A PCR na Meningite Tuberculose

A disponibilidade de polimerases purificadas de ADN e de oligonucleotídeos de ADN sintetizados quimicamente tornaram possível a clonagem rápida de sequências específicas de ADN, sem a necessidade de uma célula viva.

Criada em 1984 por Kary Mullis, esta técnica - *Polymerase Chain Reaction* (PCR) - permite que o ADN de uma região escolhida seja amplificado de forma infinita, desde que pelo menos parte da sua sequência de nucleótidos seja conhecida.

A parte conhecida da sequência é utilizada para desenvolver dois oligonucleótidos, sendo cada um complementar a cada fita da dupla hélice de ADN, e dispendo-se em locais opostos à região a ser ampliada. Estes oligonucleótidos funcionam como *primers* para a síntese de ADN *in vitro*, a qual é catalisada por uma polimerase de ADN, e determinam o final do fragmento de ADN que é obtido.⁶⁶

Assim, um ciclo de PCR consiste em três etapas: 1) separação dos filamentos, 2) hibridização dos *primers* e 3) síntese das cadeias alvo.⁶⁷ (Figura 2)

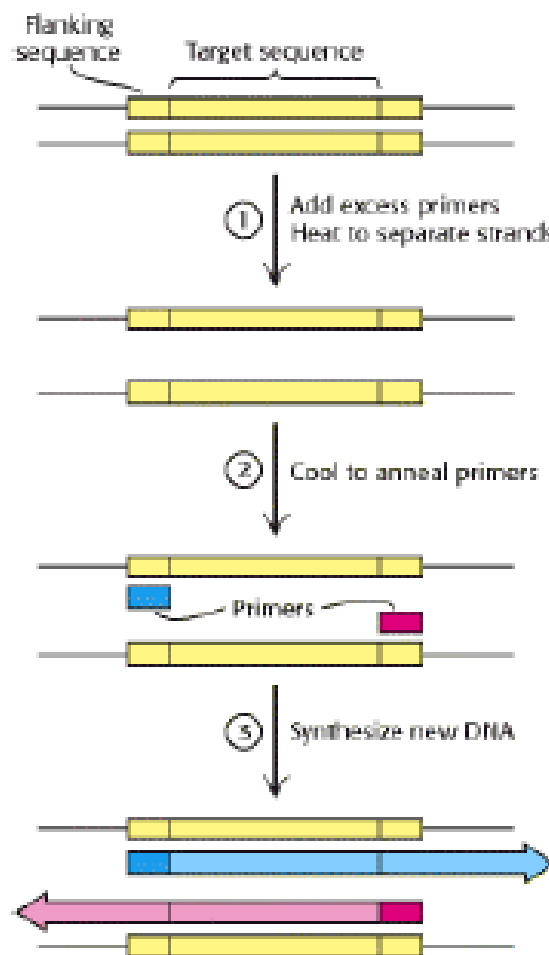


Figura 2 – Processo de amplificação da *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Fonte: Berg JM et al⁶⁷.

São estes os princípios orientadores para a compreensão e execução da PCR convencional, sendo a partir desta que se desenvolveram outras técnicas de PCR que são descritas, mais adiante.

O uso de técnicas de biologia molecular no diagnóstico da tuberculose começou com a utilização de sondas de ADN e, na altura, os resultados obtidos indicavam uma sensibilidade inferior aos testes convencionais.⁶⁸

Desde então têm sido testados e utilizados outros protocolos, *in-house* (protocolos desenvolvidos numa instituição ou serviço) e comerciais.

Uma apreciação prévia da sensibilidade e especificidade das técnicas de amplificação do ácido nucleico foi realizada em 2003 por Pai M. et al,¹⁵ tendo concluído por uma sensibilidade e especificidade globais de 71% e 99%, respectivamente. Contudo alguns dos estudos integrados nessa meta-análise obtiveram resultados inferiores, como uma sensibilidade de 25%⁶⁹ ou especificidade de 38%.⁷⁰ (Figura 3)

| Test property | Summary measure of test accuracy* (95% CI) | Test for heterogeneity† p value |
|---------------------------------|--|---------------------------------|
| All studies (n=49) | | |
| Sensitivity | 0.71 (0.63, 0.77) | <0.001 |
| Specificity | 0.95 (0.92, 0.97) | <0.001 |
| Positive likelihood ratio (LR+) | 15.4 (9.6, 24.9) | <0.001 |
| Negative likelihood ratio (LR-) | 0.25 (0.15, 0.39) | <0.001 |
| Diagnostic odds ratio (DOR) | 59.4 (40.6, 86.9) | 0.43 |
| Commercial tests (n=14) | | |
| Sensitivity | 0.56 (0.46, 0.66) | 0.10 |
| Specificity | 0.98 (0.97, 0.99) | 0.10 |
| Positive likelihood ratio (LR+) | 35.1 (19.0, 64.6) | 0.78 |
| Negative likelihood ratio (LR-) | 0.44 (0.33, 0.60) | 0.07 |
| Diagnostic odds ratio (DOR) | 96.4 (42.8, 217.3) | 0.75 |
| In-house tests (n=35) | | |
| Sensitivity | 0.76 (0.67, 0.83) | <0.001 |
| Specificity | 0.92 (0.88, 0.95) | <0.001 |
| Positive likelihood ratio (LR+) | 11.5 (6.8, 19.7) | <0.001 |
| Negative likelihood ratio (LR-) | 0.21 (0.11, 0.40) | <0.001 |
| Diagnostic odds ratio (DOR) | 54.8 (34.4, 87.2) | 0.28 |

Figura 3– Resultados da meta-análise realizada por Pai M. et al, com ensaios efectuados antes de 2003.¹⁵

No decorrer do presente estudo, são referidas diferentes técnicas com alvos distintos do genoma. A Tabela 2 apresenta os estudos mais relevantes da literatura internacional após a realização da meta-análise já citada.

| Autor e ano | Tipo de teste | Sequência alvo | Sensibilidade | Especificidade |
|------------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| Bhigjee et al 2006 ³¹ | PCR | IS6110 | 54,5% | 87,5% |
| Bhigjee et al 2006 ³¹ | PCR | MPB64 | 54,5% | 87,5% |
| Bhigjee et al 2006 ³¹ | RT-PCR | IS6110 | 70,5% | 87,5% |
| Takahashi et al 2005 ⁷¹ | PCR* | MPB64 | 22% | 100% |
| Takahashi et al 2005 ⁷¹ | NPCR* | MPB64 | 100% | 100% |
| Takahashi et al 2006 ⁷² | QNRT | MPB64 | 100% | 100% |
| Takahashi et al 2007 ⁷³ | NPCR | MPB64 | 51,2% | 100% |
| Takahashi et al 2007 ⁷³ | QNRT | MPB64 | 55,8% | 100% |
| Takahashi et al 2008 ⁷⁴ | WR-QNRT | MPB64 | 95,8% | 100% |
| Dora et al 2008 ⁷⁵ | NPCR | Ag 65-kDa | 50% | 98,5% |
| Rafi et al 2007 ⁷⁶ | PCR | IS6110 | 76,4% | 89,2% |
| Desai et al 2006 ²⁹ | PCR | IS6110 | 66,7% | 100% |
| Rafi et al 2007 ⁷⁷ | PCR | IS6110 | 98% | 100% |
| Rafi et al 2007 ⁷⁷ | NPCR | MPB64 | 91% | 91% |
| Rafi et al 2007 ⁷⁷ | NPCR | Ag 65-kDa | 51% | 92% |
| San Juan et al 2006 ⁷⁸ | PCR | IS6110 | 65% | 99% |
| Kurkani et al 2005 ⁷⁹ | PCR | Ag 38-kDa | 90% | 100% |

* - Casos avaliados somente em condições laboratoriais

PCR – PCR convencional; RT-PCR – PCR em tempo real; NPCR – *Nested PCR*; QNRT- *Quantitative Nested Real-Time PCR*; WR-QNRT – *Wide Range Quantitative Nested PCR*.

Tabela 2 – Ensaios com PCR realizados após 2003.

Certo estudo⁸⁰ conclui, inclusivamente, numa comparação custo-eficácia, que a utilização da PCR para diagnóstico de meningite tuberculosa não apresenta qualquer vantagem relativamente à observação directa por microscopia que, como se verificou num capítulo anterior, apresenta uma sensibilidade muito reduzida (10 a 22%). No entanto, é reconhecido por estes mesmos autores que a PCR pode ser de grande utilidade para a detecção de quantidades reduzidas de bacilos quando é imperativo um diagnóstico rápido, tal como na meningite tuberculosa ou na TB pleural.

6a) Validação da técnica

A validação de qualquer tipo de exame auxiliar de diagnóstico passível de ser utilizado na meningite tuberculosa, como a PCR, passa pela comparação dos resultados obtidos com um método padrão previamente estabelecido. É usual a utilização de meios de cultura apropriados para *M. tuberculosis* para este efeito, extrapolando-se então a sensibilidade, especificidade e consequente utilidade da técnica em estudo.

