



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ana Paula Gomes dos Santos

Diagnóstico da tuberculose pleural utilizando ensaios de produção de interferon gama, proteína indutora do interferon 10-kD, adenosina deaminase e modelagem de árvores de classificação

Rio de Janeiro

2019

Ana Paula Gomes dos Santos

**Diagnóstico da tuberculose pleural utilizando ensaios de produção de interferon gama,
proteína indutora do interferon 10-kD, adenosina deaminase e modelagem de árvores de
classificação**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Lopes Rufino Alves
Coorientadora: Prof.^a Dra. Luciana Silva Rodrigues

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S237 Santos, Ana Paula Gomes dos.
Diagnóstico da tuberculose pleural utilizando ensaios de produção de interferon gama, proteína indutora do interferon 10-kD, adenosina deaminase e modelagem de árvores de classificação / Ana Paula Gomes dos Santos – 2019.
149 f.

Orientador: Rogério Lopes Rufino Alves.
Coorientadora: Luciana Silva Rodrigues.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Tuberculose pleural - Diagnóstico - Teses. 2. Marcadores bioquímicos – Teses. 3. Biomarcadores - Teses. 4. Derrame pleural - Teses. 5. Estudos preditivos – Teses. I. Alves, Rogério Lopes Rufino. II. Rodrigues, Luciana Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-002.5:616-071

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ana Paula Gomes dos Santos

Diagnóstico da tuberculose pleural utilizando ensaios de produção de interferon gama, proteína indutora do interferon 10-kD, adenosina deaminase e modelagem de árvores de classificação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de março de 2019.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Luciana Silva Rodrigues
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogério Lopes Rufino Alves (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Cláudia Henrique da Costa
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Fernanda Carvalho de Queiroz Mello
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Denise Duprat Neves
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Ao paciente com tuberculose, que há milênios é triplamente vitimizado pela doença. Primeiro pelo estigma que carrega, que motiva vergonha, medo, e alimenta o preconceito. Segundo, pela doença em si, que abate, prostra, emagrece e o torna tísico. Por fim, pelas cicatrizes físicas e emocionais que levará para sempre em sua história. A você, paciente com tuberculose, dedico minha vida de estudo, trabalho e pesquisa!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Abelino e Luzinete, que interromperam os estudos precocemente. Mas quem disse que sabedoria e instrução são a mesma coisa? Uma vida a dois de muito trabalho, esforço, e acima de tudo muito amor! Criaram duas filhas sempre priorizando a educação, e hoje somos graduadas e pós-graduadas. A vocês, pai e mãe, meu reconhecimento, minha reverência, minha gratidão!

A minha irmã Andreia, inspiração na arte de tornar o magistério em uma forma de diversão. Lembro de pensar com frequência: “Como ensinar é difícil... Mas como minha irmã faz bem!”. E lá fui eu, com meu mestrado e agora o doutorado. Quero ser boa como ela! A você irmã, meu reconhecimento, minha reverência, minha gratidão!

Minha irmã me deu dois pedaços, dois corações fora do meu peito, meus sobrinhos Matheus e Marcos. Quero ser exemplo para eles e por isso estudo e leio, e estudo e leio, e estudo e leio... São jovens... Talvez entendam esse meu anseio pelo conhecimento, talvez não. Talvez desculpem minha ausência para me dedicar ao doutorado e ao trabalho, talvez não. Espero que entendam o motivo de tudo isso. A vocês, amados sobrinhos, meu reconhecimento, minha reverência, minha gratidão!

Divido esse título com todos que me ajudaram na construção desta tese, todo nosso grupo de pesquisa. Tenho medo de citar nomes e esquecer alguém, mas esse trabalho realmente não seria possível sem três profissionais: Thiago Mafort, Raquel Corrêa e Marcelo Ribeiro-Alves. Não se sinta esquecido por não ter seu nome citado aqui. Você, que realmente trabalhou nisso, vai se reconhecer nessas palavras. O título é nosso! A você, parceiro de pesquisa, meu reconhecimento, minha reverência, minha gratidão!

Duas pessoas precisam que seus nomes sejam citados aqui... Não pelo protocolo, ou por educação, e sim por serem merecedoras: meus orientadores Rogério e Luciana. Tive o privilégio de ter como mestres pessoas que me respeitaram acima de tudo! Respeitaram meu tempo, ou ausência dele. Respeitaram meu estilo, minhas opiniões e sugestões. A vocês, meus orientadores, meu reconhecimento, minha reverência, minha gratidão!

Existiu alguém antes disso tudo começar e de quem me lembro todos os dias da minha vida. Alguém que previu toda essa história. A você, vó, Dona Amélia, meu reconhecimento, minha reverência, minha gratidão!

Tudo isso não seria possível sem os desígnios Dele. A Ele, meu reconhecimento, minha reverência, minha gratidão!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (261101792014).

Todo homem deve decidir se vai andar na luz do altruísmo criativo ou na escuridão do egoísmo destrutivo. A mais urgente pergunta a ser feita nesta vida é: - O que fiz hoje pelos outros?

Martin Luther King Junior

RESUMO

SANTOS, Ana Paula Gomes dos. **Diagnóstico da tuberculose pleural utilizando ensaios de produção de interferon gama, proteína indutora do interferon 10-kD, adenosina deaminase e modelagem de árvores de classificação.** 2019. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A entidade nosológica denominada derrame pleural (DP) apresenta mais de 50 etiologias, sendo a insuficiência cardíaca, as neoplasias, a pneumonia e a tuberculose pleural (TBPI) as causas mais frequentes. As dificuldades para se determinar a causa de um DP é uma realidade seja em locais da estrutura básica da saúde ou em centros terciários. A despeito de sua frequência, a TBPI tem no seu diagnóstico uma grande dificuldade por ser uma forma paucibacilar e pela necessidade de procedimentos invasivos para sua confirmação, que por vezes são contraindicados ou não realizados pela ausência de estrutura para tal. Esta tese tem por objetivo oferecer duas estratégias de diagnóstico para a TBPI. Os resultados foram apresentados sob a forma de dois artigos, ambos submetidos a periódicos com conceitos B1 pela Plataforma Sucupira. A primeira estratégia, apresentada no artigo 1, estuda três biomarcadores quantificados no líquido pleural (LP) de pacientes com DP em investigação: interferon-gama (IFN- γ), proteína indutora do interferon 10-kD (IP-10), ambos avaliados a partir de sobrenadantes oriundos do ensaio de produção de IFN- γ (IGRA) QuantiFERON-TB Gold in Tube®, e adenosina deaminase (ADA), mensurada conforme Giusti, 1974. Todos estes marcadores apresentaram valores mais altos em pacientes com TBPI quando comparados com pacientes com outras doenças que não TB. Baseado nos casos confirmados de TBPI, o IFN- γ apresentou o melhor desempenho em um ponto de corte de 2,33 UI/mL [sensibilidade (Se) = 93,8% e especificidade (Sp) = 97,9%] seguido de ADA com um ponto de corte de 25,8 UI/L (Se = 100% e Sp = 84,8%) e IP-10 (ponto de corte = 4.361,9 pg/mL, Se = 75% e Sp = 82,6%). IFN- γ + ADA (ponto de corte: 25,8 UI/L) representou a associação mais precisa dos biomarcadores (98,4%), mostrando Se = 93,7%, Sp = 100%, valor preditivo positivo = 100% e valor preditivo negativo = 97,9%, sugerindo esta combinação como excelente preditor do diagnóstico de TBPI. O segundo artigo apresenta como estratégia um modelo de árvore de classificação utilizando variáveis clínicas e laboratoriais simples para o diagnóstico do DP tuberculoso. O modelo preditivo proposto utilizou três variáveis clínicas e laboratoriais passíveis de utilização mesmo em unidades básicas de saúde (hiporexia, percentual de polimorfonucleares e dosagem de proteínas no LP), identificadas por análise multivariada [hiporexia: *odds ratio* ajustada (aOR) 27,39 (IC95% 6,26 - 119,89), polimorfonucleares em duas categorias: 3-14% aOR 26,22, IC 95% 7,11 - 96,68 e <3 % aOR 28,67, IC 95% 5,51 - 149,25 e proteínas \geq 5g/dL: aOR 7,24, IC 95% 3,07 - 17,11]. O rendimento deste modelo nos casos de TBPI confirmados revelou valores de Se, Sp e acurácia de 89,2%, 84,5% e 87,6%%, respectivamente. Ambas as estratégias se mostraram úteis para o diagnóstico da TB, respeitando as estruturas mais limitadas ou não dos cenários onde poderiam ser aplicadas, sugerindo que apesar da dificuldade de diagnóstico da TBPI, este desafio pode estar no caminho para ser superado.

Palavras-chave: Tuberculose. Pleura. Diagnóstico. Biomarcadores. Modelos preditivos.

ABSTRACT

SANTOS, Ana Paula Gomes dos. **Diagnosis of pleural tuberculosis using interferon gamma release assays, inducible protein of interferon gamma 10-kD, adenosine deaminase and classification tree modeling.** 2019. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The nosological entity called pleural effusion (PE) presents more than 50 etiologies, being heart failure, cancer, pneumonia and pleural tuberculosis (PITB) the most frequent causes. Difficulties in determining the cause of PE are a reality whether in the primary health care setting or in tertiary centers. In spite of its frequency, PITB has a great difficulty in its diagnosis because it is a paucibacillary presentation and because of the need for invasive procedures for its confirmation, which are sometimes contraindicated or not performed due to the lack of structure. This thesis aims to offer two diagnostic strategies for PITB. The results were presented in the form of two articles, both submitted to periodicals with concepts B1 by the Scupira Platform. The first strategy, presented in article 1, study three biomarkers quantified in the pleural fluid (PF) of patients with PE under investigation: interferon-gamma (IFN- γ), interferon-inducible protein 10-kD (IP-10) from supernatants of IFN- γ release assay QuantiFERON-TB Gold in Tube®, and adenosine deaminase (ADA), measured according to Giusti, 1974. All these markers showed higher values in patients with PITB when compared with patients with diseases other than TB. Based on confirmed PITB cases, IFN- γ showed the best performance at a cut-off point of 2.33 IU/mL [sensitivity (Se) = 93.8% and specificity (Sp) = 97.9%] followed by ADA with a cut-off point of 25.8 IU/L (Se = 100% and Sp = 84.8%) and IP-10 (cut-off = 4,361.9 pg/mL, Se = 75% and Sp = 82.6%). IFN- γ + ADA (cut-off: 25.8 UI/L) represented the most accurate association of biomarkers (98.4%) showing Se = 93.7%, Sp = 100%, positive predictive value = 100% and negative predictive value = 97.9%, and suggesting this combination as an excellent predictor for PITB diagnosis. The second article presents as strategy a classification tree model using simple clinical and laboratory variables for the diagnosis of tuberculous PE. The proposed predictive model used three clinical and laboratorial variables that could be used even a basic health units (hyporexia, polymorphonuclear percentage and protein dosage in PF), identified by multivariate analysis [hyporexia: adjusted odds ratio (aOR) 27.39 (95% CI 6.26 - 119.89), polymorphonuclear in two categories: 3-14% aOR 26.22, 95% CI 7.11 - 96.68 and < 3% aOR 28.67, 95% CI 5.51 - 149.25 and proteins \geq 5g/dL: aOR 7.24, 95% CI 3.07-17.11]. The yield of this model in the cases of confirmed PITB revealed values of Se, Sp and accuracy of 89.2%, 84.5% and 87.6%, respectively. Both strategies proved useful for the diagnosis of TB, respecting the more limited structures of the scenarios where they could be applied, suggesting that despite the difficulty of diagnosing PITB, this challenge may be on the way to being overcome.

Keywords: Tuberculosis. Pleura. Diagnosis. Biomarkers. Predictive models.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Causas de derrame pleural conforme a classificação pelos critérios de Light	19
Quadro 2 –	Exames realizados de rotina para investigação da etiologia do derrame pleural	22
Figura 1 –	Conjuntos de países com maior impacto de tuberculose, tuberculose/HIV e tuberculose multirresistente.....	25
Figura 2 –	Resumo esquemático de células-chave e citocinas envolvidas na resposta imune para antígenos específicos do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em testes de imunodiagnóstico.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina deaminase
APC	Célula apresentadora de antígeno, do inglês <i>Antigen presenting cell</i>
AUC	Área sob a curva, do inglês <i>Area under the curve</i>
BCG	Bacillus-Calmette Guérin
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
CFP-10	Cultura de filtrado proteico-10, do inglês <i>Culture filtrate protein-10</i>
DP	Derrame pleural
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-linked immuno assay</i>
ELISPOT	Ensaio imunoenzimático por detecção de pontos, do inglês <i>Enzyme-linked immunospot assay</i>
EP	Extrapulmonar
ESAT-6	Alvo antigênico secretor precoce-6, do inglês <i>early secretory antigenic target-6</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IC	Insuficiência cardíaca
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IGRA	Ensaio de produção de interferon-gama, do inglês <i>Interferon-Gamma Release Assay</i>
IIQ	Intervalo interquartil
IL	Interleucina
INI	Instituto Nacional de Infectologia
IP-10	Proteína indutora do interferon gama Kd-10, do inglês <i>Interferon gamma inducible protein of 10-kD</i>

LDH	Lactato desidrogenase
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LJ	Löwenstein Jensen
LP	Líquido pleural
LPA	<i>Line Probe Assay</i>
MIP-1 α	Proteína inflamatória do macrófago alfa 1, do inglês <i>Macrophage inflammatory protein alpha 1</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase, do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
QTF-GIT	QuantiFERON-TB Gold In Tube®
RJ	Rio de Janeiro
ROC	Característica de operação do receptor, do inglês <i>Receiver operating characteristic</i>
SAD	Sistemas de apoio à decisão
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
Se	Sensibilidade
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISREG	Sistema Nacional de Regulação
Sp	Especificidade
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose multirresistente
TBNET	<i>European Tuberculosis Network</i>
TBPI	Tuberculose pleural
TC	Tomografia computadorizada
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>
Th1	Célula T CD4 auxiliar tipo 1, do inglês <i>T helper 1</i>
Th2	Célula T CD4 auxiliar tipo 2, do inglês <i>T helper 2</i>

UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
USG	Ultrassonografia
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZN	Ziehl-Neelsen