As amostras biológicas colhidas para ensaios com a utilização da PCR são provenientes de doentes com infecção por *M. tuberculosis* suspeita ou confirmada. Uma vez que estas não são todas provenientes de doentes com infecção confirmada, a probabilidade de que o bacilo esteja presente em todas as amostras é baixa,⁸¹ impossibilitando o estabelecimento de um método padrão fiável. Este, e outros factores, tornam a utilização da cultura para estes fins pouco segura, uma vez que a sensibilidade desta pode variar entre 38-88%^{28, 38,70} Há, inclusive, estudos em que a PCR apresentou uma sensibilidade superior à cultura, enquanto método padrão.⁸²

Apesar da sua baixa sensibilidade, a cultura de *Mycobacterium tuberculosis* é o método globalmente aceite enquanto método padrão^{83,84}, por se tratar do único exame com capacidade de detectar bacilos viáveis e, consequentemente, potenciais causadores de patologia.^{82, 83, 84}

Pelas razões enunciadas, apesar de não ser prática corrente da maioria dos estudos revistos, há autores que concluem não existir um método padrão único fiável, sugerindo a associação de metodologias como a clínica, a imagiologia, resultados bioquímicos e observação directa após coloração com Ziehl-Neelsen do LCR para sugerir uma etiologia tuberculosa e só então validar um método padrão.⁸⁵

6b) Sequências alvo do genoma

Dentro das técnicas utilizadas para a realização da Polymerase Chain Reaction (PCR), várias sequências do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*, enquanto alvos de amplificação, têm sido testadas. As mais frequentemente estudadas na literatura internacional são, sem dúvida, regiões da sequência de repetição IS6110 e da sequência codificadora da proteína MPB64, existindo ainda referências para sequências codificadoras dos antígenos 65 kDa e 38 kDa e para a sequência de repetição TRC₄. No entanto, há poucos estudos a comparar a sensibilidade e especificidade da amplificação de vários destes genes nas mesmas amostras clínicas.⁷⁶

- IS6110

Esta região do genoma do MB consiste numa sequência de repetição presente num elevado número de estirpes.³¹ É o alvo preferencial em vários estudos.

Ainda que a amplificação deste elemento resulte num aumento da sensibilidade da PCR no diagnóstico de TB e, conseqüentemente, meningite tuberculosa, reconhece-se a existência de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* sem qualquer cópia deste⁷⁹, com 40% a conterem somente uma cópia e 4% nos quais a região não está presente.⁸⁶

Contudo, há poucos relatos destas estirpes, pelo que é pouco provável que os falsos negativos possam ser atribuídos a estirpes com falta deste elemento.⁷⁶

Nesse mesmo sentido, alguns autores recorreram a informação preliminar, do ponto de vista epidemiológico, no sentido de excluir a presença destas estirpes na área geográfica da população onde os ensaios seriam realizados.⁷⁶

- MPB64

Sabe-se actualmente que *Mycobacterium tuberculosis* pode secretar mais de 33 diferentes tipos de proteínas,⁸⁶ sendo MPB64, uma proteína de 24-kD, uma das predominantes. Este antigénio foi encontrado apenas no fluído de culturas de estirpes do complexo *M. tuberculosis* e em alguns substratos de *M. bovis*, tendo mostrado potencial para uso diagnóstico.⁸⁷

Assim, o elemento de inserção MPB64 tem sido relatado como altamente específico para o complexo do *M. tuberculosis*.⁷⁰ Quando testado comparativamente com os fragmentos IS6110 e 65kDa HSP, resultou em menos falsos positivos.⁷⁰

- TRC₄

Trata-se de um elemento repetitivo conservado com especificidade para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Os *primers* direccionados para esta sequência geralmente amplificam um fragmento de 173 pb localizado na zona de leitura aberta Rv0697 no genoma da bactéria.⁸³

6c) As diferentes técnicas de PCR

Uma grande limitação dos estudos realizados é a dificuldade na comparação entre os protocolos das diferentes técnicas de PCR utilizadas, desde a extracção do ADN até à realização da amplificação da região seleccionada.

Não existe um método padrão fiável como identificativo de todos os indivíduos nos quais a presença de *Mycobacterium tuberculosis* provoca a doença. Como tal, a cultura do

microrganismo em meio apropriado (ex. Lowenstein-Jensen) é geralmente tido como método padrão, utilizando-se este para estabelecer a sensibilidade e especificidade da maioria das técnicas em estudo. A possibilidade de um valor baixo de sensibilidade da cultura impossibilita a realização de uma comparação eficaz entre as diferentes técnicas adoptadas ou os diferentes alvos génicos seleccionados para amplificação. Para além disto, as condições laboratoriais e as amostras para estudo não são uniformes, variando consoante a localização geográfica e o laboratório, complicando a realização de meta-análises.^{92, 93}

Diferentes técnicas referidas têm sido utilizadas em vários estudos no sentido de apurar qual a que apresenta maior utilidade no diagnóstico da meningite tuberculosa, como a PCR convencional ou a “Nested” PCR entre outros.

Sabe-se que uma simples cópia de um gene corresponde a uma célula bacteriana.^{70, 88} Partindo deste pressuposto, Takahashi et al^{72, 73, 74}, nos seus trabalhos, (explorados mais adiante) focaram muita da sua atenção na quantificação do número de cópias da amostra de LCR colhida, de forma a determinar qual o número mínimo de bactérias que os protocolos por eles desenvolvidos necessitavam para obter um resultado positivo e consequente identificação de *M. tuberculosis* nas amostras.

- Kits comerciais

Espera-se que a PCR seja mais sensível e específica que os restantes procedimentos de rotina para diagnóstico, apesar do seu custo elevado.⁸⁰

Existem actualmente no mercado vários testes padronizados para a detecção do bacilo de Koch em amostras biológicas. Destes, apenas o COBAS® AMPLICOR, da Roche Molecular Systems, Inc., e o AMPLIFIED Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test®, da Gene-Probe Inc. foram aprovados pela *Food and Drug Administration*.²⁸

Os protocolos comerciais disponibilizados no mercado para o diagnóstico de meningite tuberculosa foram alvo de comparação com protocolos in-house por Pai M et al¹⁵, na meta-análise referenciada, acabando os primeiros por obter resultados consistentes com elevada especificidade (98%), mas com a sensibilidade a rondar apenas os 56%. (Figura 3)

Jonsson et al⁸⁹ concluiu que a “performance” de testes comerciais, ao utilizar o COBAS[®] AMPLICOR, é decepcionante, com uma sensibilidade de 57,8% e uma especificidade de 98,6%. Recorrendo ao mesmo teste, Bonington et al⁹⁰ obteve resultados semelhantes (sensibilidade de 60% e especificidade de 100%).

Lang et al relata uma sensibilidade de apenas 33% na utilização do MTD[®] da Gene-Probe Inc., mantendo-se uma elevada especificidade (100%).⁹¹

Não obstante essa questão, a principal vantagem reside no facto de serem testes estandardizado, passíveis de avaliação independentemente das condições laboratoriais e geográficas, sem que estas variáveis sejam um impedimento para a realização de estudos comparativos eficazes. Daí que os resultados constantes obtidos em diferentes estudos sejam o principal ponto a favor destas metodologias.¹⁵

O maior componente do custo é a compra do kit de PCR. É possível diminuir isto com a utilização de métodos in-house estandardizados.¹⁵

Independentemente do aumento de sensibilidade, que se perspectiva no futuro, para estes testes, os seus custos elevados são um entrave para a sua aplicação nos países em desenvolvimento, regiões onde é indispensável a existência de um método auxiliar de diagnóstico rápido, fiável e pouco dispendioso.⁷⁶

- Protocolos in-house

Comparativamente com os kits comerciais, os protocolos in-house apresentaram um valor de sensibilidade bastante superior (76%) e uma especificidade ligeiramente inferior (92%). No entanto, estes resultados foram menos consistentes que os observados nos testes comerciais, tendo Pai M et al¹⁵ verificado que estudos sem testes duplamente cegos estão associados a melhores resultados. Para além disso, Noordhoek et al⁹² e Stuffys et al⁹³ apontam que as condições laboratoriais desempenham um papel importante na discrepância dos resultados, assim como a excessiva variabilidade entre os protocolos.

- PCR convencional

Sendo o primeiro tipo de PCR desenvolvido, existem diversos estudos a avaliar a acuidade desta técnica no diagnóstico da meningite tuberculosa. No entanto, há mais informação relativamente à infecção doutros locais, nomeadamente pulmonar.

A execução desta técnica encontra-se descrita na introdução do presente capítulo.

Bhigjee et al realizou um estudo comparativo entre diversas técnicas, obtendo uma sensibilidade de 55,8% e uma especificidade de 87,5% com um protocolo de PCR convencional. Utilizaram, como alvos de ampliação, as sequências IS6110 e a codificadora de MPB64, obtendo resultados semelhantes em ambos. No entanto, a utilização de *primers* para uma região dentro da sequência de IS6110 apenas positivou em um dos nove doentes seleccionados como tendo meningite tuberculose definitiva.³¹ (Tabela 2)

Utilizando também esta técnica, e tendo como alvo a sequência de repetição IS6110, Sumi et al, num estudo que procurou estabelecer uma análise comparativa entre a PCR e o Dot Immunobinding assays (Dot-Iba), obteve uma sensibilidade de 75% nos doentes com

meningite tuberculosa comprovada e 40,5% nos com doença provável. A especificidade atingiu os 100%, com todos os resultados nos grupos de controlo a serem negativos.⁴⁸

Noutro estudo com um pequeno grupo (9 doentes), e desta vez escolhendo MPB64 como alvo de amplificação, Takahashi et al estabeleceram uma sensibilidade de apenas 22,2% para a PCR convencional e uma especificidade de 100%.⁷¹

Kaneko et al, com uma PCR convencional seguida de hibridização por Southern blot, atingiram uma sensibilidade de 83%. Concluíram que os 3 a 4 dias necessários para cada ensaio são compensados pelo facto de ser uma técnica com menores custos económicos e com menos riscos de contaminação que outras, como a NPCR.⁸¹

Folgueira et al realizaram uma técnica de PCR direccionada para um fragmento de 123 pb na sequência de repetição IS6110, obtendo 100% de sensibilidade e 100% de especificidade num estudo com 8 doentes.⁹⁴

Narayana et al procuraram amplificar TRC₄, um elemento de repetição conservado com especificidade para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e comparar estes resultados com uma outra PCR convencional direccionada para IS6110. A sensibilidade no teste utilizado com o primeiro alvo atingiu os 91%, e uma especificidade de 76%. Por outro lado, os resultados obtidos com o alvo mais frequentemente utilizado, IS6110, foram de 81% para a sensibilidade e 79% para a especificidade. Contrariamente à maioria dos estudos efectuados, não estabeleceram a cultura do microrganismo como método padrão, tendo atribuído a certeza do diagnóstico a um conjunto de factores clínicos e laboratoriais.⁸³

Mais um estudo que obteve bons resultados foi o realizado por Rafi et al, que atingiu uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 100%, utilizando uma PCR convencional que teve como alvo de amplificação IS6110. O ponto forte deste estudo foi a utilização de um número elevado de doentes (677), com a atenção de constatar que 90 dos mesmos estavam

infectados por VIH. Para além disso, utilizaram um também elevado número amostras de LCR de doentes sem meningite tuberculosa (268) como controlo.⁷⁶

Desai et al utilizaram um protocolo *in-house* para a realização de uma PCR convencional, tendo como alvo de amplificação um fragmento de 245 pb na sequência de repetição IS6110, através de *primers* INS, e obtiveram resultados díspares para a mesma técnica e amostras quando alteraram o processo de extracção e purificação do ADN. Assim, conseguiram obter uma sensibilidade de 66,7% aquando da extracção com o protocolo QiAmp, e outro valor ligeiramente inferior (50%), aquando da extracção com o protocolo com CTAB. Foi um estudo realizado com 30 doentes com meningite tuberculosa confirmada ou provável e 27 doentes sem esta infecção para controlo.²⁹

Um estudo que procurou comparar três técnicas diferentes de PCR com diferentes alvos (IS6110 com PCR convencional, MPB-64 e Antígeno 14 kDa com NPCR), atribuiu os melhores resultados à PCR convencional, com uma sensibilidade de 98% e uma especificidade de 100% quando comparados com o método padrão. Neste estudo avaliaram as técnicas em 176 amostras de LCR, onde 46 eram de casos confirmados de meningite tuberculosa por cultura e 56 eram de casos suspeitos onde a cultura tinha tido resultados negativos. Para além dos resultados comparativos com o método padrão, esta técnica de PCR conseguiu detectar a presença de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* em 86% dos doentes em que o diagnóstico foi sugerido pela clínica, e não pelas culturas, que eram negativas. Apesar destes resultados a PCR para IS6110 foi inferior à MPB-64 no que diz respeito à avaliação da sensibilidade. Isto confirma a superioridade dos protocolos de NPCR sobre PCR convencional no que diz respeito à avaliação da sensibilidade dos protocolos, devido ao protocolo de 2 passos utilizados na NPCR.⁷⁷

Um estudo realizado por San Juan et al, no sentido de estabelecer um limiar de diagnóstico para uma técnica com doseamento do interferão-gama, utilizou uma PCR convencional direccionada para IS6110. A sensibilidade obtida foi de 65%, com valores bastante baixos nas amostras de doentes com culturas negativas (35%) - onde a carga bacilar no LCR é supostamente menor⁹⁵ - e uma especificidade de 99,6%. No entanto, a utilização simultânea dos dois testes nas mesmas amostras obteve uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 92,6%). O estudo comportou 127 doentes, 20 com meningite tuberculosa, 59 com meningite de outra etiologia e 49 tinham LCR sem alterações (incluindo também indivíduos infectados por VIH).⁷⁸

Kulkarni et al utilizaram esta mesma técnica direccionada à sequência codificadora da proteína 38 kDa, altamente específica para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados obtidos por estes autores, sensibilidade de 90% e especificidade de 100%, foram principalmente atribuídos pelos mesmos à hibridização por Southern blot para detecção dos resultados, em vez de recorrerem ao bromido de etídio. Uma das principais vantagens deste estudo foi a realização de estudos duplamente cegos. No entanto, apenas consistiu em 30 amostras.⁷⁹

- “Nested” PCR

É uma técnica que consiste em dois passos de amplificação, com o objectivo de atingir maior especificidade e sensibilidade da reacção. Na primeira fase ou passo de amplificação, o segmento alvo do genoma é amplificado de forma abrangente, sendo copiadas inclusive sequências localizadas fora deste. Após isto, e, utilizando este produto, realiza-se a amplificação somente da sequência alvo na segunda fase.⁶⁶

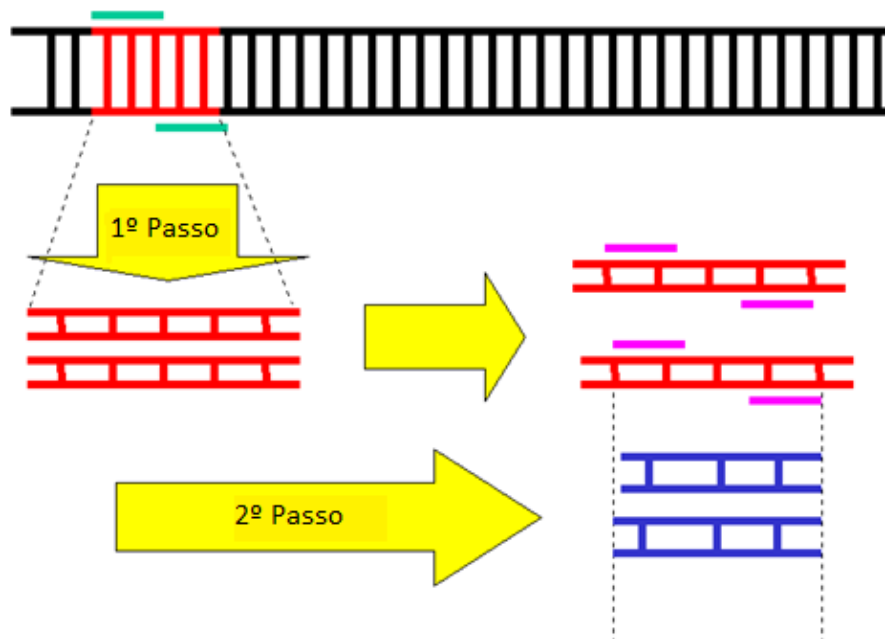


Fig. 4: Esquema de uma reacção de *Nested PCR*.

Liu et al⁸⁸ especulam que a utilização desta técnica promova um incremento da sensibilidade na ordem das 1000 vezes quando comparado com a PCR convencional, valor previamente concluído por Miyazaki et al⁹⁶, e confirmados neste seu estudo. Assim, a sensibilidade atingida foi de 90,5%.