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mL	Mililitro
cm	Centímetro
/	Fração
<	Menor
x	Multiplicação
>	Maior
UI	Unidades internacionais
L	Litro
mm	Milímetro
°C	Grau Celcius
Mb	Megabase
γ	Gama
α	Alfa
kD	Unidade de massa atômica
®	Marca registrada
g	Gramma
dL	Decilitro
/	Fração
pg	Picograma
=	Igual

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	Derrame pleural: Causas e abordagem diagnóstica	18
1.2	Tuberculose	24
1.2.1	<u>Epidemiologia da tuberculose</u>	24
1.2.2	<u>A bacteriologia da tuberculose</u>	26
1.2.3	<u>Aspectos imunológicos da tuberculose</u>	28
1.2.4	<u>Métodos diagnósticos para a tuberculose</u>	33
1.2.5	<u>Diagnóstico da tuberculose pleural na prática clínica</u>	34
1.3	Novos métodos imunológicos para o diagnóstico da TBPI	36
1.4	A aplicação de métodos estatísticos no diagnóstico da tuberculose pleural	38
2	JUSTIFICATIVA	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	Geral	42
3.2	Específicos	42
4	RESULTADOS	43
4.1	<i>Artigo 1: Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using interferon gamma, interferon gamma inducible protein of 10-kD and adenosine deaminase (Artigo publicado)</i>	43
4.2	<i>Artigo 2: Hyporexia and cellular/biochemical characteristics of pleural fluid as predictive variables on a model for pleural tuberculosis diagnosis (Artigo submetido)</i>	78
5	DISCUSSÃO	94
	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE A – Formato final do 1º artigo científico (Artigo publicado)	115
	APÊNDICE B – Instrumento de coleta de dados do 1º artigo científico (Artigo publicado).....	134
	APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do 1º artigo científico (Artigo publicado).....	139

APÊNDICE D – Instrumento de coleta de dados do 2º artigo científico (Artigo submetido).....	142
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética para o 1º artigo científico (Artigo publicado).....	144
ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética para o 2º artigo científico (Artigo submetido).....	148
ANEXO C - Comprovação de submissão do 2º artigo científico (Artigo submetido)	149

INTRODUÇÃO

A entidade nosológica denominada derrame pleural (DP), não é considerada uma doença em si, e sim o reflexo de alguma patologia subjacente responsável pelo desequilíbrio entre a formação e a absorção do líquido pleural (LP) (Karkhanis e Joshi 2012). Os derrames pleurais apresentam mais de 50 etiologias conhecidas, e entre elas a insuficiência cardíaca (IC), as neoplasias, a pneumonia e a tuberculose (TB) são as mais comuns (Porcel et al. 2014). As dificuldades para se determinar a causa de um DP é uma realidade seja em locais da estrutura básica da saúde ou em centros terciários (Bhatnagar e MasKell 2015).

A TB pleural (TBPI), uma das principais causas de DP como mencionado acima, é a manifestação extrapulmonar (EP) mais frequente da TB, responsável por 42% desses casos (Gomes et al. 2014). Apesar de sua frequência, a TBPI tem no seu diagnóstico uma grande dificuldade por ser uma forma paucibacilar e pela necessidade de procedimentos invasivos para sua confirmação, tais como toracocentese e biópsia pleural (Kang et al. 2012).

Desde 1882, quando o microbiologista alemão Robert Koch anunciou o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) como agente etiológico da tuberculose, muito se estudou sobre o bacilo (Keshavjee e Farmer 2012). Contudo, apesar de descobertas revolucionárias tais como a tuberculina em 1890, a vacina *Bacillus-Calmette Guérin* (BCG) em 1908, as drogas antituberculose a partir de 1943, e a descrição do genoma da micobactéria em 2006, a TB continua sendo a doença infecciosa mais letal do mundo (Fogel 2015, Keshavjee e Farmer 2012, WHO 2018).

Até o momento, a baciloscopia e cultura para micobactérias do líquido e fragmento pleural são os métodos considerados padrão ouro para diagnóstico. No entanto, além de sua baixa sensibilidade (Se), os resultados de culturas podem demandar até oito semanas para seu resultado. Como alternativa, a análise histopatológica do fragmento pleural com demonstração de granuloma com necrose caseosa tem sido usada, pesando-se as dificuldades e, por vezes, a contraindicação de sua realização seja por biópsia com agulha de Cope ou por toracoscopia (SBPT 2009). A dosagem de adenosina deaminase (ADA), desde a década de 70, constitui um importante aliado no diagnóstico da TBPI (Piras et al. 1978), contudo seus resultados positivos também podem ser encontrados em DP secundário à pneumonia, empiema, linfoma, neoplasia e doenças autoimune e por imunoglobulina G4 (Greco et al. 2003, Valdés et al. 1996). Por fim, com o advento dos testes moleculares não houve aumento

relevante no rendimento para o diagnóstico desta manifestação da doença (Lusiba et al. 2014, Maynard-Smith et al. 2014, Sehgal et al. 2016).

Este trabalho tem por objetivo identificar novas estratégias de diagnóstico da TBPI, seja através da utilização de exames convencionais e facilmente disponíveis, ou através da análise de biomarcadores pleurais envolvidos na imunopatogenia da doença pleural (Barnes et al. 1989, Fenniri et al. 2011).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Derrame pleural: Causas e abordagem diagnóstica

A entidade nosológica denominada derrame pleural (DP) é definida por um acúmulo de fluidos no espaço pleural, indicando um desequilíbrio entre a velocidade normal de produção e / ou de absorção do LP (Bhatnagar e Maskell 2015). Segundo dados de Light (2011), o DP afeta mais de 1,5 milhão de pessoas por ano nos Estados Unidos da América (EUA). No Brasil, não existem dados fidedignos sobre a frequência desta manifestação.

O acúmulo do LP em si não é considerado uma doença, mas sim o reflexo de alguma patologia subjacente responsável pelo desequilíbrio mencionado acima (Karkhanis e Joshi 2012). Sendo assim, sua fisiopatologia varia de acordo com a causa (Hooper et al. 2010).

É um problema médico relativamente comum e que inclui mais de 50 etiologias conhecidas, incluindo doenças pleuro-pulmonares, condições sistêmicas, disfunções orgânicas ou causas medicamentosas (Quadro 1) (Karkhanis e Joshi 2012). Insuficiência cardíaca, neoplasias, pneumonia e TBPI são responsáveis por três quartos de todos os casos (Porcel et al. 2014). Todavia, em cerca de 20% de pacientes com DP a causa permanece indefinida, a despeito de uma investigação adequada (Karkhanis e Joshi 2012), que deve incluir uma anamnese detalhada, associada a exames radiológicos, análise do LP e por vezes biópsia pleural (Hooper et al. 2010).

Quadro 1 - Causas de derrame pleural conforme a classificação pelos critérios de Light

Transudatos	Exsudatos			
	<i>Simples</i>	<i>Piotórax</i>	<i>Quilotórax</i>	<i>Hemotórax</i>
ICC Cirrose Ascite Síndrome nefrótica Urinotórax Diálise peritoneal	<u>Infecciosos</u> Tuberculose Parapneumônico Viral Parasitário	Empiema bacteriano Tuberculose Amebiano Fúngico	Pós cirurgia Neoplasia Trauma Congênito Filariose	Trauma Pós cirurgia Discrasia sanguínea
	<u>Neoplásicos</u> Primário Metastático			
	<u>Doenças autoimunes</u> Artrite reumatoide LES			
	<u>Imunológicos</u> Pós cirurgia cardíaca Sarcoidose Granulomatose com poliangeíte			
	<u>Gastrointestinal</u> Perfuração esofageana Pancreatite Infarto hepático Infarto esplênico			
	<u>Inflamatórios</u> Embolia pulmonar Asbesto Uremia Síndrome de Meigs			
	<u>Iatrogênicos</u> Esclerose esofageana Pós radioterapia Induzido por drogas			

Legenda: Insuficiência cardíaca congestiva (ICC), Lupus eritematoso sistêmico (LES).

Fonte: Adaptado de Saguil et al. 2014.

As dificuldades para se determinar a causa de um DP é uma realidade seja em locais da estrutura básica da saúde ou em centros terciários. Os pacientes podem se apresentar em diferentes momentos ao longo curso da doença de base e com sintomas variados, além da possibilidade de mais de uma causa coexistir para a formação do derrame (Bhatnagar e Maskell 2015).

A apresentação clínica do DP depende do volume do derrame, da velocidade de acúmulo do líquido, da presença de comorbidades e da reserva respiratória de cada paciente. De modo geral, os sinais e sintomas mais relatados são dispneia, tosse e dor torácica, normalmente de características pleuríticas (Saguil et al. 2014). O exame físico do tórax revela redução de murmúrio vesicular na ausculta e a macicez à percussão da parede torácica costuma ser uma técnica sensível e específica para identificar a presença de DP na dependência da experiência do examinador (Wong et al. 2009). A gravidade e a velocidade de instalação das manifestações clínicas determinarão a propedêutica a ser instituída (Bhatnagar e Maskell 2015).

Diante da suspeita de DP, a radiografia de tórax nas incidências pósterio-anterior e perfil devem ser os primeiros exames solicitados. A quantidade de fluido necessária para ser visualizada na radiografia em pósterio-anterior é de 200 mL, enquanto que a obliteração do ângulo costofrênico pode ser observado na incidência em perfil com volumes de aproximadamente 50 mL de LP (Blackmore et al. 1996). Quando a radiografia de tórax for inconclusiva, a tomografia computadorizada (TC) e a ultrassonografia (USG) podem ser úteis. A TC do tórax pode detectar derrames não aparentes na radiografia, distinguir entre líquido e espessamento pleural e fornecer pistas para a etiologia subjacente do DP, tais como massas, consolidações pneumônicas ou cavitações. A USG é útil para a quantificação do volume de líquido, na detecção de septações e para guiar a toracocentese, reduzindo a possibilidade de complicações relacionadas ao procedimento (Hooper et al. 2010). Recentemente, com o advento das tomografias computadorizadas com emissão de pósitrons, mais um exame radiológico pode ser utilizado na diferenciação de doenças benignas ou malignas da pleura, contudo, processos inflamatórios como artrite reumatoide e TB podem captar a glicose marcada e utilizada no exame, em virtude do metabolismo elevado dessas condições e falsear um resultado positivo (Orki et al. 2009).

O primeiro procedimento invasivo para a investigação da etiologia do DP é a toracocentese. Antes do procedimento, o paciente deve ser orientado sobre os riscos do mesmo, tais como dor, pneumotórax, hemotórax, hematoma de parede torácica e perfuração de órgãos adjacentes. O uso do USG para guiar o procedimento reduz em muito a possibilidade de complicações e é indicado sempre que possível (Gordon et al. 2010, Hooper et al. 2010). Durante o procedimento, a aspiração de um pequeno volume do LP (50 a 60 mL) é suficiente para a realização de exames que ajudarão na identificação da etiologia. A drenagem de volumes maiores deve ser reservada para o tratamento de sintomas relacionados ao derrame como dispneia. A radiografia de tórax pode ajudar na seleção do paciente a ser

submetido ao procedimento. Pacientes com DP sem diagnóstico definido e com nível hidroaéreo maior que 1 cm em uma radiografia de tórax em decúbito lateral devem ser submetidos à toracocentese diagnóstica (Porcel e Light 2006). Da mesma forma, um derrame com nível hidroaéreo maior que 5 cm no mesmo exame e em um paciente com pneumonia é indicação precisa de abordagem para a identificação de derrame parapneumônico ou empiema pleural que pode gerar resposta inadequada ao tratamento com antibióticos. Os pacientes com DP bilateral visualizado nas radiografias de tórax não devem ser submetidos a toracocentese, pois a manifestação de doença pleural bilateral sugere um derrame transudativo de possível causa sistêmica, de forma que a análise do LP pouco ajudaria no diagnóstico etiológico. A exceção deve ser para casos de evolução atípica como por exemplo, com febre, dor torácica pleurítica, derrames loculados, ou que não respondam ao tratamento (Porcel e Light 2006, Saguil et al. 2014).

A aparência macroscópica do LP pode sugerir algum diagnóstico, com destaque para os aspectos purulento, leitoso e hemorrágico, característicos de empiema, quilotórax ou pseudoquilotórax e hemotórax, respectivamente (Hooper et al. 2010).

O LP coletado deve ser submetido à análise bioquímica, citológica e microbiológica para o diagnóstico correto (Quadro 2). A primeira definição deve ser a diferenciação entre transudato e exsudato com base nos resultados do trabalho de Light (Light et al. 1972), mais tarde denominados internacionalmente como critérios de Light. Para que o derrame seja classificado como transudato devem ser obedecidos os três requisitos: proteína do líquido pleural / proteína sérica $< 0,5$, lactato desidrogenase (LDH) do líquido pleural / LDH sérico $< 0,6$ e LDH pleural $< 0,67 \times$ limite superior da normalidade do LDH sérico. Caso algum desses requisitos não seja obedecido o derrame é classificado como exsudativo (Light et al. 1972).

Quadro 2 – Exames realizados de rotina para investigação da etiologia do derrame pleural

Testes recomendados como rotina	Notas
Bioquímica LDH e Proteínas Glicose Amilase Colesterol e triglicerídeos	A coleta deve ser pareada com o sangue para a aplicação dos critérios de Light Valores reduzidos nos casos de artrite reumatoide e empiema Útil para casos de DP secundário à pancreatite, neoplasia ou ruptura esofageana Distinção entre quilotórax e pseudoquilotórax
Hematócrito	Valor Ht no líquido pleural > metade do valor Ht do sangue periférico indica hemotórax
Citometria global e específica	Definição de derrames neutrofilicos ou linfocíticos
pH	Indica a necessidade de drenagem nos casos parapneumônicos e empiema
Adenosina deaminase	Se > 40 UI/l indica TB, no entanto neoplasia, empiema, doenças autoimunes também poder dar resultados positivos
Análise microbiológica	Útil principalmente para casos de TB e derrames parapneumônicos / empiema
Citologia oncótica	Em casos de suspeita de neoplasia como etiologia do DP

Legenda: Lactato desidrogenase (LDH), Derrame pleural (DP), Hematócrito (Ht), Tuberculose (TB).
Fonte: Adaptado de Hooper et al. 2010.