Dora et al utilizaram uma técnica de NPCR *in-house* que não havido sido anteriormente validada, com *primers* direccionados à amplificação do gene codificador do antigénio 65-kDa. A especificidade deste teste foi bastante elevada, atingindo os 98% e um valor preditivo negativo de 97%. No entanto, a sensibilidade, reconhecidamente o maior problema das técnicas de amplificação molecular, ficou-se pelos 50%, neste estudo que envolveu 148 doentes com meningite.⁷⁵

Caws et al optaram por uma NPCR com protocolo *in-house* cujo alvo de amplificação se situa na sequência de repetição IS6110, num estudo com 131 amostras de LCR de 131 doentes diferentes. Ao compararem os resultados com o método padrão, ou seja, a cultura, obtiveram uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 94%.⁸²

Scarpellini et al, num pequeno estudo com apenas 10 doentes, com *primers* também direccionados para IS6110, justificam a utilização desta técnica com dois passos de amplificação por tornar desnecessária a hibridização com sonda interna após electroforese com gel. Um pormenor interessante é que apresentam resultados que implicam terem detectado 10^2 cfu/ml, ou seja, o ADN correspondente a apenas 2 micobactérias.⁹⁷

Martins et al utilizaram uma NPCR com *primers* direccionados para MPB64, num estudo em que comparou a acuidade de diagnóstico desta técnica na tuberculose pleural com a na meningite tuberculosa. Utilizou como método padrão a cultura de *Mycobacterium tuberculosis*, obtendo uma sensibilidade de 70%, uma especificidade de 88%, um valor preditivo positivo de 82% e um valor preditivo negativo de 80% no diagnóstico de meningite tuberculosa.⁸⁴

Brienze et al apresentaram, ao utilizar *primers* direccionados para MPB64, um estudo com uma sensibilidade de 53%, valor inferior ao obtido pela cultura neste estudo, que obteve uma sensibilidade de 54%. À semelhança dos outros estudos, também envolveu uma população bastante reduzida. Um ponto bastante positivo deste estudo é que o diagnóstico não foi estabelecido apenas pelos resultados da cultura mas sim por todo um conjunto de elementos: suspeição clínica e vários exames complementares de diagnóstico, desde a análise bioquímica do LCR até à microscopia.⁹⁸

Rafi et al, num estudo já referido, direccionou duas técnicas de NPCR para MPB64 e para a sequência codificadora do antígeno 65 kDa, excluindo qualquer possível vantagem da utilização do último no diagnóstico da meningite tuberculosa. A especificidade foi alta em ambas, com cada uma a apresentar apenas um resultado positivo nos grupos de controlo. Contudo, a sensibilidade do primeiro situou-se nos 91%, ao passo que a do último foi somente 51%.⁷⁶

Como é reconhecido pela grande maioria dos autores, o principal problema da NPCR é a questão da contaminação, que ocorre com maior frequência em métodos mais específicos.⁸¹ No entanto, Takahashi et al⁷¹ e Liu et al⁸⁸ esclarecem que a boa prática laboratorial pode reduzir a incidência desta complicação (de 52,3% para 3,2%), sendo possível obter resultados bastante fiáveis.

- Real-Time PCR

A PCR em tempo real (Real-Time PCR; RT-PCR) combina a amplificação rápida de ADN com fluorimetria e parece ser vantajosa quando comparada com a PCR convencional, como verificou Bhigjee et al, num estudo comparativo realizado, onde obteve uma sensibilidade de 72,1% na RT-PCR e de apenas 55,8% na PCR convencional.³¹

O surgimento desta técnica permitiu a observação directa da reacção de amplificação, sem necessidade de abrir os tubos onde esta se processa, sendo uma mais-valia na prevenção de contaminação.⁷²

No entanto, acaba por ser uma técnica dispendiosa, difícil de aplicar nos países em desenvolvimento, onde a tuberculose é endémica.

- QNRT

Takahashi et al desenvolveu uma nova técnica, “Quantitative Nested Real Time” (QNRT) PCR, baseado na PCR TaqMan®, da Applied Biosystems. Semelhante à NPCR, também consiste em duas fases consecutivas de amplificação. No entanto, a principal alteração do protocolo ocorre na conversão do segundo passo numa PCR em tempo real, permitindo assim uma análise quantitativa.^{72,73}

A principal e inovadora característica desta nova técnica é a capacidade de calcular o número inicial de cópias de ADN de *M. tuberculosis* existentes nas amostras de LCR antes de serem

submetidas a extracção e aos dois passos subsequentes de PCR.⁷² Estes autores calcularam o número de cópias iniciais do ADN de *Mycobacterium tuberculosis* através da taxa de amplificação do controlo interno específico. Utilizaram um “Plasmídeo M” desenvolvido de forma a ter a mesma amplificação e eficácia na detecção que o ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, este plasmídeo foi formado a partir sequências aleatórias de nucleótidos com um fragmento de MPT64 conhecido. Sabendo o número inicial e final de cópias dos genes codificadores de MPB64 do plasmídeo, e ainda o número final de cópias de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, facilmente chegaram à quantidade inicial de bactérias na amostra.⁷²

Assim, utilizando este método direccionado à sequência MPT64 do ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, obtiveram uma sensibilidade de 100% e uma especificidade também de 100%, apesar de se ter tratado de um estudo bastante pequeno (9 doentes com meningite tuberculosa e 20 doentes sem esta patologia). Para além disso, referem ter alcançado positividade no teste com apenas uma bactéria na amostra.⁷²

Num outro estudo, os mesmos autores utilizaram uma PCR convencional, uma NPCR e a QNRT, para avaliar a evolução clínica da doença e a resposta ao tratamento, num estudo que envolveu 8 doentes com 43 amostras de LCE.⁷³

Concluíram que a NPCR e a QNRT eram eficazes na avaliação da evolução dos doentes. Ambas obtiveram valores positivos em cerca de metade das amostras (51,2% para a NPCR e 55,8% para a QNRT) antes da terapêutica. Após o início desta, verificaram que a melhoria do estado clínico dos doentes se correlacionava directamente com a conversão dos resultados da NPCR e da QNRT de positivos em negativo.⁷³

A vantagem da utilização da QNRT estabeleceu-se pela sua capacidade em quantificar os patógenos. Uma diminuição do número de bacilos correspondeu a uma melhoria do estado geral.⁷³

O principal ponto fraco desta técnica é o de tanto o plasmídeo M como o ADN do *Mycobacterium tuberculosis* serem amplificados com dois pares de *primers* comuns. Isto leva a dificuldade acrescida na amplificação de amostras paucibacilares pela consequente interferência de um número elevado de cópias do controlador (plasmídeo M). Para se obter uma amplificação suficiente numa amostra onde o número de cópias de ADN é inferior a 100, a primeira fase de amplificação da QNRT necessita de ser realizado num número de ciclos elevado (35 ciclos), ocorrendo sobre amplificação e instabilidade do plasmídeo M.⁷⁴

- WR-QNRT

Na sequência da dificuldade de utilização da técnica explorada anteriormente para a correcta quantificação em amostras com baixo número de bacilos, Takahashi et al desenvolveu um novo controlador interno para utilizar como calibrador, convertendo a QNRT na “Wide-Range QNRT” (WR-QNRT) PCR.⁷⁴

Este novo calibrador consistiu no desenvolvimento do plasmídeo NM, baseado no plasmídeo M utilizado na QNRT. Para isto, um total de 4 regiões deste plasmídeo foram substituídos por nucleótidos artificiais aleatórios, estabelecidos de forma a conter a mesma composição de nucleótidos que MPT64 do genoma “selvagem” da *M. tuberculosis*. Após clonagem do mesmo para se obterem 10^3 cópias, estas foram tidas como a nova forma de controlo da técnica.⁷⁴

As etapas de amplificação compreendem a utilização de dois pares de *primers* externos na primeira fase de amplificação, nos sentidos directo e reverso, WF1/WR1 e MF1/MR1. Os

primeiros são específicos para o MPT64 do *Mycobacterium tuberculosis* “selvagem”, ao passo que os últimos são específicos para o plasmídeo NM.⁷⁴

No segundo passo, utilizam-se dois pares de *primers* internos nos sentidos directo e reverso, TqMn-WF2/TqMn-WR2 e TqMn-MF2/TqMn-MR2, sendo os dois primeiros *primers* específicos para o MPT64 selvagem e os últimos para os nucleótidos artificiais aleatórios.

Para além disto, dois tipos de sondas (TqMn-W-VIC e TqMn-M-FAM) são utilizadas. A primeira etiquetada com uma tinta fluorescente VIC e especificamente acoplada ao MPT64 selvagem. A outra contém fluorescência por 6-carboxifluoresceína (FAM) e acopla-se especificamente aos nucleótidos artificiais aleatórios do plasmídeo NM.⁷⁴

A diferença no protocolo presente relativamente ao da QNRT, é que neste, a realização das duas fases de amplificação decorre com pares de *primers* comuns WF1 e WR1 no primeiro passo e TqMn-Wf2 e TqMn-WR2 no segundo passo tanto para o ADN de *M. tuberculosis* como para o plasmídeo M, enquanto controlador. Dois tipos de sondas, TqMn-W-VIC e TqMn-M-FAM são de seguida adicionados para a detecção de ADN *Mycobacterium tuberculosis* e para o plasmídeo M.⁷²

A alteração no protocolo e conseqüente desenvolvimento desta nova técnica alargou o espectro de detecção, conseguindo detectar um número de ADN entre 1 e 10^5 .⁷⁴

Com este novo controlador, procura-se não existirem interferências entre o plasmídeo NM e o número de cópias do ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, uma vez que são necessários menos ciclos (25 ciclos) de amplificação que na QNRT na detecção de pequenas quantidades de ADN.⁷⁴

Os resultados obtidos aquando da utilização da WR-QNRT por Takahashi et al na aplicação clínica são equivalentes à QNRT em termos de sensibilidade (95.8%) e especificidade

(100%). No entanto, no número de cópias calculado pela QNRT verificou-se a influência desfavorável da sobre-amplificação e consequente instabilidade do plasmídeo M enquanto controlador interno, tal como tinha sido demonstrado num ensaio laboratorial prévio com amostras manipuladas.⁷⁴

No mesmo estudo, o número de cópias apresentou variações significativas, do ponto de vista estatístico, durante o curso do tratamento dos 10 doentes. Para além disto, alterações no número de cópias do ADN de *M. tuberculosis* correlacionaram-se com a condição clínica do doente e a resposta à terapêutica.⁷⁴

A principal vantagem da utilização deste teste na evolução clínica, defendida pelos autores, baseia-se na sua capacidade de detecção precisa do número de cópias de ADN, mesmo quando presentes num número muito reduzido. Contudo, o número de cópias calculadas pode não corresponder ao número de bactérias viáveis, podendo estar presentes bacilos não causadores da patologia.⁷⁴

6d) PCR na avaliação do prognóstico

Não se tratando de uma questão fulcral a ser abordada na realização deste trabalho, serve o presente espaço para indicar que a utilização da PCR na evolução clínica encontra-se limitada, uma vez que as principais complicações da meningite tuberculosa, como a presença de hidrocéfalo ou vasculopatia, não são dependentes de proteínas ou ADN da micobactérias, mas antes da reacção imunológica do hospedeiro.^{97,99}

6e) A baixa sensibilidade da PCR

A baixa sensibilidade permanece o principal entrave à sua aplicabilidade, tendo os diferentes autores apresentado justificações para estes resultados.

A avaliação da especificidade, ou seja, a percentagem de resultados negativos obtidos em amostras que não contém os alvos de amplificação desejados, é estabelecida pela utilização da técnica em estudo num grupo de controlo, nos quais não está presente a patologia infecciosa nem o agente patogénico em questão. A inexistência da doença não implica a total ausência de bacilos nos doentes, pelo que uma técnica pode amplificar fragmentos de ADN de bactérias que não são viáveis, prejudicando os valores de especificidade.⁷⁶

O local de colheita de LCR pode ser importante, pois pressupõe-se a existência de uma maior quantidade de bacilos na base do crânio.³² No entanto, tal não foi confirmado por Bhigjee et al, para além de ser inviável na prática clínica.³¹

Bhigjee et al³¹ e Nguyen et al¹⁰⁰ atribuem a existência de falsos negativos à baixa quantidade de *Mycobacterium tuberculosis* nas amostras de LCR. A paucibacilaridade das amostras é também referida por Baran et al que, através um método dilucional, registaram um maior número de falsos negativos em amostras com menor concentração de bacilos.⁹⁵ A terapêutica anti-tuberculosa prévia pode também ter influência por esta razão.⁸³

Para além da carga bacilar presente numa amostra, a sensibilidade também pode ser afectada pela presença de inibidores da PCR contidos no LCR, à lise incompleta das micobactérias e à distribuição desigual dos microrganismos nos fluidos biológicos extraídos.¹⁰¹

Pelos motivos acima referidos, é recomendada a extracção de volumes de LCR acima de 5 mL.^{34,45}

A metodologia utilizada para a extracção e purificação do ADN de *M. tuberculosis* para amplificação pelas técnicas moleculares tem também sido referido como fundamental no desempenho da PCR.

Os métodos de extracção convencional, que consistem em fenol-clorofórmio e precipitação por etanol, são considerados por alguns autores^{31, 72, 78} como inadequados no contexto clínico da meningite tuberculosa pela sua morosidade e dificuldade de execução. Os *kits* comerciais disponíveis podem ser insuficientes para a extracção de ADN de *M. tuberculosis*, com Takahashi et al a sugerirem adição de *ethachinmate* ao já referido para a extracção de pequenas quantidades de ADN de forma mais eficaz e económica.

Por outro lado, Folgueira et al⁹⁴ relata resultados positivos com lise simples, evitando a utilização do fenol-clorofórmio, seguido de amplificação e hibridização com uma sonda com radiomarcador. Brienze et al comparou um protocolo de aquecimento simples a 95°C durante 15 minutos, com outro método comumente utilizado, o de xarope de sílica, obtendo uma eficácia equivalente em ambos.⁹⁸

Martins et al realizou um estudo com dois métodos de extracção utilizados em paralelo: aquecimento simples da amostra durante 10 minutos a 100°C ou digestão do material génico durante uma noite com proteinase K seguida de extracção por fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, no qual obteve os melhores resultados.⁸⁴

Já Desai et al comparou um método em que recorreu ao bromido de amónio hexadeciltrimetil (CTAB), com o *kit* de extracção de ADN sanguíneo QIAmp. A sensibilidade foi superior neste último (66,7%), com o primeiro a ficar-se pelos 50%. O CTAB é um detergente conhecido por formar complexos com polissacarídeos e proteínas, podendo assim auxiliar na remoção de possíveis inibidores da PCR.²⁹ Rafi et al atingiu melhores resultados que o autor anterior, com a conversão dos resultados da PCR para valores positivos na maioria das amostras previamente negativos com fenol-clorofórmio quando este foi substituído pelo CTAB (dados não fornecidos).⁷⁶

A utilização da totalidade da amostra do LCR, e não apenas do precipitado formado após centrifugação pode revelar-se favorável, especialmente em casos onde a maioria do ADN do *Mycobacterium tuberculosis* se encontra presente no LCR como ADN livre, no sentido de aumentar a sensibilidade do teste.^{76, 79}

No sentido de aumentar a sensibilidade da PCR, alguns autores debatem a possibilidade de amplificar várias sequências alvo em simultâneo.^{31, 76, 83, 85} Narayanan et al propõe a utilização de mais que um teste de amplificação em simultâneo, ao obter melhores resultados com duas técnicas convencionais de PCR, uma com IS6110 e outra com TR4C como alvos génicos (dados não apresentados).⁸³

Bonington et al obteve conclusões semelhantes com *kits* comerciais, na comparação entre o AMPLICOR® semi-automático (sensibilidade de 17,5%) e o AMPLICOR® manual (sensibilidade de 25%), sem haver predominância, do ponto de vista estatístico, da sensibilidade de uma das técnicas sob a outra. Quando utilizadas no mesmo ensaio, atingiram uma sensibilidade global de 27,5%.⁸⁷ Tal como os autores anteriores, Rafi et al também conclui que é possível obter melhores resultados com a amplificação de duas sequências em simultâneo, com uma NPCR direccionada a MPB64 a poder ser utilizada como coadjuvante ao protocolo de PCR convencional com a sequência IS6110.⁷⁶

No entanto, há autores que não obtiveram qualquer vantagem com a utilização simultânea de várias sondas, desencorajando a utilização de vários alvos no mesmo procedimento.³¹

7) Conclusão/Discussão

A tuberculose mantém-se como um problema global de saúde a nível mundial, com uma incidência de 9,27 milhões de casos em 2007.³

A tuberculose extrapulmonar é comum entre doentes infectados por VIH. Em alguns estudos, foi registado a ocorrência de tuberculose extrapulmonar – isoladamente ou em associação com doença pulmonar – em 40 a 60% dos casos em indivíduos co-infectados. As formas mais comuns são a linfática, a disseminada, a pleural e a pericárdica.²

Os doentes previamente infectados por VIH contribuem para uma maior disseminação da doença em indivíduos não infectados por VIH, e apresentam uma tendência cinco vezes superior de desenvolver meningite tuberculosa.¹⁶

A situação em Portugal permanece controlada, apesar de ainda existirem regiões que foram consideradas como locais de intervenção prioritária, como o Norte de Portugal, com especial atenção ao distrito do Porto. A infecção no nosso país ocorre preferencialmente em circunstâncias semelhantes a outros países com alto índice de desenvolvimento humano, sendo uma patologia encontrada predominantemente nos grandes centros urbanos, devido à emigração e à maior debilidade socioeconómica em grupos populacionais de risco.⁸

Ainda que possam existir algumas diferenças entre os doentes co-infectados por VIH e por *M. tuberculosis*, comparativamente com os doentes infectados somente pelo último, estas geralmente não são significativas - quando presentes, são alterações possivelmente relacionadas com o estado do sistema imunitário.^{33,55, 60-63}

Os resultados são contraditórios, com autores a sugerirem uma maior incidência de lesões de massa em indivíduos co-infectados por VIH,^{28,33,55,60,61} enquanto outros sugerem que será o

grupo dos não infectados por VIH a demonstrar uma maior presença destas complicações.^{60,}