De acordo com a revisão de Karkhanis e Joshi (2012), outros exames bioquímicos devem ser realizados no LP. Uma relação entre glicose no LP e glicemia sérica menor que 0,5 costuma ser encontrada em derrames pleurais exsudativos secundários a empiema, doença reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES), TB, neoplasia ou ruptura esofageana. Já o aumento da amilase pode ser visto em casos de doença pancreática, ruptura esofageana e neoplasias.

Com relação à citometria específica no LP, se o predomínio for de células mononucleares ou linfócitos (> 50% das células), os diagnósticos mais prováveis serão neoplasia e TB. A IC também é uma causa comum de derrame linfocítico, mas com celularidade baixa. Proporções muito elevadas de linfócitos (> 80%) ocorrem frequentemente na TB, nos linfomas, na doença reumatoide, na sarcoidose e nos derrames pleurais após cirurgias cardíacas. Os derrames com predomínio neutrofilico ou de células polimorfonucleares estão associados com processos agudos tais como efusões parapneumônicas, embolia pulmonar, TB em fase precoce e doença pleural associada ao amianto. Os derrames eosinofílicos, menos frequentes, são definidos pela presença de 10% ou mais de eosinófilos no LP. Pode ser o resultado de ar ou sangue na cavidade pleural ou

causados por lesão pleural induzida por drogas, derrame pleural associado à exposição ao amianto, síndrome de Churg-Strauss, infarto pulmonar e doenças parasitárias (Hooper et al. 2010).

Quando houver suspeita de neoplasia, a citologia oncótica do LP é uma maneira rápida e minimamente invasiva de se obter um diagnóstico, com uma sensibilidade média próxima de 60%, dependendo do preparo da amostra biológica, da experiência do patologista e do tipo histológico do tumor, sendo o rendimento diagnóstico maior para o adenocarcinoma. Atualmente, e após a divulgação das diretrizes britânicas para a investigação de derrames pleurais, os marcadores tumorais séricos e no LP, não têm papel na investigação de rotina dos derrames pleurais (Hooper et al. 2010).

No Brasil, a dosagem de ADA, enzima predominante no linfócito T ativado e que catalisa a conversão da adenosina em inosina (Piras et al. 1978), é uma grande aliada no diagnóstico da TBPI e deve ser solicitada na rotina de investigação tendo em vista a elevada prevalência da doença em nosso meio (Brasil 2013). Contudo, valores elevados da ADA também podem ser evidenciados em outras condições, tais como adenocarcinoma, linfoma, artrite reumatoide e empiema pleural de etiologia bacteriana, dificultando o diagnóstico diferencial (Greco et al. 2003, Valdés et al. 1996).

Tendo em vista as etiologias infecciosas como causas frequentes de DP, a análise microbiológica do LP incluindo pesquisas diretas e culturas para germes comuns, fungos e micobactérias são úteis no diagnóstico das etiologias infecciosas e devem ser solicitados de rotina (Hooper et al. 2010).

Caso não haja rendimento diagnóstico após a toracocentese e análise do LP, a biópsia pleural guiada por agulha ou através de procedimento cirúrgico pode ser indicada, sendo particularmente útil nos casos de neoplasia e nas doenças granulomatosas (Karkhanis e Joshi 2012, Saguil et al. 2014). Todavia, os riscos e benefícios devem ser analisados bem como as contraindicações para a realização de um procedimento mais invasivo (Sales e Onishi 2006).

Na busca de superar os desafios em diagnosticar a etiologia dos derrames pleurais, a dosagem de biomarcadores no LP tem sido uma constante na pesquisa científica, principalmente nos casos de TB e neoplasia, buscando simplificar as vias para o diagnóstico clínico e evitar métodos mais invasivos (Porcel 2018).

À luz do diagnóstico etiológico para a formação do DP, a melhor terapêutica pode ser instituída, por vezes sendo necessária a realização de drenagens torácicas cirúrgicas, pleurodese ou outros procedimentos tais como decorticação pleural, pleurectomia ou pleuropneumectomia (Karkhanis e Joshi 2012).

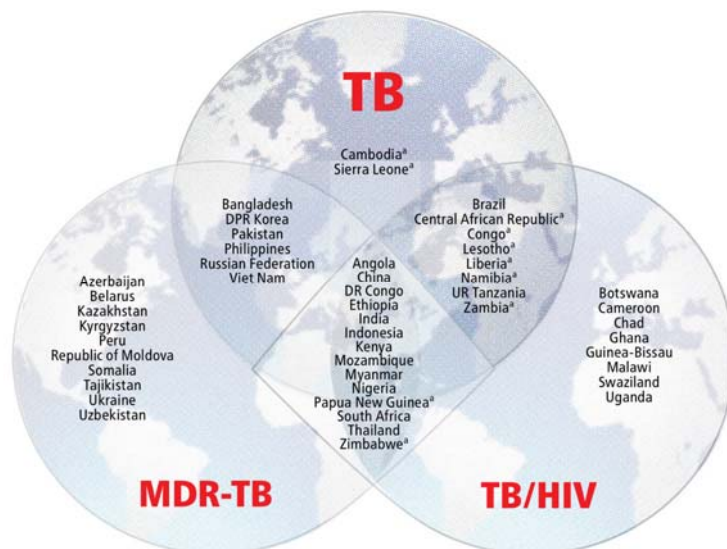
1.2 Tuberculose

1.2.1 Epidemiologia da tuberculose

A TB permanece como um grave problema de saúde pública, sendo a maior causa de morte por um único agente infeccioso isolado no mundo, superando a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO 2018). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2017 foram estimados 10 milhões de casos de TB e mais de um 1,6 milhão de mortes decorrentes da doença (WHO 2018). Estima-se que cerca de 13% dos casos estivessem coinfectados pelo HIV (WHO 2018). O Sudeste da Ásia e a costa ocidental do Pacífico contabilizaram 44% e 18% dos casos de TB mundial, respectivamente. A África, por sua vez, representa um quarto dos casos da doença e as maiores taxas de incidência e mortalidade (WHO 2018).

O método atual da OMS para ilustrar o impacto epidemiológico da TB utiliza conjuntos contendo os países mais afetados pela doença no mundo. Cada conjunto, com os 30 países com maior número absoluto de casos incidentes e com maiores taxas de incidência *per capita*, se dividem em TB geral, TB multirresistente (TBMR) e coinfeção TB/HIV. Quatorze países estão contidos nas três listas. O Brasil ocupa posição de destaque entre os países que sofrem maior impacto da TB em números absolutos e da coinfeção TB/HIV (Figura 1) (WHO 2018).

Figura 1 - Conjuntos de países com maior impacto de tuberculose, tuberculose/HIV e tuberculose multirresistente



Legenda: Tuberculose (TB), *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), Tuberculose multirresistente (MDR-TB).
Fonte: WHO 2018.

Em 2017, foram diagnosticados 69.569 casos de TB no território brasileiro, com um coeficiente de incidência de 33,5/100 mil habitantes e taxa de mortalidade de 2,1/100 mil habitantes. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), nosso país apresenta valores de incidência muito heterogêneos entre as Unidades da Federação, variando de 9,5 a 74,1/100 mil habitantes, no Tocantins e Amazonas, respectivamente (Brasil 2018).

Particularmente, no Estado do Rio de Janeiro, onde o presente estudo foi realizado, a taxa de incidência da doença foi de 63,5/100.000 habitantes em 2017, superando a média nacional do mesmo ano. No município do Rio de Janeiro, a taxa registrada foi de 88,5/100.000 habitantes no mesmo ano (Brasil 2018).

A despeito das inúmeras etiologias para a formação de DP, a TB é considerada uma das principais causas desta entidade nosológica em vários países (Liu et al. 2016, Morimoto et al. 2006). Apesar de ser uma forma não transmissível da doença quando manifestada de forma isolada, a TBPI pode acarretar morbidades graves secundárias às sequelas pleurais bem como progressão da doença e até mesmo a morte, quando não diagnosticada e tratada adequadamente.

Os dados epidemiológicos sobre a TBPI são variáveis, de modo que a doença alterna entre primeira e segunda posição em termos de frequência de manifestação EP da TB com a forma linfonodal (Gomes et al. 2014, Peto et al. 2009). De modo geral, a pleurite tuberculosa é responsável por cerca de 5% do total de casos de TB (Gopi et al. 2006, Liu et al. 2016, Porcel 2016).

No Brasil, a manifestação pleural é a mais comum entre formas EP nos indivíduos HIV negativos (SBPT 2009). Segundo dados de Seiscento (Seiscento et al. 2009), as formas extrapulmonares da TB contabilizaram 17,8% do total de casos no estado de São Paulo entre 1998 e 2005, sendo a forma pleural a mais referida entre essas (48,7%), com uma incidência de 3,8% no ano de 2005. Um levantamento mais recente realizado no Estado de Roraima, revelou que a taxa de incidência de TBPI em 2013 foi de 3,41/100 mil habitantes (Machado et al. 2016). Em ambos os estudos, houve predomínio da doença no gênero masculino e na faixa etária entre 30-59 anos (Machado et al. 2016, Seiscento et al. 2009). Apesar de o RJ ser a segunda Unidade da Federação com maior coeficiente de incidência da doença, não existem dados epidemiológicos sobre a frequência da TBPI em nosso Estado.

1.2.2 A bacteriologia da tuberculose

O *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da TB, tem características marcantes, diferentes de outras bactérias que lhe dão vantagens para sua prevalência no mundo. Junto com as espécies *M. bovis* (incluindo *M. bovis* BCG), *M. africanum* e *M. microtti* e as subespécies *M. tuberculosis* subs. *canetti* e *M. tuberculosis* subs. *caprae*, constituem o Complexo *M. tuberculosis*, que são geneticamente semelhantes, apresentando mais de 95% de homologia no DNA. O Mtb se diferencia das outras espécies por possuir regiões genéticas que foram perdidas pelos outros membros do Complexo (Pfyffer et al. 2003, Vincent et al. 2003).

As bactérias do Complexo Mtb apresentam-se como bacilos medindo 0,2 a 0,6 mm de diâmetro e 1 a 10 mm de comprimento. São não formadoras de esporos, sem flagelos, não produtoras de toxinas, aeróbios estritos e intracelulares facultativos. Possuem um longo período de geração e de duplicação, dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes, do pH do meio e de uma temperatura ótima (35-37°C) (Kritski et al. 2005, Pfyffer et al. 2003, Vincent et al. 2003).

Uma característica importante da espécie é o agrupamento dos bacilos formando ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas e que caracterizam o fator corda. A morfologia das colônias tem aspecto seco, rugoso, acamurçado, sem produção de pigmento, apresentando-se com coloração creme no crescimento em meio sólido de cultura Löwenstein-Jensen (LJ) (Pfyffer et al. 2003).

A álcool-ácido resistência [propriedade utilizada na coloração de Ziehl-Neelsen (ZN)] (revisto por Kritski et al. 2005) é uma característica decorrente da composição da parede celular do Mtb, constituída principalmente por lipídios, formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação, à descoloração por álcool-ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos (Pfyffer et al. 2003). Esta barreira hidrofóbica compreende a membrana citoplasmática, considerada um esqueleto rígido da parede celular, e um conjunto de componentes ligados de maneira não covalente a este esqueleto e que formam a camada externa ou cápsula (Kritski et al. 2005). A composição da membrana citoplasmática, rica em lipídios, tais como ácidos graxos de cadeia ramificada, ácido micólico e lipoarabinomana, configura um dos principais mecanismos de defesa do Mtb contra a resposta imune do hospedeiro (Zhai et al. 2019) e também é responsável por efeitos biológicos como a formação do granuloma (ácidos micólicos) e indução de necrose caseosa (fosfolipídios) (Pfyffer et al. 2003).

O genoma do Mtb tem 4,4 Mb, e sequência completa da cepa de referência de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foi publicada em 1998 (Cole et al. 1998). Nessa sequência original, os autores identificaram 3974 genes, sendo 3924 genes codificadores de proteínas e 50 codificadores de RNA. Posteriormente, novos trabalhos aperfeiçoaram o estudo o genoma, identificando a função de inúmeras proteínas. Atualmente, é possível estabelecer a função de 2058 proteínas, o que corresponde a 52% do proteoma. Cerca de 400 proteínas não mostram similaridades àquelas presentes em outros organismos e, desse modo, podem ser específicas do Mtb. Aproximadamente 170 genes codificam famílias de proteínas envolvidas em sua variação antigênica, enquanto cerca de 200 codificam enzimas para o metabolismo de ácidos graxos. Essa capacidade codificadora direcionada à produção de enzimas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos parece refletir a dependência da micobactéria na degradação de lipídios do hospedeiro, o que, em última análise, tem o objetivo de obter nutrientes e precursores de constituintes da sua parede (Vincent et al. 2003).

A infectividade do Mtb, além de também estar relacionada com a sua parede lipídica complexa, se relaciona igualmente com o catabolismo do colesterol, que é fonte de energia e matéria para a síntese de lipídios da própria parede celular, com as proteínas e lipoproteínas

do envelope micobacteriano responsáveis pela aderência bacteriana nas células do hospedeiro, com as proteínas que inibem a resposta antimicrobiana dos macrófagos pela resistência a compostos tóxicos do hospedeiro, com o controle do mecanismo de apoptose e com o controle da progressão e transformação dos fagossomos em fagolisossomos, além de fatores que controlam e regulam a expressão genética em situações de diferente atividade do patógeno (Forreled et al. 2013).

Entre as proteínas mencionadas acima, o alvo antigênico secretor precoce ou *early secretory antigenic target* (ESAT)-6 e a cultura de filtrado proteico ou *culture filtrate protein* (CFP)-10 são encontrados de forma abundante nos filtrados de culturas de micobactérias e são considerados as moléculas mais imunogênicas deste produto, sendo capazes de modular respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro. Juntos formam um dímero firme e são dependentes entre si para sua estabilidade e secreção (Andersen et al. 1995, Dillon et al. 2000).

Ambos os antígenos são reconhecidos *in vivo* e *in vitro* como substrato na indução de respostas de hipersensibilidade do tipo tardio e na capacidade de induzir a produção de citocinas e quimiocinas pelos linfócitos incluindo o interferon gama (IFN- γ), sendo os antígenos específicos do Mtb utilizados como base para os ensaios de liberação de interferon gama (IGRA, do inglês *interferon gamma release assay*), aplicados no sangue periférico para o diagnóstico de infecção pelo Mtb (Pinxteren et al. 2000).