62, 63

Independentemente destas diferenças, a ausência da infecção por VIH permite uma abordagem diagnóstica mais direccionada. Nos doentes infectados por VIH, há um acréscimo na probabilidade da infecção por *M. tuberculosis* se manifestar como doença extrapulmonar activa, com a possibilidade de acometimento simultâneo de vários órgãos^{1, 2}

Para além disto, a presença da infecção VIH pode complicar o diagnóstico diferencial da meningite tuberculosa pela incidência de outras infecções oportunistas neste contexto como, por exemplo: pneumonia intersticial linfocítica ou bronquiectasias, no caso de afecção pulmonar; ou granulomas de toxoplasmose, no caso de alteração a nível do sistema nervoso central.¹⁰²

A deficiência imunitária e uma maior dificuldade no diagnóstico da infecção por *M. tuberculosis* resulta numa taxa de mortalidade superior destes indivíduos.⁵⁹

As alterações encontradas nos diferentes grupos (com e sem infecção por VIH) podem ser documentadas em exames imagiológicos, não sendo, geralmente, relevantes para o diagnóstico.^{55, 62, 63}

Tratando-se de uma infecção grave, em que o tempo de espera até ao início da terapêutica é decisivo para o prognóstico do doente, a inexistência de exames complementares com resultados fiáveis pode ser comprometedora. Os métodos convencionais de diagnóstico desta patologia, como a clínica, a caracterização do LCR e as culturas estão associados a sensibilidades bastante reduzidas.^{1, 2, 23-47}

A clínica pode não ser típica, com a ausência de sinais ou sintomas importantes para a caracterização desta meningite crónica, como a ausência de pródromos, sinais de irritação meníngea ou alterações neurológicas distintivas.^{1,24}

A caracterização do LCR pode ser importante mas é frequente as quantificações bioquímicas e celulares manterem-se inalteradas ou dentro de valores considerados normais.^{1,2,23,25}

Mais recentemente, tem-se proposto o doseamento dos níveis de ADA, à semelhança de outros tipos de infecção por *M. tuberculosis*, como na tuberculose pleural. Trata-se de um método rápido e fácil de executar.^{23, 40, 42-47}

Os resultados obtidos para este teste não são uniformes, principalmente pelas variações nos protocolos consoante o ensaio clínico realizado. Os valores de sensibilidade variam consoante os autores – 57% e 70% para Corral et al⁴³ e Cunha⁴⁶, respectivamente. Para estes autores, a especificidade rondou os 90%. A sensibilidade pode ser aumentada com o estabelecimento de um valor limiar para os níveis de ADA elevado, mas esta alteração resulta numa diminuição da especificidade do teste.⁴⁰

O doseamento dos níveis de ADA deve ser considerado no diagnóstico rápido da meningite tuberculosa. Contudo, são ainda necessários mais estudos acerca da utilidade deste teste no diagnóstico da referida enfermidade.

A cultura é, de momento, o único método pelo qual se pode quantificar a presença de bactérias viáveis numa amostra clínica. Como tal, é usual o seu uso como método padrão, seja na prática clínica, seja nos ensaios para extrapolação de sensibilidade e especificidade de outras técnicas de diagnóstico na infecção por *M. tuberculosis*. Trata-se de um método padrão pouco fiável, uma vez que a sua sensibilidade pode variar entre 38-88%.^{24, 27, 28} Para além disto, é uma técnica que tem um tempo de execução elevado (3 a 4 semanas), tornando-a

incompatível com a prática clínica na meningite tuberculosa. Espera-se que novos meios de cultura tornem mais célere a obtenção de resultados.²⁸

A observação directa por microscopia de LCR tem a vantagem de ser uma técnica rápida, barata e de fácil execução. Contudo, é dos métodos auxiliares de diagnóstico com uma sensibilidade de somente 10-22%.^{24, 27, 28}

A utilização de métodos direccionados a alvos imunológicos tem apresentado resultados promissores para a realização dos requisitos referidos. Técnicas como a “Dot-Immunobinding-assay” têm apresentado sensibilidade entre os 60-90%, associadas a elevadas especificidades. Deste modo, podem-se perspectivar como uma boa alternativa a explorar no futuro.

A *Polymerase Chain Reaction* é um dos métodos que têm vindo a ser estudados para o diagnóstico rápido da meningite tuberculosa. Os diferentes estudos com este tipo de técnica apresentam uma grande variabilidade de resultados, devido à utilização da cultura para método padrão e da execução protocolos distintos.

Os estudos realizados com a utilização de *kits* comerciais são os que apresentam os resultados mais concordantes, com sensibilidades a rondar os 56-58% e especificidades entre os 98-100%. Esta concordância deve-se, principalmente, à realização dos ensaios com protocolos padronizados. Apesar de se perspectivar um incremento da sensibilidade no futuro, os elevados custos de aquisição serão sempre um impedimento à utilização destes nas zonas onde são mais necessários, ou seja, nos países em vias de desenvolvimento. Já os protocolos *in-house* apresentam grande variabilidade de resultados consoante o autor e o estudo. A meta-análise realizada por Pai M. et al¹⁵ atribuiu uma sensibilidade global de 76% e uma especificidade de 92% a este tipo de protocolos. Curiosamente, os valores de sensibilidade

mais elevados eram geralmente encontrados em estudos sem testes duplamente cegos ou noutros em que esta condição não era revelada.

O LCR pode conter inibidores da PCR, cujos constituintes ainda não foram bem caracterizados.¹⁰¹ A lise incompleta das micobactérias e a distribuição desigual dos microrganismos nos fluidos biológicos extraídos também pode prejudicar a sensibilidade.^{34,35}

Por estes motivos, e pela natureza paucibacilar das amostras, recomenda-se uma colheita de um volume de LCR superior a 5 mL.^{34,35}

A própria questão da escolha do alvo do genoma de *M. tuberculosis* para a amplificação acaba não ser clara à presente data. Qualquer que seja a sequência escolhida para este efeito, há sempre vários considerandos a fazer, como o facto de estas não estarem presentes em todas as estirpes da micobactéria. Também esta variável acaba por contribuir para a tão elevada heterogeneidade dos dados apresentados. Mesmo utilizando a mesma técnica de PCR direccionada ao mesmo alvo génico, os resultados continuam a não ser coerentes, variando consoante o autor. De qualquer forma, e ainda neste tema, parece ser uma boa prática a amplificação de mais do que uma sequência na mesma amostra pois aumenta a probabilidade de pelo menos uma das sequências estar presente, mas com incremento nos custos.

No que diz respeito às diferentes técnicas de PCR, existe disparidade de resultados consoante a técnica utilizada. A PCR convencional é a técnica mais estudada. Alguns autores consideram-na a técnica mais fiável.⁷⁶ Outros há que consideram que a sensibilidade pode atingir um valor 1000 vezes mais elevados com a utilização da *Nested* PCR.⁸¹ De qualquer forma, esta última técnica terá sempre a desvantagem de necessitar de um espaço laboratorial e condições técnicas mais aprimoradas, por comportar um risco aumentado de contaminação das amostras.

A RT-PCR ainda não foi devidamente explorada no contexto da meningite tuberculosa. A principal vantagem desta técnica aparenta ser a possibilidade da observação directa dos resultados da reacção, evitando a abertura dos tubos de reacção e, conseqüentemente, diminuindo a possibilidade de contaminação.⁷¹ Devido a esta mais-valia da RT-PCR, Takahashi et al desenvolveu a QNRT e a WR-QNRT, obtendo uma sensibilidade de 51% para a primeira⁷² e 95,8% para a segunda.⁷³ A principal vantagem destes dois novos procedimentos foi a possibilidade de se poder quantificar o número de bacilos presentes nas amostras de LCR.^{72,73}

A PCR pode oferecer, independentemente da técnica utilizada, resultados com elevada especificidade mas sensibilidade relativamente baixa. Prevalece a vantagem da obtenção rápida de resultados. A maioria dos estudos revistos na literatura internacional apresentam um número de doentes bastante reduzido (<20), o que contribui para a indefinição do papel da PCR no diagnóstico da meningite tuberculosa em doentes com e sem infecção por VIH.

A amplificação do ácido nucleico complementa mas não substitui o julgamento clínico, microscopia directa e cultura de *M. tuberculosis* no diagnóstico de meningite tuberculosa. É necessário um elevado índice de suspeição baseada na clínica, no contexto epidemiológico do local de origem do doente e na possibilidade da infecção por VIH.

A existência de tuberculose em localização extrapulmonar corresponde a doença definidora de SIDA, pelo que a presença de infecção por VIH deve ser excluída. A partir daí, a utilização de métodos como a análise e caracterização do LCR ou a imagiologia podem fornecer indícios importantes, e a PCR pode ser útil como método rápido de diagnóstico.