1.2.3 Aspectos imunológicos da tuberculose

A transmissão do Mtb se dá preferencialmente por via respiratória entre os indivíduos doentes e os sadios através de aerossóis contendo partículas infectantes com um a dois bacilos (núcleos de Wells), e que são eliminados através da tosse. Este método é um meio muito efetivo de disseminação de doença (Cruz-Knight e Blake-Gums 2013), o que, associado aos aglomerados humanos – famílias, escolas, favelas, prisões, hospitais e abrigos – favorecem a propagação do bacilo (Abrahão et al. 2006, Brito et al. 2004, Mendes et al. 2007).

Após a inalação dos núcleos de Wells pelos indivíduos sadios, o Mtb é capaz de atingir bronquíolos e alvéolos e iniciar sua multiplicação. No alvéolo, o Mtb é fagocitado pelos macrófagos alveolares. Contudo, outras células fagocíticas, incluindo neutrófilos, macrófagos derivados de monócitos e células dendríticas, também participam deste processo.

Vários receptores existentes na superfície dessas células fagocíticas se ligam à micobactéria através do reconhecimento de antígenos específicos seguido pela fagocitose do bacilo (Philips e Ernst 2012).

Após a fagocitose, o macrófago alveolar secreta interleucinas (IL) 1 e 2, que sensibilizarão a célula T auxiliar CD4 tipo 1 (Th1), considerada a célula efetora mais importante da imunidade adquirida contra o bacilo (Scharma et al. 2005), e os linfócitos *natural killer* (NK) a secretar citocinas e quimiocinas que ativarão os próprios macrófagos a produzirem radicais de oxigênio e nitrogênio, responsáveis pela destruição ou inibição do crescimento do Mtb, IL-12 que estimula a produção de mais linfócitos CD4 Th1, bem como o fator de necrose tumoral (TNF) que desempenha papel fundamental na formação do granuloma (Rosemberg e Tarantino 2002).

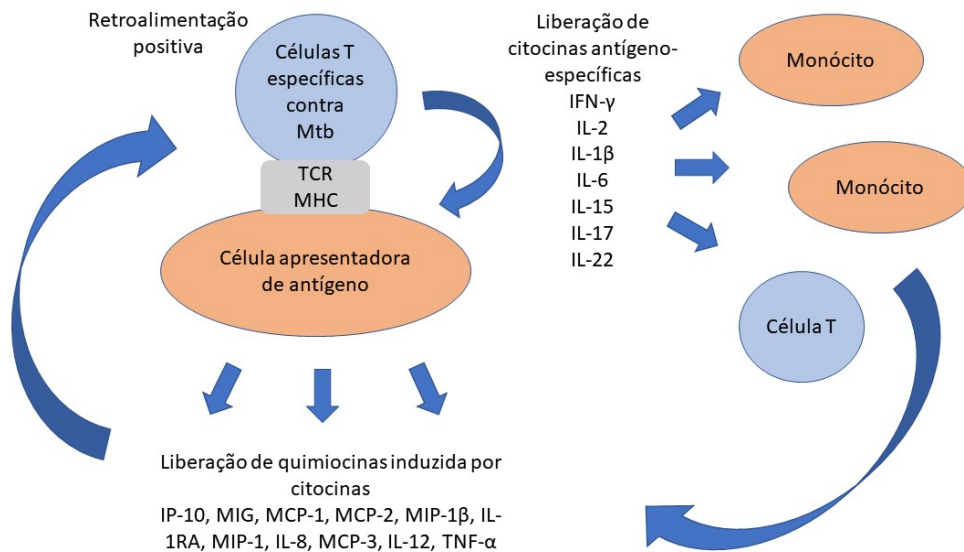
O granuloma é a marca registrada da infecção pelo Mtb e, portanto, está no centro da imunopatogenia da doença. Esta “unidade fundamental” é um agregado compacto e organizado de células representadas por macrófagos, células epitelióides (macrófagos exclusivamente diferenciados) e células gigantes multinucleadas (células de Langherans) envolvidas por um anel de linfócitos (McAdam et al. 2016). A principal função do granuloma é localizar e conter o Mtb enquanto concentra a resposta imune a uma área limitada. No entanto, a contenção completa não ocorre, uma vez que o bacilo tem suas próprias estratégias para persistir dentro desta estrutura. A TB pode resultar da progressão precoce de um granuloma primário durante o processo de infecção ou da reativação de um granuloma estabelecido em uma pessoa infectada de forma latente. Assim, os granulomas contendo o Mtb podem ser descritos como um campo de batalha entre o bacilo e a resposta imune do hospedeiro (Guirado e Schlesinger 2013).

Entre as citocinas e quimiocinas que alimentam o processo inflamatório da TB atraindo mais linfócitos CD4 Th1 estão o IFN- γ e a proteína indutora do interferon gama kD-10, do inglês *inducible protein of interferon gamma kD-10* (IP-10). O IFN- γ é a principal molécula ativadora de macrófagos, a citocina-chave para o controle da infecção, no entanto, sozinha, é insuficiente para tal (Cooper et al. 2002). Além da ativação dos macrófagos, o IFN- γ estimula a produção de óxido nítrico sintetase, responsável pelos altos níveis de óxido nítrico e outros radicais intermediários do nitrogênio, que são bactericidas e que participam da resistência à infecção pelo Mtb (Moutinho 2011).

O IP-10 é secretado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) a partir da indução das citocinas liberadas pelos linfócitos T, inclusive IFN- γ , após o reconhecimento do peptídeo antigênico específico na superfície das APC. A liberação de TNF pelas APCs, em

ação sinérgica com os interferons, também estimulam a liberação maior de IP-10, o qual amplifica a ação do IFN- γ e seu efeito nos macrófagos (Ruhwald et al. 2012). Em virtude das diferentes vias de estímulo para a liberação do IP-10 e sua expressão em quantidade muito maiores em pacientes com TB ativa (Ruhwald et al. 2012), este marcador vem sendo considerado uma alternativa entre os métodos diagnósticos para a tuberculose (Lalvani e Pareek 2010, Walzl et al. 2011).

Figura 2 - Resumo esquemático de células-chave e citocinas envolvidas na resposta imune para antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* em testes de imunodiagnóstico



Legenda: Interferon gama (IFN- γ), Interleucina (IL), Receptor de células (TCR), Complexo principal de histocompatibilidade (MHC), Proteína indutora do IFN- γ 10-kD (IP-10), Monoquina induzida por IFN- γ (MIG), Proteína quimiotática de monócitos (MCP), Proteína inflamatória de macrófagos (MIP), Antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), Fator de necrose tumoral (TNF).

Fonte: Adaptada de Chegou et al. 2009.

Aproximadamente de 20 a 40 dias após o controle da infecção, os linfócitos CD4 Th1 iniciam a produção de IL-4, responsáveis pela resposta linfocitária do tipo T *helper* 2 (Th2), com o objetivo de inibir os mecanismos da imunidade celular e controlar o processo, ajudando

na resolução da inflamação. Quando surge algum sinal de que o bacilo vai prevalecer sobre os macrófagos, a própria IL-2 estimula os linfócitos CD8, os quais são citotóxicos, e que induzem à apoptose ou morte celular programada. Nos casos em que o predomínio da resposta é de linfócitos CD4 Th2, ocorre a produção de IL-4, IL-5 e IL-10, envolvidas na produção de imunoglobulina E (IgE), no recrutamento de eosinófilos e na inibição de linfócitos Th1 e NK, com consequente imunidade lesiva e evolução para a doença (Dunlap et al. 2000, Hopewell et al. 2005).

Quando os bacilos são contidos ou destruídos pelo processo inflamatório desencadeado, geralmente não são observadas manifestações clínicas ou radiológicas. Por outro lado, um processo inflamatório exacerbado pode resultar em uma broncopneumonia inespecífica seguida de encapsulamento do bacilo e formação do granuloma pulmonar ou foco de Gohn (Lin e Flynn 2018). A partir deste foco pulmonar, ocorre a disseminação linfática para linfonodos regionais (foco linfonodal) e hematogênica. No momento em que ocorre a disseminação hematogênica, o organismo já desenvolveu a imunidade adquirida, impedindo a evolução para forma ativa da doença, ocasionando a fibrose ou calcificação dos granulomas e encerrando a primo-infecção. Essa evolução ocorre em 90-95% dos casos. No entanto, nos 5-10% dos casos restantes, a primo-infecção não é contida, seja pela deficiência da imunidade celular, pela carga infectante inalada ou pela virulência da cepa aspirada. Nestes casos, ocorre a liquefação do cáseo e desenvolvimento da doença, chamada tuberculose primária (Cadena et al. 2017).

Quando o indivíduo desenvolve a tuberculose tardiamente após a primo-infecção, ele desenvolve uma lesão mais circunscrita e de evolução mais arrastada. A origem desta forma da doença, chamada tuberculose secundária, pode ser a partir da reativação de focos em inatividade metabólica - TB latente - chamado de reativação endógena, ou a partir de uma nova contaminação, chamada reinfecção exógena (Dunlap et al. 2000, Kritski et al. 2005).

Tendo em vista ser o pulmão a porta de entrada do Mtb no organismo sadio, a forma pulmonar é a mais frequente em termos de apresentação clínica (Cruz-Knight e Blake-Gumbs 2013). A disseminação hematogênica resulta nas formas EP e disseminadas da doença (Dunlap et al. 2000, Kritski et al. 2005). A maioria das formas extrapulmonares quase sempre apresenta instalação insidiosa, evolução lenta e com lesões pobres em bacilos, isto é, paucibacilares (Zumla et al. 2013).

A TBPI é historicamente considerada uma manifestação primária da tuberculose, resultado da disseminação hematogênica ou linfática de um foco pulmonar inicial (Seiscento et al. 2006). A forma secundária ocorre anos depois da primeira infecção e é considerada

como consequência da reativação de um foco pulmonar subpleural o qual contamina o espaço pleural desencadeando uma resposta imunológica local (Liam et al. 1999, Porcel 2016).

Conforme revisto por Vorster (2015), após a contaminação, seja primária ou secundária, em primeiro momento há o aumento de neutrófilos na cavidade pleural perdurando pelas primeiras 24 horas, seguido do recrutamento de macrófagos, que atingem o pico em cerca de 96 horas, e a seguir os linfócitos. A participação inicial de neutrófilos seria uma resposta específica à presença do Mtb no espaço pleural e, por si próprio ou por sua interação com o macrófago, realizaria a fagocitose seguida da morte do bacilo através de um armamentário antimicrobiano representado por peptídeos antimicrobianos, radicais livres de oxigênio e diferentes enzimas hidrolíticas que são armazenadas em diferentes grânulos presentes neste tipo celular (Dallenga e Schaible 2016). Nos estágios tardios da infecção pelo Mtb, a participação dos neutrófilos seria deletéria e representada por células disfuncionantes e imaturas levando à multiplicação do Mtb, destruição tissular e progressão da doença, conforme descrito na revisão de Lyadova (2017).

Assim como ocorre na imunopatogenia da TB pulmonar, onde os macrófagos alveolares fagocitam o Mtb (Scharma et al. 2005), na manifestação pleural, o bacilo é fagocitado pelos macrófagos presentes no espaço pleural e a partir da secreção de IL-1 e IL-2, atraem células CD4 Th1.

Conforme demonstrado por Wilkinson (2005), as células T efetoras encontram-se em valor 15 vezes maior no líquido pleural do que no sangue periférico de pacientes com TBPI, o que não ocorre em pacientes com outras doenças pleurais que não a tuberculose. Esses linfócitos T, ao serem atraídos para o espaço pleural, secretam IFN- γ além de outras citocinas e quimiocinas da resposta imune celular tipo1, incluindo o IP-10 (Guyot-Revol et al. 2006, Vorster et al. 2015, Walrath et al. 2005), as quais amplificam o processo de defesa contra o Mtb a partir do recrutamento da população celular envolvida na resposta inflamatória com ativação de mais linfócitos T CD4 de memória efetora e mais células produtoras de IFN- γ , TNF, proteína inflamatória do macrófago alfa 1 (MIP-1 α) e IL-2, simultaneamente (Fenniri et al. 2011).

Além de todo esse processo, sabe-se que a resposta inflamatória local possui ação direta nas células mesoteliais e no endotélio vascular, bem como apresentam grande participação dos processos de reparação tecidual e fibrose ocasionando o comprometimento funcional da pleural e dos pulmões (Ducati et al. 2006).

1.2.4 Métodos diagnósticos para a tuberculose

Além das manifestações clínicas clássicas - astenia, hiporexia, perda ponderal, febre e tosse – e dos achados radiológicos que podem ser encontrados na forma pulmonar, os métodos laboratoriais são essenciais para o correto diagnóstico da TB (Jacobson 2017).

A baciloscopia permite a identificação de bacilos álcool-ácido resistentes em amostras clínicas e pode ser realizada através de várias técnicas, sendo a de ZN a mais utilizada em nosso meio. Para que a baciloscopia direta seja positiva a partir desse método é necessário a presença de pelo menos 5000 a 10000 bacilos/mL na amostra (Kritski et al. 2005).

A cultura para micobactérias é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da TB. Apesar disso, um grande desafio operacional é o tempo de latência até que os resultados em meios sólidos LJ estejam disponíveis. Os meios líquidos (*Mycobacterial Growth In Tube*®) tem um tempo mediano mais curto para a positividade tanto para casos com baciloscopia positiva (7 *versus* 14 dias) como para aqueles com este resultado negativo (14 *versus* 25 dias) (Chihota et al. 2010).

As ferramentas de diagnóstico molecular para TB evoluíram rapidamente com inovações que podem proporcionar oportunidades para o diagnóstico rápido, sensível e específico do Mtb em amostras clínicas, bem como o seu perfil de sensibilidade às drogas. Os métodos de microscopia e cultura não podem ser substituídos, porém os ensaios moleculares podem ser aplicados em paralelo para acelerar o diagnóstico da TB (Scharma et al. 2015). O Xpert MTB / RIF® é um teste molecular que utiliza um cartucho descartável na plataforma GeneXpert e através de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) detecta simultaneamente a presença do bacilo e possível resistência à rifampicina, sendo capaz de liberar os resultados dentro de duas horas. O teste tem especificidade (Sp) de 99% e Se de 98% em amostras com baciloscopia positiva e Sp de 99% e Se de 67% em amostras com baciloscopia negativa (Steingart et al. 2014). O *GenoType Mycobacterium*® (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha) inclui uma técnica de PCR multiplex, seguida por hibridação reversa e tecnologia de *line probe assay*. Estes testes são rápidos, fáceis de executar e de interpretar e permitem que laboratórios clínicos de micobacteriologia detectem espécies micobacterianas pouco frequentes, sem a necessidade de técnicas sofisticadas. Com base em evidências e opiniões de especialistas, a OMS endossou o uso deste método para triagem rápida de pacientes com risco de TB droga resistente (Ling et al. 2008).

Nas manifestações extrapulmonares, a análise histopatológica de uma amostra do local acometido pode ser útil para o diagnóstico. A identificação de granuloma caseoso na amostra é sugestivo de TB, mas não definitivo, tendo em vista a possibilidade de diagnóstico diferencial com outras doenças granulomatosas tais como sarcoidose, granulomatose com poliangéite, histoplasmose etc. (Zumla e James 1996).

A dosagem da ADA, é uma grande aliada no diagnóstico de algumas formas de TB extrapulmonar tais como a pleural, pericárdica, peritoneal e meningoencefálica (Gopi et al. 2007). Contudo, valores elevados da ADA também podem ser evidenciados em determinadas condições, tais como, adenocarcinoma, linfoma, artrite reumatoide e empiema pleural de etiologia bacteriana, dificultando o diagnóstico diferencial (Greco et al. 2003, Valdés et al. 1996).

1.2.5 Diagnóstico da tuberculose pleural na prática clínica

O derrame pleural de etiologia tuberculosa pode involuir e ser absorvido espontaneamente sem o tratamento adequado, mas frequentemente esses casos podem se manifestar como TB ativa mais tarde (Vorster et al. 2015). Nos casos de evolução para doença, a dor torácica é o sintoma mais comum e é decorrente da irritação da pleura a partir do processo inflamatório. Astenia, emagrecimento, anorexia, febre e tosse são frequentemente registrados (Kritski et al. 2005, Porcel 2009, Vorster et al. 2015). Os exames radiológicos revelam DP normalmente livre, pequeno a moderado e unilateral (Valdés et al. 1998). A USG de tórax é considerada como um dos métodos radiológicos não só para diagnóstico, mas também para guiar procedimentos invasivos. O aspecto ultrassonográfico do LP pode ser anecóico ou complexo, sendo este septado ou não (Koegelenberg e Diacon 2013). A TC do tórax é mais sensível para a identificação de alterações parenquimatosas pulmonares e também pode ser utilizada como guia para procedimentos invasivos (Ko et al. 2014).

Empiema tuberculoso pleural é uma complicação menos comum, podendo ocorrer de forma secundária à progressão da doença pleural primária, disseminação linfática ou hematogênica ou após pneumectomia. Em geral, os casos de empiema pleural após intervenção cirúrgica de decorticação pleural e drenagem torácica prolongada deixam sequelas significativas, com espessamento pleural e eventualmente calcificação (Sonmezoglu et al. 2008).

A fibrose pleural como consequência da TB pleural ou do empiema tuberculoso confere implicações clínicas importantes e crônicas, determinando morbidades significativas tais como dor torácica crônica, dispneia e disfunção funcional respiratória (Light 2010).

Para o diagnóstico adequado, os pacientes são submetidos à toracocentese para coleta do LP. Quando possível também é realizada a biópsia da pleura utilizando a agulha de Cope ou através de toracoscopia. No entanto, em virtude dos chados histopatológicos aumentar a possibilidade de rendimento do diagnóstico, o procedimento muitas vezes é limitado por distúrbios de coagulação, quantidade pequena de LP, dificuldade de cooperação e/ou recusa do paciente para realização de procedimentos mais invasivos (Lee et al. 2009, Liu et al. 2013).

Um DP exsudativo é a regra para os casos de TBPI com níveis de proteínas e LDH atingindo valores maiores que 3,0 g/dL e 500 UI/L, respectivamente, conforme a revisão de Karkhanis e Joshi (2012). Associa-se à identificação de um exsudato, a predominância de células de origem linfocítica, no entanto, a análise do LP realizada no início do curso da doença pode revelar predomínio neutrofílico (Diacon et al. 2003).

Dosagens de ADA acima de 40 UI/L (método de Giusti, 1974) são indicativos de TBPI quando associadas com a identificação de um exsudato linfocítico no LP (SBPT 2009). Além disso, existe uma gama de valores de corte usados por diversos autores, mas na maioria dos estudos o *cut-off* mais descrito para a definição de TB ficou entre 40 e 60 UI/L (Arnold et al. 2015, Gupta et al. 2010, Helmy et al. 2012, Pérez-Rodriguez e Jimenez 2000). Discussões a respeito de diferentes pontos de corte da ADA além de sua variabilidade de acordo com idade, grau de imunidade e localização geográfica podem prejudicar o juízo sobre seu real valor como método diagnóstico (Abrao et al. 2014, Arnold et al. 2015, Baganha et al. 1990, Gupta et al. 2010, Helmy et al. 2012, Keng et al. 2013, Lee et al. 2014, Niwa et al. 1985, Pérez-Rodriguez e Jimenez 2000, Tay e Tee 2013).

Com relação à análise microbiológica do material coletado, o rendimento da baciloscopia pela técnica de ZN do LP se aproxima de zero, com sensibilidade máxima de 10%. A exceção pode ocorrer em pacientes HIV soropositivos (Marjani et al. 2016) e nos casos de empiema tuberculoso (Gopi et al. 2007), onde o exame direto pode atingir sensibilidade acima de 20%. O rendimento da cultura para micobactérias, realizada através de meios sólidos ou líquidos, está em torno de 1/3 dos casos para o LP e 2/3 dos casos, quando a cultura é realizada, no fragmento pleural (Kritski et al. 2005, SBPT 2009). Contudo, a utilização de meios líquidos para o cultivo do Mtb no LP pode atingir valores de 70% em algumas populações (Vorster et al. 2015).

Em virtude da própria patogenia da TBPI, e por ser a pleurite tuberculosa na grande maioria das vezes uma manifestação paucibacilar, os métodos moleculares para esta manifestação da TB não apresentam bons rendimentos (Gopi et al. 2009, Lusiba et al. 2014, Scharma et al. 2005, Sehgal et al. 2016). De acordo com a revisão sistemática de Maynard-Smith e colaboradores (2014), a Se média do Xpert MTB/RIF® no LP foi de 37%.

Na ausência de diagnóstico bacteriológico, nos pacientes com manifestações clínicas compatíveis e em local de alta prevalência de TB, o achado histopatológico de granuloma contendo necrose caseosa com ou sem bacilos na pleura deve ser considerado no diagnóstico diferencial a TBPI (Diacon et al. 2003, Gopi et al. 2007).

1.3 Novos métodos imunológicos para o diagnóstico da TBPI

A dosagem de uma série de biomarcadores no LP tem sido proposta como um método auxiliar para o diagnóstico de TBPI (Fenniri et al. 2011, Nemeth et al. 2009, Okamoto et al. 2005, Shimokata et al. 1991). Entre eles, além da ADA, já consagrada para este fim, o IFN- γ , a IL-27, a IL-12p40, a IL-18 e o receptor de interleucina-2 solúvel, detecção de lipoarabinomanana apresentam-se em níveis significativamente maiores em pacientes com TBPI do que naqueles não TB (Boehme et al. 2005, Dedha et al. 2009, Hiraki et al. 2004, Okamoto et al. 2005, Wong 2005). Segundo Porcel (2018), somente dois deles poderiam ser comparados ao ADA em termos de acurácia diagnóstica: IFN- γ e IL-27, ambos mensurados através de técnicas de imunoensaio.

O IFN- γ em seus níveis basais e dosado diretamente no LP já foi validado para a identificação de derrame pleural tuberculoso. Apesar destas evidências, o teste ainda não é amplamente disponível na prática clínica e dados sobre falsos positivos e negativos por poder ser encontrado em outras condições precisam ser mais estudados. Além disso, esta técnica apresenta limitações relacionadas ao custo financeiro e à ausência de pontos de corte padronizados para seu uso na prática clínica (Meldau et al. 2014, Porcel 2016, Porcel 2018, Vorster et al. 2015, Wongtim et al. 1999).

A dosagem de IL-27, mediadora da produção de IFN- γ e da resposta de linfócitos CD4 Th1, mostra-se ser útil para a diferenciação entre os DP por TB e aqueles de outras etiologias (Skouras et al. 2015, Valdés et al. 2014, Yang et al. 2012), porém apresenta as mesmas limitações que o IFN- γ (Porcel 2018).

O IP-10, apesar de não selecionado por Porcel (2018) em sua revisão, também tem sido alvo de pesquisas com o intuito de mostrar sua utilidade para o diagnóstico da TBPI baseado em sua participação na imunopatogenia da doença (Dheda et al. 2009, Klimiuk et al. 2015, Supriya et al. 2008, Sutherland et al. 2012, Sutherland et al. 2016, Yang et al. 2014).

A partir do reconhecimento do IFN- γ desempenhando papel central na regulação da resposta imune celular contra o Mtb, os testes de liberação de IFN passaram a ser estudados como um novo método para diagnóstico da infecção tuberculosa no sangue periférico (Lalvani 2007). Os mais recentes IGRAs acessam a resposta de linfócitos à peptídeos sintéticos, que representam proteínas específicas do Mtb, o ESAT-6 e o CFP-10, e que estão ausentes na vacina BCG e na maioria das micobactérias não tuberculosas (Lalvani 2007, Pai et al. 2004). No Brasil, o Programa Nacional de Controle de Tuberculose (PNCT) do país não padronizou o teste para ser usado de forma rotineira em virtude dos custos, embora tenha autorizado o seu uso para o diagnóstico da TB latente.

O QuantiFERON-TB Gold In-Tube test® (QTF-GIT) (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Austrália) utiliza tubos para coleta do sangue já revestidos com o material de controle, uma mistura de antígenos denominada mitógenos, e os antígenos específicos do Mtb. Este último armazena antígenos que consistem numa mistura de 14 peptídeos representando as sequências de aminoácidos do ESAT-6 e do CFP-10. Os outros dois tubos que fazem parte do kit funcionam como um controle negativo e um controle positivo (tubo com mitógenos). Um mililitro de sangue é coletado em cada um dos três tubos, misturado com os reagentes e incubados por 16-24 horas. O plasma é então separado em cada uma das amostras e a concentração de IFN- γ é determinada usando o ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para a interpretação do QTF-GIT, a resposta positiva para TB é calculada a partir da diferença de concentração de IFN do plasma estimulado pelo conjunto de antígenos e a concentração de IFN- γ no plasma incubado sem o antígeno (CDC 2010).

Em 2017, foi liberado para uso o QuantiFERON-TB Gold Plus (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Austrália), cuja diferença em relação à versão anterior é a possibilidade de também medir a resposta imune mediada por células T CD8 +, garantindo um rendimento igual ou melhor que o QTF-GIT (Petruccioli et al. 2017).

O T-Spot.TB (Oxford Immunotec Limited, Abingdon, United Kingdom), outro IGRA aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), mede a quantidade de células sanguíneas mononucleares periféricas que são incubadas com materiais de controle e duas misturas de peptídeos, uma contendo ESAT-6 e outra contendo CFP-10. O teste *enzyme-*

linked immunospot assay (ELISPOT) é utilizado para detectar o aumento no número das células mononucleares que produzirem IFN- γ após a estimulação pelos antígenos e comparar com o controle (CDC 2010).

A aplicação do IGRA no LP com base na premissa de um maior número de células T efectoras na cavidade pleural no momento da TB ativa, tem revelado resultados conflitantes (Aggarwal et al. 2015, Dheda et al. 2009, Lee et al. 2009, Li et al. 2015, Losi et al. 2007, Pang et al. 2015). A rede de tuberculose europeia, denominada *European Tuberculosis Network* (TBNET), publicou um estudo em 2007, onde o T-Spot.TB foi utilizado na análise do LP de pacientes com derrame pleural exsudativo unilateral e com quadro clínico compatível com o diagnóstico de TBPI num cenário com baixa prevalência da doença. O exame revelou valores de Se e Sp de 95% e 76%, respectivamente, e sugeriu estudos maiores em países com elevada prevalência da doença (Losi et al. 2007).

1.4 A aplicação de métodos estatísticos no diagnóstico da tuberculose pleural

Novas alternativas para o diagnóstico da TBPI tem sido estudados, com base na combinação de dados clínicos, epidemiológicos e resultados de exames e usando modelos estatísticos com intuito de superar as limitações dos métodos tradicionais e convencionais para o diagnóstico da doença, tais como o baixo rendimento dos exames microbiológicos aplicados no líquido ou fragmento pleural e a necessidade de procedimentos invasivos para a biópsia pleural,. Esses modelos podem ser vistos como sistemas de apoio à decisão (SAD) que é tomada pelo um médico. Com a ajuda destes SAD e de ferramentas da inteligência computacional, é possível melhorar as tarefas de diagnóstico, assim como administrar mais eficientemente as políticas de saúde pública (Adnan et al. 2012, Bright et al. 2012, Canõn 2015). Os modelos estatísticos propostos para estas tarefas incluem sistemas de pontuação, árvores de decisão e redes artificiais neurais (Ambade et al. 2011, Carrión-Valero e Perpiñá-Tordera 2001, Hiraki et al. 2004, Neves et al. 2007, Porcel e Vives 2003, Sales et al. 2009, Seixas et al. 2013, Tiwari et al. 2007).

Alguns modelos preditivos utilizando variáveis clínicas e laboratoriais já foram publicados com o intuito de diferenciar derrames pleurais causados por TB daqueles não TB. A maioria destes modelos utilizam a dosagem de ADA em combinação com outras características sócio demográficas e dados biológicos de mais fácil acesso tais como, idade,

temperatura, leucometria no sangue periférico, percentual de linfócitos e proteínas no LP e marcadores tumorais (Klimiuk et al. 2015, Porcel 2009, Porcel et al. 2015, Sahn e Heffner 2013, Valdés et al. 2010, Valdés et al. 2015).

Porcel e colaboradores aplicaram um modelo foi utilizado para discriminar derrames pleurais tuberculosos e neoplásicos baseado em quatro parâmetros: idade > 35 anos, ADA > 38 UI/L, temperatura e LDH no LP (Porcel et al. 2008). Este modelo foi 92,2% sensível e 98,3% específico, e a validação usando uma amostra independente mostrou uma Se = 85% e uma Sp = 97%.