A PCR é um exame auxiliar de diagnóstico rápido, simples, altamente específico, mas com baixa sensibilidade e custo elevado.

As suas principais limitações são a necessidade de elevadas quantidades de ADN micobacteriano e a sua incapacidade para distinguir microrganismos viáveis. No entanto, a facilidade de execução desta técnica e a rapidez na obtenção de resultados constituem-se como vantagens adicionais à clínica e cultura no diagnóstico de meningite tuberculosa.

O papel da PCR no diagnóstico da meningite tuberculosa permanece incerto. São necessários mais estudos, com um número de doentes superior, e com uma técnica *in-house* com um protocolo estandardizado. Apesar das suas limitações, a PCR deve ser executada por rotina, o que acontece já em muitos centros, uma vez que, na presença de uma suspeição clínica fundamentada, um resultado positivo é altamente sugestivo de etiologia tuberculosa da meningite.

8) Referências bibliográficas

- 1- Leib SL, Martin GT (2003). Acute and Chronic Meningitis. In: Infectious Diseases, 2nd ed (Cohen J, Powderly W, eds.). St. Louis: Elsevier, 2003, pp 251-266.
- 2- Raviglione MC, O'Brien RJ (2008). Tuberculosis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine 17th Edition (Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, eds). New York: McGraw Hill, 2008, pp 1006-1020.
- 3- World Health Organization, Global Tuberculosis control 2009 – epidemiology, strategy, financing, 2009. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index. Acedido em 09/12/2009
- 4- Cobertt EL, Watt CJ, Neff W. The global burden of tuberculosis – global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med 2003;163:1009-1021.
- 5- Observatório Português dos Sistemas de Saúde. Controlo da tuberculose em Portugal. Apreciação crítica epidemiológica relativa a 2006/2007. Disponível em: <http://www.observaport.org>. Acedido em 30/08/2009.
- 6- Direcção Geral de Saúde, Situação epidemiológica da tuberculose e resultados em Dezembro de 2008, PNT, Março 2009. Disponível em <http://www.min-saude.pt/NR/rdonlyres/0CBC6341-117B-4BE2-A75D-221F972F8D7F/0/i010745.pdf>. Acedido em 31/08/2009.

- 7- World Health Organization. Epidemiology of Tuberculosis in Europe. Disponível em http://www.euro.who.int/document/TUB/fs02e_tbepidemeuro.pdf. Acedido em 03/11/2009

- 8- Administração Regional de Saúde do Norte, I.P. Plano Regional de Saúde do Norte 2008-2010. Disponível em http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Conte%C3%BAdos/GRP/PRSN_VDiscussao_9Dez.pdf. Acedido em 31/08/2009.

- 9- Direcção Geral de Saúde. Tuberculose: Ponto da Situação em Portugal em 2006, dados preliminares em Março de 2007. Disponível em <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i009162.pdf>. Acedido em 31/08/2009.

- 10- Bucher HC, Griffith LE, Guyatt GH, et al. Isoniazid prophylaxis for tuberculosis in HIV infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *AIDS*. 1999;13:501-507.

- 11- Daley CL, Small PM, Schechter GF, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: an analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med*. 1992;326:231-235.

- 12- Shafer RW, Singh SP, Larkin C, Small PM. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in an immunocompetent patient. *Tuber Lung Dis*. 1995;76:575-577.

- 13-**Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1989;320:545-550.
- 14-**Girardi E, Raviglione MC, Antonucci G, Godfrey-Faussett P, Ippolito G. Impact of the HIV epidemic on the spread of other diseases: the case of tuberculosis. *AIDS* 2000;14(suppl 3):S47-S56.
- 15-**Pai M, Flores LL, Pai N, et al. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification test for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2003;3:633-43.
- 16-**Berenguer J, Moreno S, Laguna F, et al. Tuberculous meningitis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med.* 1992;326:688-672.
- 17-**Thwaites GE, Hien TT. Tuberculous meningitis: many questions, too few answers. *Lancet Neurol.* 2005;4:160-170.
- 18-**Thwaites GE, Schoeman JF. Update on tuberculosis of the central nervous system: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Clin Chest Med.* 2009;30:745-754
- 19-**Bermudez LE, Sangari FJ, Kolonoski P, et al. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a

model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 2002;70(1):140–6.

20-Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granulomas in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cellule* 2009;136(1):37–49.

21-Dastur DK, Manghani DK, Udani PM. Pathology and pathogenetic mechanisms in neurotuberculosis. *Radiol Clin North Am* 1995;33: 733–52.

22-Thwaites GE, Simmons CP, Than Ha Quyen N, et al. Pathophysiology and prognosis in Vietnamese adults with tuberculous meningitis. *J Infect Dis* 2003; 188: 1105–15.

23-Puccioni-Sohler M, Brandao CO. Factors associated to the positive cerebrospinal fluid culture in tuberculous meningitidis. *Arq Neuropsiquiatria* 2007;65(1):48-53.

24-Thwaites GE, Chau TT, Stepniowska K, et al. Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratorial features. *Lancet* 2002;360:1287-1292

25-Garcia-Monco JC. Central nervous system tuberculosis. *Neurol Clin* 1999;17:737-759

26-Cabeça HLS, Gomes HR, Machado LR, Livramento JA. Dosage of lactate in the cerebrospinal fluid in infectious diseases of the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:843-848

- 27-**Thwaites GE, Chau TTH, Mai NTH et al. Tuberculous meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:289-99
- 28-**Fitzgerald DE, Sterling TE, Haas DW (2009) *Mycobacterium tuberculosis*. In Principles and practice of Infectious diseases – 7th edition (Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds). New York: Churchill Livingstone – Elsevier. 2010. pp3129-3163
- 29-**Desai D, Nataraj G, Kulkarni S, et al. Utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculous meningitis. *Res. Microbiol* 2006;157:967-970.
- 30-**Porket MT, Sotir M, Parrot-Moore P, Blumberg HM. Tuberculous meningitis at a large inner-city medical center. *Am J Med Sci* 1997;313:325-31.
- 31-**Bhigjee AI, Padayachee R, Paruk, H, et al. Diagnosis of tuberculous meningitis: clinical and laboratory parameters. *Int J Infect Dis* 2007;11:348.
- 32-**Davis LE, Rastogi KR, Lambert LC, Skipper BK. Tuberculous meningitis in the southwest United States: a community-based study. *Neurology* 1993;43:1775-8
- 33-**Dube MP, Holtom PD, Larsen RA. Tuberculous meningitis in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Med.* 1992;93:520-524.
- 34-**Karstaedt AS, Valtchanova S, Barriere R, Crewe-Brown HH. Tuberculous meningitis in South African urban adults. *Q J Med* 1998;91:743-747

- 35-**Heringer RR, Fernandes LE, Goncalves RR, Puccioni-Sohler M. Location of the lesion and the cerebrospinal fluid findings in tuberculous meningitis: differences in the lumbar, cisternal and ventricular compartments.
- 36-**Kennedy DH, Fallon RJ. Tuberculous meningitis. JAMA 1979;241: 264–68.
- 37-**Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Mycobacterium. In Medical Microbiology, 5th Edition (Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, eds). 2005. Philadelphia: Elsevier. pp 297-310.
- 38-**Daniel TM. The rapid diagnosis of tuberculosis: A selective review. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 116:277-282, 1990.
- 39-**Ogawa SK, Smith MA, Brennessel DJ, Lowy FD. Tuberculous meningitis in an urban medical center. Medicine (Baltimore) 1987;66:317-326.
- 40-**Lopez-Cortes LF, Cruz-Ruiz M, Gomez-Mateos J, et al: Adenosine deaminase activity in the CSF of patients with aseptic meningitis: utility in the diagnosis of tuberculous meningitis or neurobrucellosis. Clin Infect Dis 1995; 20(3):525-30.
- 41-**Machado LR, Livramento JA, Spina-França A. Adenosino-desaminase no líquido cefalorraquidiano de pacientes com a síndrome de imunodeficiência adquirida. Arq Neuropsiquiatr 1995;53:755-759

- 42-**Corral I, Quereda C, Navas E, et al. Adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of HIV infected patients: limited value for diagnosis of tuberculous meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:471-476.
- 43-**John MA, Coovadia YM. Shortfalls in the use of adenosine deaminase in tuberculous meningitidis. *Trop Doct* 2001; 31:138-139.
- 44-**Martínez E, Domingo P, Ris J, Sambeat MA, Cadafalch J. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase levels in a patient with cryptococcal meningitidis. *Clin Infect Dis* 1992; 15:1061-1062.
- 45-**Piras MA, Gakis C. Cerebrospinal fluid adenosine desaminase activity in tuberculous meningitis. *Enzyme* 1973; 14:311-317.
- 46-**Cunha, JGS. Contribuição para o estudo da adenosinadesaminase no líquido cefalorraquidiano: Aplicação clínica e fisiopatologia. Coimbra, ed. aut., 1991, p. 196.
- 47-**Donald PR, Malan C, Schoeman JF. Adenosine desaminase activity as a diagnostic aid in tuberculous meningitis. *J Infect Dis* 1987; 156:1040-1041.
- 48-**Sumi S, Mathai A, Radhakrishnan VV. Dot-immunobinding assay. *Methods Mol Biol.* 2009;536:89-93.
- 49-**Sumi, M.G, Mathai A, Sarada C, et al. A comparative evaluation of dot-immunobinding assay (Dot-Iba) and polymerase chain reaction (PCR) for the

laboratory diagnosis of tuberculous meningitis. *Diag Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 35–38.