Valdés (2010) propuseram uma árvore de classificação para determinar o DP como tuberculoso ou não-tuberculoso. Em um primeiro modelo os autores incluíram a contagem de linfócitos no LP > 31,5% e a dosagem de ADA > 35 UI/L, encontrando uma acurácia média de 99%. Um segundo modelo, incluiu além da contagem de linfócitos no LP > 31,5%, febre e tosse, sendo que este mostrou-se menos preciso que o primeiro.

Uma tese de engenharia apresentada em 2015 apresentou SAD de tuberculose pleural e meníngea, baseado em redes neurais (Canõn 2015). Os resultados mostraram que os sistemas propostos foram considerados ferramentas relevantes, principalmente em locais com condições restritas de infraestrutura, quando não houver possibilidade de dosagem da ADA.

Apesar de úteis, esses modelos, bem como a dosagem de biomarcadores, não são capazes de substituir o uso de métodos microbiológicos, principalmente as culturas, que apesar de baixo rendimento nos casos das formas de TB EP, seguem sendo o padrão ouro para diagnóstico das mais variadas manifestações da TB, bem como para a identificação de seu perfil de sensibilidade (Talbot et al. 2005).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, um modelo hierárquico identificou que 13,4% dos casos de TB notificados entre 2007 e 2011 tinham apresentação extrapulmonar (Gomes et al. 2014). No entanto, apesar desses números, a TB EP é uma manifestação historicamente negligenciada, talvez pelo menor impacto epidemiológico na cadeia de transmissão da doença (Norbis et al. 2014).

Particularmente no caso da TBPI, justificado também pela sua frequência, o diagnóstico tem sido um desafio para a comunidade médica e científica, gerando entraves para a o início correto da terapia, interrupção da cadeia de transmissão, nos casos da forma pulmonar associada, e prevenção morbidades e de mortes em decorrência da doença. Isto se deve, basicamente, à necessidade de procedimentos invasivos, por vezes não disponíveis ou até contraindicados, e ao baixo rendimento microbiológico a partir do LP e à escassez de métodos que possibilitem a diferenciação de outras patologias que apresentam DP exsudativo, como neoplasias e doenças autoimunes, por exemplo (Porcel 2016, Vorster et al. 2015).

Não são incomuns os elevados índices de diagnóstico empíricos para TBPI em nosso meio (Machado et al. 2016, Seiscento et al. 2009). Além do grande número de casos tratados sem confirmação, parece ocorrer também um retardo no diagnóstico da doença, podendo chegar a até 60 dias após o início dos sintomas (Sané et al. 2007, Seiscento et al. 2009, Zhai, et al. 2016).

A dificuldade ou não aplicação de métodos diagnósticos para a TBPI também são preocupações expostas pela comunidade científica internacional, aqui representada pelo artigo de Baumaan (2007), o qual sugere que a dificuldade e maior complexidade no diagnóstico desta apresentação da TB podem levar à subnotificação da mesma.

O acesso à biópsia pleural por agulha, via toracoscopia ou mesmo através de cirurgias abertas é limitado em muitas partes do mundo onde a TB é endêmica e, portanto, se a análise do LP se mostrar inconclusiva através dos exames microbiológicos, o início do tratamento é indicado baseado na dosagem do ADA, nem sempre encontra-se disponível nos laboratórios da rede pública de saúde, ou em manifestações clínicas e radiológicas (Diacon et al. 2003, Koelenberg e Diacon 2011, Vorster et al. 2015).

Desta forma, com base na revisão feita acima, demonstrando a importância epidemiológica da TB em nosso cenário, bem como as dificuldades para o diagnóstico da forma pleural da doença, justifica-se o desenvolvimento desta tese, visando contribuir com a

identificação de estratégias que facilitem o diagnóstico da doença e conseqüentemente reduzam a morbidade e mortalidade da TB em nosso meio.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Buscar marcadores clínicos, citológicos e imunológicos que possam distinguir o derrame pleural encontrado na TBPI daqueles de outras etiologias.

3.2 Específicos:

a) Artigo 1:

- quantificar biomarcadores –IFN- γ e IP-10 – no sangue periférico e no LP de pacientes com DP em investigação;
- quantificar ADA no LP de pacientes com DP em investigação;
- Calcular os pontos de corte de ADA, IFN- γ e IP-10 para o diagnóstico de TBPI;
- avaliar o rendimento diagnóstico de ADA, IFN- γ e IP-10, de forma isolada ou em associação para o diagnóstico da TBPI;

b) Artigo 2:

- descrever os fatores clínicos, radiológicos e laboratoriais de pacientes com DP em investigação;
- identificar e distinguir o DP tuberculoso daquele causado por outras condições baseado em fatores clínicos, radiológicos e laboratoriais;
- criar um sistema de apoio à decisão utilizando o modelo estatístico de árvores de classificação baseado em variáveis clínicas e laboratoriais para o diagnóstico de TBPI.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 1: *Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using interferon gamma, interferon gamma inducible protein of 10-kD and adenosine deaminase (Artigo publicado)*

Ana Paula Santos¹, Raquel da Silva Corrêa², Marcelo Ribeiro-Alves³, Ana Carolina Oliveira Soares da Silva², Thiago Tomaz Mafort¹, Janaína Aparecida de Oliveira Leung¹, Geraldo Moura Batista Pereira^{2,4}, Luciana Silva Rodrigues^{2¶*}, Rogério Rufino^{1¶}

¹ Department of Pulmonary Care, Pedro Ernesto University Hospital (HUPE) - State University of Rio de Janeiro (UERJ), RJ/Brazil

² Laboratory of Immunopathology, Medical Sciences Faculty (FCM) - State University of Rio de Janeiro (UERJ), RJ/Brazil

³ Laboratory of Clinical Research on STD/AIDS, National Institute of Infectology Evandro Chagas (INI) – Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), RJ/Brazil

⁴ Laboratory of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), RJ/Brazil

PLoS One 2018; 13 (8): e0202481

Neste artigo, foi realizada a dosagem de biomarcadores no líquido pleural de pacientes com derrame pleural em investigação consecutivamente incluídos no estudo conduzido no Hospital Universitário Pedro Ernesto após preenchimento dos critérios de inclusão. Os resultados da pesquisa foram submetidos em 08/07/2018 ao periódico PLoS One, classificado como B1 pela Plataforma Sucupira e publicado em 27/08/18.

No estudo foram realizadas dosagens de ADA e a medida de dois biomarcadores potenciais (IFN- γ e IP-10) para o diagnóstico da TBPI no sobrenadante do QuantiFERON-TB Gold In Tube aplicados no líquido pleural. Os valores de ADA, IFN- γ e IP-10 foram comparados de acordo com a etiologia final do derrame pleural (TB ou não TB). Os três biomarcadores apresentaram níveis significativamente maiores no LP de pacientes com TB,

sendo o IFN- γ em seus níveis basais o marcador com melhor resultado, seguido pelo ADA com um valor de corte mais baixo que o padronizado e o IP-10. Com uma acurácia de 98,4%, a combinação dos resultados positivos de IFN- γ + ADA em seu “novo *cut-off*” gerou valores de Se = 93.8%, Sp = 100%, valor preditivo positivo (VPP) = 100% e valor preditivo negativo (VPN) = 97.9%, sugerindo esta combinação como excelente preditor do diagnóstico correto de TBPI.

O artigo é transcrito abaixo conforme o padrão da revista PLoS One.

Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using IFN- γ , IP-10 and adenosine deaminase

Ana Paula Santos¹, Raquel da Silva Corrêa², Marcelo Ribeiro-Alves³, Ana Carolina Oliveira Soares da Silva², Thiago Tomaz Mafort¹, Janaína Aparecida de Oliveira Leung¹, Geraldo Moura Batista Pereira^{2,4}, Luciana Silva Rodrigues^{2¶*}, Rogério Rufino^{1¶}

¹ Department of Pulmonary Care, Pedro Ernesto University Hospital (HUPE) - State University of Rio de Janeiro (UERJ), RJ/Brazil

² Laboratory of Immunopathology, Medical Sciences Faculty (FCM) - State University of Rio de Janeiro (UERJ), RJ/Brazil

³ Laboratory of Clinical Research on STD/AIDS, National Institute of Infectology Evandro Chagas (INI) – Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), RJ/Brazil

⁴ Laboratory of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), RJ/Brazil

¶ These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author

Email: lrodrigues.uerj@gmail.com (LR)

Abstract

Background: Pleural tuberculosis (PITB) is the most common extrapulmonary manifestation of this infectious disease which still presents high mortality rates worldwide. Conventional diagnostic tests for PITB register multiple limitations, including the lack of sensitivity of microbiological methods on pleural specimens and the need of invasive procedures such as pleural biopsy performance. In this scenario, the search for biological markers on pleural fluid (PF) has been the target of several studies as a strategy to overcome the limitations of PITB diagnosis. This study aims to evaluate the use either isolated or in combination with adenosine deaminase (ADA), interferon-gamma (IFN- γ), interferon-gamma inducible protein of 10-kD (IP-10) levels on PF in order to guide an accurate anti-TB treatment in microbiologically non-confirmed cases.

Methods and findings: Eighty patients presenting pleural effusion under investigation were enrolled in a cross-sectional study conducted at Pedro Ernesto University Hospital, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Peripheral blood (PB) and PF samples collected from all patients were applied to the commercial IFN- γ release assay, QuantiFERON-TB Gold In-Tube, and samples were analyzed for IFN- γ and IP-10 by immunoassays. ADA activity was determined on PF by the colorimetric method. Based on microbiological and histological criteria, patients were categorized as follow: confirmed PITB (n=16), non-confirmed PITB (n=17) and non-PITB (n=47). The *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific production of IFN- γ and IP-10 on PB or PF did not show significant differences. However, the basal levels of these biomarkers, as well as the ADA activity on PF, were significantly increased in confirmed PITB in comparison to non-PITB group. Receiver operating characteristics curves were performed and the best cut-off points of these three biomarkers were estimated. Their either isolated or combined performances (sensitivity [Se], specificity [Sp], positive predictive value [PPV], negative predictive value [NPV] and accuracy [Acc]) were determined and applied to Venn's diagrams among the groups. Based on the confirmed PITB cases, IFN- γ showed the best performance of them at a cut-off point of 2.33 IU/mL (Se=93.8% and Sp=97.9%) followed by ADA at a cut-off of 25.80 IU/L (Se=100% and Sp=84.8%) and IP-10 (Cut-point=4,361.90 pg/mL, Se=75% and Sp=82.6%). IFN- γ plus ADA (cut-point: 25.80 IU/L) represent the most accurate biomarker combination (98.4%), showing Se=93.7%, Sp = 100%, PPV = 100% and NPV = 97.9%. When this analysis was applied in non-confirmed PITB, 15/17 (88.2%) presented at least two positive biomarkers in combination.

Conclusion: IFN- γ , IP-10, and ADA in PITB effusions are significantly higher than in non-PITB cases. IFN- γ is an excellent rule-in and rule-out test compared to IP-10 and ADA. The combination of IFN- γ and ADA, in a reviewed cut-off point, showed to be particularly useful to clinicians as their positive results combined prompts immediately treatment for TB while both negative results suggest further investigation.

Introduction

Tuberculosis (TB) remains a global public health problem ranking above the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) as a leading cause of death between infectious diseases [1]. Among extrapulmonary presentations of the disease, pleural tuberculosis (PITB) is the most common [2], summing 42% of these cases [3]. Despite its frequency, PITB remains a challenge for diagnosis due to the paucibacillary nature in patients' biological specimens and the need for invasive procedures, which are not free from complications, are relatively expensive and time demanding [4 – 7].

Based on TB's pathophysiology that represents largely an immunological reaction in which a vast category of cytokines and chemokines are intimately involved, the evaluation of biomarkers on pleural fluid (PF) configures an alternative for TB diagnosis [8 – 10]. Until now, adenosine deaminase (ADA) is a useful and cost-effective PF marker routinely used in high prevalence settings for diagnosis of PITB [11]. However, high levels of ADA can also be observed in other types of infections, malignant pleural effusion, and rheumatic diseases, and thus is not specific for PITB [12].

The role of interferon-gamma release assays (IGRA) adapted to PF for PITB diagnosis is still under evaluation. Several studies in this line of investigations have been published using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay T-SPOT.TB (T-SPOT.TB; Oxford Immunotec Limited, United Kingdom) or the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT; Cellestis Limited, Australia), both IGRA tests approved by World Health Organization to be used only for latent TB diagnosis [13], however showing conflicting results [5, 14-18]. Since that there is an extensive literature [8, 9, 19, 20] regarding the evaluation of PF biomarkers showing that the TB's lymphocytic pleural effusion presents an increased expression of interferon- γ (IFN- γ) and its inducible chemokines, such as interferon- γ inducible protein of 10-kD (IP-10) [19, 21], we speculate

that the application of IGRA could be extremely promising and show considerable adjuvant value on diagnosis of paucibacillary patients.

Given the importance of ADA for PITB diagnosis and the unsolved determination of the better cut-off value of this marker associated with the advent of new PITB biomarkers, we aimed to evaluate the use, either isolated or in combination, of ADA, IFN- γ , IP-10 as well as the Mtb-specific immune responses in PF samples based on QFT-GIT system in order to improve the differential diagnosis of PITB. Receiver operating characteristics (ROC) curves were generated to calculate the best cut-off value for each immunological marker on PF. Further, their performances were estimated in a cohort of patients presenting pleural effusion under investigation and results applied to Venn's diagrams. The data showed here revealed an effort to apply available diagnostic tools, either alone or in combination, to be used as potential candidates for differential diagnosis of PITB, especially in cases that do not fit into the TB gold standard methods.

Material and methods

Ethics statement

The study protocol was approved by the biomedical research ethics committee of Pedro Ernesto University Hospital, Rio de Janeiro State University (HUPE/UERJ; #1.100.772). All individuals signed a free written informed consent. All samples were fully anonymized before processing to protect the study participants' identities.

Study design, samples and data collection

A cross-sectional study was conducted at HUPE/UERJ a tertiary care center at RJ, Brazil. Patients aged ≥ 18 years with pleural effusion under investigation and with an

indication of thoracentesis were consecutively enrolled from June 2015 to February 2017. Patients who refused being submitted to the procedure and pregnant women were excluded.