50-Mathai A, Radhakrishnan VV, Sarada C, George SM. Detection of heat stable mycobacterial antigen in cerebrospinal fluid by Dot-Immunobinding assay. *Neurol India*. 2003 Mar;51(1):52-4.

51-Thomas MM, Hinks TS, Raghuraman S, et al. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 Jun;12(6):651-7.

52-Annamma M, Radhakrishnan VV, Shobha S. Diagnosis of tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay to detect mycobacterial antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *Med Microbiol Immunol*. 1990;179(5):281-8

53-Engin G, Acunaş B, Acunaş G, Tunaci M. Imaging of extrapulmonary tuberculosis. *Radiographics*. 2000 20(2):471-88; quiz 529-30, 532.

54-Garg, RK. Tuberculosis of the central nervous system. *Postgrad Med J*. 1999; 75(881): 133–140

55-Yechool VK, Shandera WX, Rodriguez P, Cate TR. Tuberculous meningitis among adults with and without HIV infection. Experience in an urban public hospital. *Arch Intern Med*. 1996;156(15):1710-6.

- 56-**Eide FF, Gean AD, So IT. Clinical and radiographic findings in disseminated tuberculosis of the brain. *Neurology* 1993;43:1427-9.
- 57-**Gee GT, Bazan III C, Jinkins JR. Miliary tuberculosis involving the brain: MR findings. *Am J Roentgenol* 1992;159:1075-6
- 58-**Jinkins JR, Gupta R, Chang KH, Rodríguez Carbajal J. MR imaging of the central nervous system tuberculosis. *Radiol Clin North Am* 1995;33:771-86
- 59-**Thwaites GE, Duc Bang N. The influence of HIV infection on clinical presentation, response to treatment, and outcome in adults with Tuberculous meningitis. *J Infect Dis.* 2005;192(12):2134-41
- 60-**Azuaje C, Fernandez H, Almirante B, et al. Meningitis tuberculosa: estudio comparativo en relacion con la coexistencia de infeccion por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006 Apr;24(4):245-50.
- 61-**Schutte CM. Clinical, cerebrospinal fluid and pathological findings and outcomes in HIV-positive and HIV-negative patients with tuberculous meningitis. *Infection* 2001;29:213-217.
- 62-**Katrak SM, Shembalkar PK, Bijwe SR, Bhandarkar LD. The clinical, radiological and pathological profile of tuberculous meningitis in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Neurol Sci*2000;181(1-2):118-26.

- 63-** van der Weert EM, Hartgers NM, Schaaf HS, et al. Comparison of diagnostic criteria of tuberculous meningitis in human immunodeficiency virus-infected and uninfected children. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 Jan;25(1):65-9
- 64-** Topley JM, Bamber S, Coovadia HM, Corr PD. Tuberculous meningitis and co-infection with HIV. *Ann Trop Pediatr.* 1998;18:261-266
- 65-** Donald PR, Schoeman JF, van Schalkwyk HJ. The “Road to Health” card in tuberculous meningitis. *J Trop Pediatr.* 1985;2:117-120.
- 66-** Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Manipulating Proteins, DNA, and RNA – Analyzing and manipulating DNA. In *Molecular Biology of the Cell*, 5th. Atlanta: Garland Science. 2008. pp 532-552.
- 67-** Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2004). Explorando os genes. In *Bioquímica*, 5^a Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. pp 151-199.
- 68-** Grange, JM. The rapid diagnosis of paucibacillary tuberculosis. *Tubercle* 1989;70:1–4.
- 69-** Smith KC, Starke JR, Eisenach K, Ong LT, Denby M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. *Pediatrics* 1996; 97:155-160
- 70-** Lee BW, Tan JA, Wong SC, et al. DNA amplification by the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Comparison of protocols

involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, 65 kD antigen, and MPB64. *J Neurol Sci* 1994;123:173-79.

71-Takahashi T, Nakayama T, Tamura M, et al. Nested polymerase chain reaction for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *Neurology* 2005;64:1789-1793.

72-Takahashi T, Nakayama T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *J Clin Microbiology* 2006;44:1029-39.

73-Takahashi T, Tamura M, Takahashi SN. Quantitative nested real-time PCR assay for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *J Neuro Sci* 2007;255:69-76

74-Takahashi T, Tamura M, Asami Y. 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.

75-Dora JM, Geib G, Chakr R, et al. Polymerase Chain Reaction as a useful and simple tool for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in a Brazilian tertiary care hospital. *Braz J Infect Dis* 2008;12(3):245-247.

76-Rafi W, Venkataswamy MM, Nagarathna S, et al. Role of IS6110 uniplex in the diagnosis of tuberculous meningitis: experience at a tertiary neurocentre. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11(2):209-214.

- 77-**Rafi, W, Venkataswamy MM, Ravi V, Chandramuki A. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative evaluation of in-house PCR assays involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, MPB-64 and 65 kDa antigen. *J. Neurol. Sci.* 2007;252:163-168
- 78-**San Juan R, Sánchez-Suárez C, Rebollo MJ, et al. Interferon γ quantification in cerebrospinal fluid compared with PCR for the diagnosis of tuberculous meningitidis. *J Neurol* 2006;253:1323-1330.
- 79-**Kulkarni SP, Jaleel MA, Kadival GV. Evaluation of an in-house-developed PCR for the diagnosis of tuberculous meningitis in Indian children. *J. Med. Microbiol* 2005;54:369-373
- 80-**Bollela VR, Sato DN, Fonseca BA. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1073-76.
- 81-**Kaneko K, Miyatake T. Tuberculous meningitis. *Neurology* 1995;45:1425-26
- 82-**Caws M, Wilson SM, Clough C, Drobniewski F. Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2000;38:3150-3155

- 83-**Narayana S, Parandaman V, Narayanan PR, et al. Evaluation of PCR using TRC₄ and IS6110 primers in detection of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2001;39:2006-2008
- 84-**Martins LC, Paschoal IA, Von Nowakinski A, et al. Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33(3):253-257.
- 85-**Bonington A, Stang JIG, Klapper PE, et al. TB PCR in the early diagnosis of tuberculous meningitis: evaluation of the Roche semi-automated COBAS Amplicor MTB test with reference to the manual Amplicor MTB PCR test. *Tuber Lung Dis* 2000;80:191-196.
- 86-**Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.
- 87-**Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 1999;37(11):3693-7.
- 88-**Liu PYF, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol. *Neurology* 1994;44:1161-4.

- 89-**Jonsson B, Ridell M. The Cobas Amplicor MTB test for detection Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and non-respiratory clinical specimens. *Scand J Infect Dis* 2003;35(6-7):372-7.
- 90-**Bonington A, Strang JI, Klapper P, Hood SV. Use of Roche Amplicor Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 1998;36:1251-54.
- 91-**Lang AM, Feris-Iglesias J, Pena C, et al. Clinical evaluation of the Gen-Probe amplified direct test for detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998;36:2191-2194.
- 92-**Noordhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis : an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2522–25.
- 93-**Suffys P, Palomino JC, Cardoso Leao S, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 179–83.
- 94-**Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Noriega AR. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in AIDS patients. *Neurology*. 1994;44(7):1336-8.

- 95-** Baran J, Riederer KM, Khatib R. Limits of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in spiked cerebrospinal fluid using the polymerase chain reaction in tuberculous meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:47-50.
- 96-** Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, Kaku M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1993;31:2228-2232.
- 97-** Scarpellini P, Racca S, Cinque P. Nested polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring treatment response in AIDS patients with tuberculous meningitis. *AIDS* 1995;9:895-900.
- 98-** Brienze VM, Tonon AP, Pereira FJ. Low sensitivity of polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculous meningitis in southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34(4):389-393.
- 99-** Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;337:5-7.
- 100-** Nguyen LN, Kox LF, Pham LD, et al. The potential contribution of the polymerase chain reaction to the diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2000;38:3150-5.

- 101-** Melzer M, Brown TJ, Flood J, et al. False negative polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid samples in tuberculous meningitis established by culture. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67(2):249-50.
- 102-** Whiteman M, Espinoza LM, Post JD, et al. Central nervous system tuberculosis in HIV infected patients: clinical and radiographic findings. *Am J Neuroradiol* 1995;16:1319-27.