Peripheral blood (PB) was collected and drawn directly into each vacutainer tube provided as part of the QFT-GIT system (QFT-GIT; Cellestis Limited, Australia). Ultrasound-guided thoracentesis was performed by a trained pulmonologist who collected PF which was directly drawn into each tube of QFT-GIT and also sent for routine diagnostic tests, including chemistry panel, total and differential cell count, ADA measurement [22], cytopathology, Xpert[®] MTB/RIF assay and microbiological analysis [bacteria, fungi and mycobacteria (Lowenstein Jensen solid media)]. Pleural biopsy with Cope's needle was performed when there were no contraindications and pleural tissue was evaluated for histopathology analysis, acid-fast bacilli (AFB) staining and mycobacterial culture.

We reviewed the medical records of these patients to evaluate physical, clinical and demographic information, medical history and laboratory data. Signs and symptoms included subjective reported presence and duration such as a cough, fever, chest pain, dyspnea, night sweats and weight loss. HIV test was offered to all patients included in the study and their results, as well as the presence of other comorbidities, were also recorded. Radiological finds were based on the chest X-ray and were classified either as: unilateral pleural effusion (UPE) or bilateral pleural effusion (BPE). Data on the respiratory specimen (spontaneous sputum, induced sputum or bronchoalveolar lavage) were collected when available. <http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.saceaaw>

Study population and diagnostic criteria

Confirmed PITB cases were defined based on a positive result of the following microbiological and/or histopathological tests on PF or pleural tissue: AFB smear

microscopy, mycobacterial culture or Xpert[®] MTB/RIF and/or evidence of granuloma with or without caseous necrosis.

Non-confirmed PITB cases were consisted of: i) *possible PITB* – clinical manifestations suggesting TB (fever, chest pain, dyspnea, cough night sweats, hyporexia and/or weight loss), and a lymphocytic and exudative pleural effusion associated with ADA levels above 40 IU/L, followed by a full recovery after at least six months of anti-TB treatment; or ii) *empiric PITB* – cases with clinical manifestations suggesting TB (as previously described above) which do not fill the criteria of confirmed or possible PITB and that fully recover after at least six months of anti-TB treatment.

Non-PITB cases were defined as those with pleural or pleuropulmonary diseases, excluding active TB based on clinical, laboratory, radiological, microbiological and/or pathological features. Malignant pleural effusions were diagnosed by a positive PF cytologic result or malignant cells identified in the pleural tissue. Even when both of these tests results were negative, malignant effusion was diagnosed when a primary cancer was known to have disseminated and no other cause of pleural effusion was identified. Patients who did not fit the criteria used for PITB diagnosis defined as above and with unknown cause of pleural effusion were classified as “undefined” (UND) pleural effusion and considered as non-PITB.

QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay

QFT-GIT was performed in all patients with pleural effusion under investigation. Briefly, one milliliter of both PB and PF were directly drawn in each of the three tubes of QFT-GIT precoated with saline (Nil; negative control) or Mtb-specific antigens [early secretory antigenic target -6 (ESAT-6), culture filtrate protein-10 (CFP-10) and TB 7.7] or mitogen (Mit; positive control) and incubated for 24 h at 37°C. After centrifugation, the supernatant was collected and stored frozen at – 20°C until the IFN- γ determination by an

ELISA using QFT-GIT kit according to the manufacturer's instruction (Cellestis Limited, Australia). IFN- γ -Mtb-specific levels were calculated by subtracting the obtained value with the Nil/control tube. QFT-GIT applied on PB was defined with a positive result when IFN- γ levels in response to Mtb-specific antigens ≥ 0.35 IU/mL and IFN- γ levels in response to mitogen (mitogen minus Nil/control) ≥ 0.5 IU/mL. Indeterminate result was defined as IFN- γ of Nil/control > 8.0 IU/mL or positive control value < 0.5 IU/mL. Results were calculated according to the manufacturer's software. <http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.saseaee>

IP-10 quantification

IP-10 supernatant levels were measured using the Duoset ELISA kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Inc, MN, USA). Results were expressed in pg/mL after processing the data with software SoftMax Pro. The lower level of this assay was 31.3 pg/mL while its upper limit was 20,000 pg/mL and readings greater than this were set at 20,000 pg/mL for the purpose of analysis.

Statistical analysis

In the evaluation of the sociodemographic, clinical and laboratory features among the different groups of individuals, for continuous numerical variables, Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks tests was used for assessing the hypothesis that the different samples in the comparison were drawn from the same distribution or from distributions with the same median. Likewise, for categorical nominal variables, Fisher's exact tests were used in the evaluation of frequencies among the three different groups (confirmed PITB, non-confirmed PITB, and non-PITB) for assessing the hypothesis of independence between the groups of individuals and these variables.

Further, pairwise comparisons of each QFT-GIT parameter mean (Nil/control, Antigen, Mitogen and Antigen minus Nil/control) and ADA dosage were performed by contrasts between confirmed PITB and non-PITB groups obtained after both bi- and multivariate linear models fitted by ordinary least square regressions. The decision to use only these two groups (confirmed PITB and non-PITB) was based on the concern of possible bias. P-values were corrected by the Tukey Honest Significant Difference (HSD) method. After QFT-GIT parameters and ADA pairwise comparisons, we conducted Holm-Bonferroni Type I error adjustment for multiple comparisons. In order to eliminate sample bias, confounding variables (gender, duration of signs and symptoms, DHL, protein and albumin levels on PF, total, mononuclear (MN) and polymorphonuclear (PMN) cells on PF, chest X-ray, previous TB, history of smoke, and comorbidities as cancer, renal failure and use of immunosuppressive drugs) were selected by bivariate linear models fitted by ordinary least square regressions by backward elimination and were retained in multivariate models if they had any adjusted-P-value < 0.2 in any comparison. The cut-off points of the biomarkers for PITB diagnosis were calculated from the ROC curve using the Youden method. Again, in order to calculate the best cut-off values, only cases diagnosed using rigid criteria (confirmed TB) were included. Performance of PITB diagnosis algorithms by the three biomarkers' cut-off points was estimated by its leave-one-out cross-validation (LOOCV) accuracy (Acc), sensitivity (Se), specificity (Sp), positive (PPV) and negative predictive values (NPV), and false-positive and negative ratios with 95% CI. Result classifiers using either each biomarker or their combination were later evaluated, and their results illustrated by Venn's diagrams. All analysis was performed in software R v. 3.3.1. P-value < 0.05 denoted statistical significance.

Results

General characteristics of the study population

A total of 104 patients were submitted to thoracentesis at HUPE/UERJ between June 2015 and February 2017 in order to determine the pleural effusion etiology. Of these, 80 patients were enrolled in this study by fill the inclusion criteria and a great panel of laboratory investigations were performed, as depicted in Figure 1.

Culture on PF and pleural tissue were performed in 76 and 12 cases, respectively, and histopathological data were available for 39/80 cases (Fig 1). The positivity of this microbiological method in our sample was low, and solid culture on PF and pleural tissue registered values of 9.7% and 22.2%, respectively. Pleural tissue biopsy and the identification of granuloma on histopathological analysis showed a better yield than culture (61.1%). The yield of ADA dosage (> 40 IU/L) was 81.8% and in only 14.3% of PITB cases, Xpert MTB/RIF® detected Mtb (Table S1). Thirty-three cases (41%) were diagnosed as PITB based on the diagnostic criteria previously described [16 confirmed PITB and 17 non-confirmed PITB (15 possible and 2 empiric)]. Forty-seven patients (59%) were enrolled as non-PITB patients: 27 malignancies, 10 renal/cardiac/hepatic failure, 2 empyema, 2 systemic lupus erythematosus, 1 chylothorax, 1 endometriosis and 3 undefined pleural effusion (Fig 1).

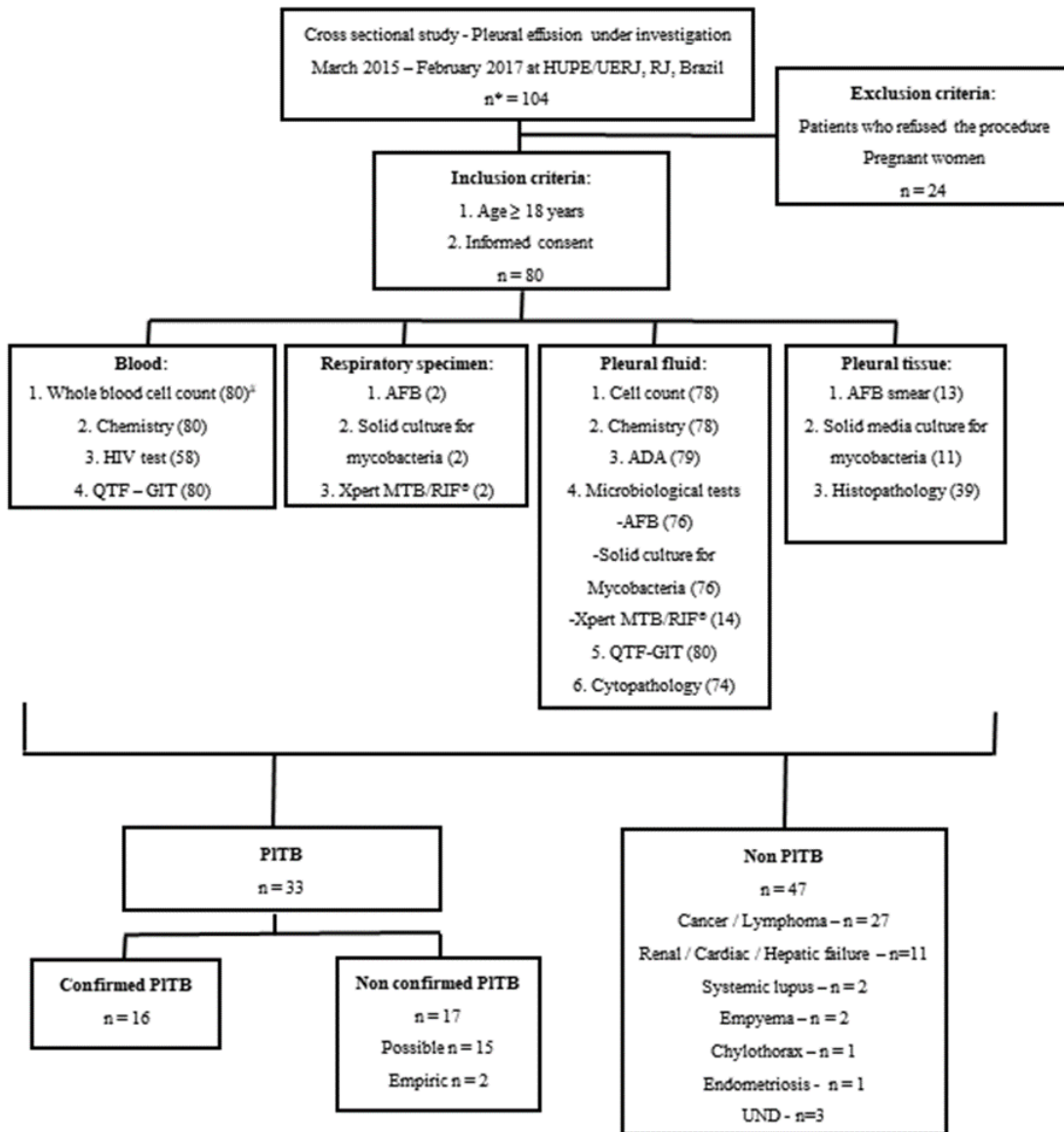


Figure 1 Flow chart of the study design and diagnostic testing performed. QTF-GIT: QuantiFERON-TB Gold in-Tube; AFB: acid-fast bacilli; ADA: adenosine deaminase; TB: Tuberculosis; UND: undefined diagnosis. Numbers in parenthesis refer to the patients submitted to the correspondent diagnostic test. Gray boxes show the final diagnosis and the study groups.

Sociodemographic, clinical and diagnostic characteristics of these patients are shown in Table 1. Except for age, a positive history of smoking and arterial hypertension, PITB and non-PITB groups were homogeneous. Non-PITB patients had a higher duration of signs/symptoms until diagnosis when compared to PITB patients (90 days vs 60 days, $p=0.03$). Unilateral pleural effusion was the commonest radiological presentation of PITB group (97%) while non-PITB cases presented unilateral pleural effusion (68.1%), followed by bilateral pleural effusion (23.4%). Tuberculous PF presented higher levels of lymphocyte percentage ($p = 0.01$) and total protein ($p = 0.04$). Confirmed and non-confirmed PITB did not present statistically different characteristics (Table 1).

ADA activity measurement was performed in 79 out of 80 patients included in the study and was the most frequent diagnostic method used (Fig 1), contributing to PITB diagnosis in 81.8% of the patients. Using the classical cut-off point of 40 IU/L, ADA positivity showed statistically significant differences between PITB and non-PITB positivity frequencies when all cases were considered (Table S1), while there was no difference between confirmed and non-confirmed PITB (Table 1).

QFT-GIT assay performed on PB was positive in 18/33 (54.5%) of the PITB patients, while 11/47 (23.5%) of non-PITB patients were positive ($p = 0.01$) (Table 1).

Table 1 Baseline characteristics of the study population. Socio-demographic, clinical, laboratory and radiological features according to the diagnosis of PITB (confirmed and non-confirmed cases) and non-PITB.

Characteristics	Non-PITB (N = 47)	C-PITB (N = 16)	NC-PITB (N = 17)	Non-TB vs TB <i>p</i> -Value	C-PITB vs NC-PITB <i>p</i> -Value
Sex, (%)					
Male	26 (55)	11 (69)	12 (71)	0.25	1.0
Female	21 (45)	5 (31)	5 (29)		
Age, years					
Median (IQR)	62 (49-76)	42.5 (33-49)	45 (26-54)	< 0.0001	0.70
Smoke, (%)					
Yes	24 (51)	4 (25)	4 (23.5)	0.03	0.57
HIV status, (%)					
Positive	3 (4)	1 (6)	-	0.15	0.35
Negative	29 (62)	12 (75)	15 (88)		
Refuse testing	15 (34)	3 (19)	2 (12)		
Previous comorbidities, (%)					
Arterial hypertension	17 (36)	1 (6)	4 (23.5)	0.04	0.33
Diabetes mellitus	7 (15)	-	1 (6)	0.13	1.0
Renal failure	3 (6)	-	-	0.26	-
Systemic lupus	1 (2)	-	-	1	-
Viral hepatitis	3 (6)	-	-	0.26	-
Inflammatory bowel disease	-	1 (6)	-	0.41	0.48
Cancer	5 (11)	1 (6)	-	0.39	0.48
Corticosteroids use	-	1 (6)	-	0.24	0.48
Immunosuppressive therapy	3 (6)	-	-	0.26	-
Previous transplant	3 (6)	-	-	0.26	-
Previous tuberculosis	2 (4)	1 (6)	2 (12)	0.66	0.51
Signs/symptoms, (%)					
Fever	8 (17)	8 (50)	4 (23.5)	0.14	0.28
Cough	22 (47)	6 (37.5)	8 (47)	0.93	0.66
Chest pain	15 (32)	8 (50)	8 (47)	0.22	0.86
Dyspnea	34 (72)	12 (75)	7 (41)	0.47	0.14
Weight loss	13 (28)	6 (37.5)	6 (35)	0.81	0.86
Duration of signs/symptoms					
Median days (IQR)	90 (45-195)	60 (27.5-90)	52.5 (30-90)	0.03	0.55
Pleural fluid					
Median (IQR)					
Total cell count, mm ³	1,150 (500-2600)	2,100 (635-3882)	3,600 (707-5000)	0.04	0.41
Lymphocyte, %	73 (56-90)	90 (61-96)	95 (90-97)	< 0.0001	0.55
Total protein, g/dL	4.1 (3.6-5.3)	5.55 (4.90-6.17)	5.65 (4.92-6.15)	< 0.0001	0.35
Albumin, g/dL	2.6 (1.9-3.0)	2.80 (2.60-3.10)	3.00 (2.30-3.10)	0.05	0.50
DHL, UI/L	185 (137-597)	457 (214-876)	393.5 (259.5-654)	0.003	0.90
ADA, (%)					
≥ 40 IU/L	2 (4.3)	12 (75)	15 (88.2)	< 0.0001	0.40
< 40 IU/L	44 (93.6)	4 (25)	2 (11.8)		
Missing data	1 (2.1)	-	-		
Chest X-ray, (%)					
Unilateral pleural fluid	32 (68.1)	16 (100)	16 (94.1)	0.006	1
Bilateral pleural fluid	11 (23.4)	-	1 (5.9)		
Missing data	4 (8.5)	-	-		
Peripheral blood QFT-GIT, (%)					
Positive	11 (23.5)	9 (56.5)	9 (53)	0.01	0.53
Negative	35 (74.5)	6 (37.5)	8 (47)		
Indeterminate	1 (2)	1 (6)	-		

PITB: Pleural tuberculosis; C-PITB: Confirmed PITB; NC-PITB: Non-confirmed PITB; IQR: Interquartile range; HIV: Human immunodeficiency virus; DHL: Lactate dehydrogenase; ADA: adenosine deaminase; QFT-GIT: QuantiFERON-TB Gold In-Tube.

IFN- γ , IP-10, and ADA measurements in the pleural fluid

Firstly, we decided to determine whether these biomarkers known in the pathophysiology of TB were present at the local site of Mtb infection in our study population. ADA activity was performed directly in PF and the levels of IFN- γ and IP-10 was evaluated after stimulation with Mtb-specific antigens using the QFT-GIT system. In this analysis, we seek to identify possible differences according to the parameters of QFT-GIT performed on PF among confirmed PITB (n = 16) and non-PITB (n = 47) groups using an adjusted linear model. The obtained mean values were adjusted to avoid sample bias by selected sets of the following confounding factors: gender, previous TB, cancer, chest X-ray, protein level, PMN percentage and MN percentage for IFN- γ ; previous TB, protein level, PMN percentage and MN percentage for IP-10; and protein level, PMN percentage and MN percentage for ADA.

Mtb-specific stimulated PF samples did not demonstrate significant differences regarding both IFN- γ and IP-10 levels between confirmed PITB and non-PITB patients in our study population (Fig 2 A and B). However, the unstimulated or background levels of IFN- γ and IP-10 (Nil/control tube) were higher increased in the PITB group when compared to non-PITB ($p < 0.0001$) (Fig 2 A and B). IFN- γ and IP-10 levels in response to Mtb-specific antigens on PB also did not show significant differences (Supplemental Fig 1). ADA activity measurement in PF samples revealed significantly increased levels of this biomarker in confirmed PITB group ($p < 0.0001$) in comparison to non-PITB group, showing five times higher levels on confirmed PITB (61.05 IU/L in confirmed PITB vs 11.85 IU/L in non-PITB; $p < 0.0001$) (Fig 2C).

These data reinforce the idea that IFN- γ , IP-10, and ADA are produced in high levels in Mtb infection site and encourage the use of their baseline levels in the differential diagnosis routine of pleural effusion.

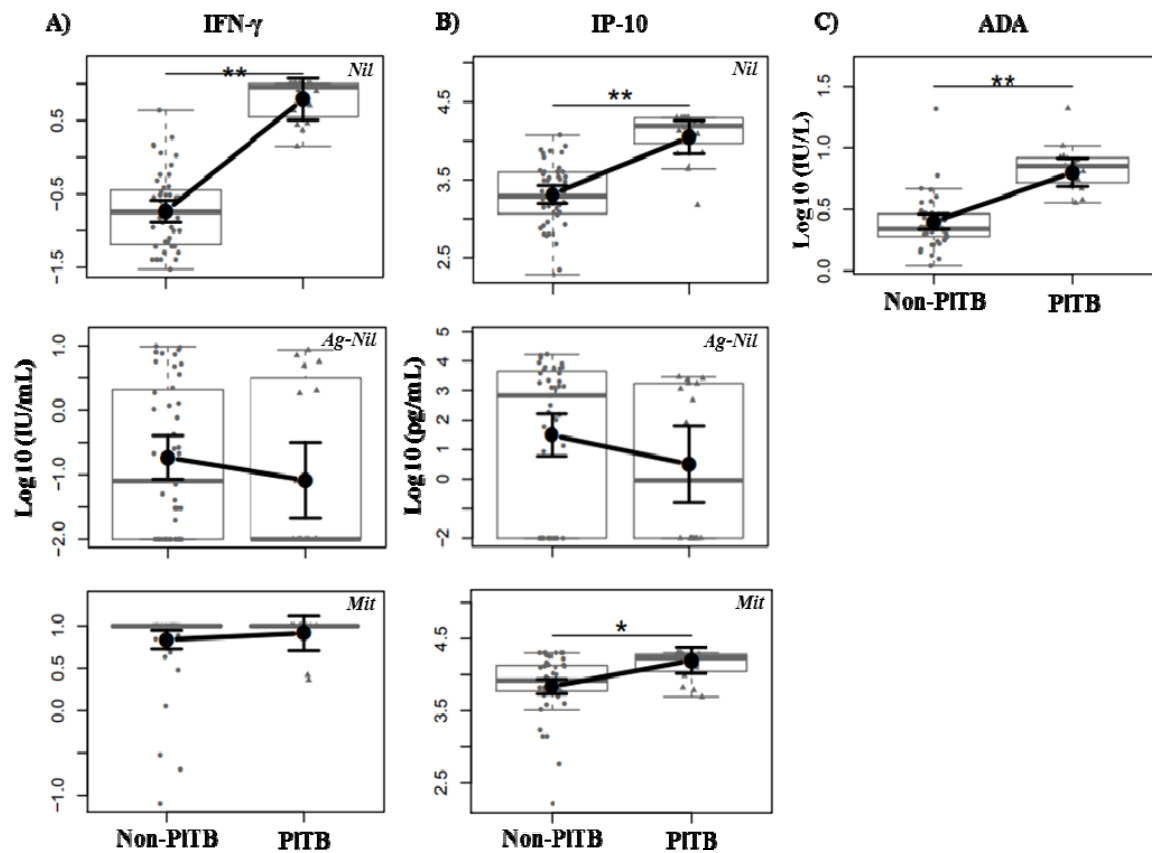


Figure 2 Concentration of IFN- γ , IP-10, and ADA in pleural fluid. (A) IFN- γ and (B) IP-10 were measured in the supernatants of the QFT-GIT system from PF and (C) ADA activity was measured directly in PF. Obtained levels from each biomarker were analyzed in a logarithmic scale and illustrated using boxplots to compare the groups: Non-PITB (N = 46) and confirmed PITB (n=16). Small black dots represent individual cases and box plots represent the interquartile range and sample median (central solid gray line). Bigger black dots and vertical bars represent linear model estimated adjusted means and 95% confidence intervals (CI 95%). Comparisons of means among groups were performed by contrasts/differences obtained after both bi- and multivariate linear models fitted by ordinary least square regressions. The confounders for the parameters illustrated above were: (A)

Nil/control (unstimulated) IFN- γ : gender, previous TB, cancer, chest X-ray, protein level, PMN percentage and MN percentage; Ag-Nil IFN- γ : gender, renal failure, and albumin; Mit-stimulated IFN- γ : smoke, chest X-ray, DHL, and albumin; (B) Nil/control (unstimulated) IP-10: previous TB, protein level, PMN percentage, and MN percentage ; Ag-Nil IP-10: age, renal failure, and albumin; Mit-stimulated IP-10: previous TB, cancer, smoke, DHL, and albumin; and, (C) for ADA: protein level, PMN percentage, and MN percentage. Nil: Negative/control tube; Ag-Nil: Mtb-specific antigens minus Nil; Mit: Mitogen. * $p = 0.001$; ** $p < 0.0001$.

Performance and diagnostic usefulness of IFN- γ , IP-10, and ADA levels in pleural fluid

Since ADA's activity is a widely used method in clinical practice for PITB diagnosis and the vast literature data [8, 9, 19 – 21] in conjunction with the present study showing the greater levels of IFN- γ and IP-10 in PF, we hypothesize that the combinations of these three biomarkers could improve the TB diagnostic accuracy. First of all, we calculate the best cut-off values for these three biomarkers using confirmed PITB and non-PITB (except one case in the non-PITB group was excluded due to missing data about ADA levels). Moreover, only IFN- γ and IP-10 unstimulated or background (from Nil/control tube) levels were used for the purpose of these analyses as they presented the highest values and statistical differences between the groups.

Receiver operating characteristics curves were performed as shown in Fig 3 and cut-off values were calculated according to the Youden's Index. IFN- γ registered the highest value of AUC (0.989), followed by ADA (0.960) and IP-10 (0.832). The optimal cut-point for ADA was 25.8 IU/L, which resulted in a Se of 100% (100 - 100), a Sp of 84.8% (77.2 – 92.3),

a PPV of 69.6% (55.3 – 83.5), and a NPV of 100% (90.4 – 100). For IFN- γ , the optimal cut-off value calculated was 2.33 IU/mL, with a Se of 93.7% (84.8 – 100) and a Sp of 97.8% (94.8 – 100). Likewise, the optimal IP-10 cut-off value was 4,361.90 pg/mL showing 75% and 82.6% of sensitivity and specificity, respectively (Table 2).

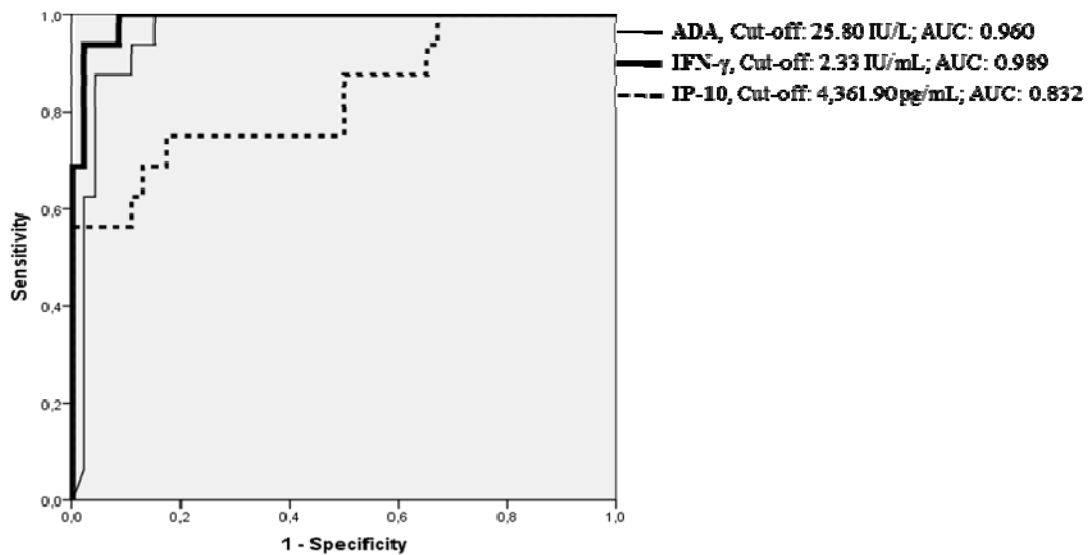


Figure 3 Receiver operating curves of ADA, IFN- γ , and IP-10 in pleural fluid. Receiver operating curves were plotted and each biomarker had its area under the curve (AUC) calculated. The best cut-off value for PITB diagnosis was established according to Youden's Index. The statistical analysis was performed using confirmed PITB (N = 16) and non-PITB (N = 46).

Combinatorial analysis and Venn's diagram application in pleural TB diagnosis using ADA (25.8 IU/L), IFN- γ , and IP-10

Although the individual use of these three the immunological markers had shown good performances, analysis in combination of their positivity offered much better results of specificity and PPV, with the capacity of ruling in PITB as a diagnosis in 100% of our samples when the combination of at least 2 of the biomarkers were positive (Table 2).

None of the confirmed PITB cases presented isolated positivity of IFN- γ or IP-10. Between them, IP-10 was the least specific (82.6%) showing positive results in 8 non-PITB cases (5 malignancies, 1 endometriosis, 1 cardiac failure and 1 hepatic failure). Only one case of cardiac failure among the 46 non-PITB cases was positive for IFN- γ alone (Sp = 97.8%). ADA independent results in their classical cut-point (40IU/L) have shown superior Sp, PPV, NPV, and Acc when compared to the one calculated in the present study (25.8 IU/L; Table 2).

Table 2 Performance outcomes of IFN- γ , IP-10, and ADA for the PITB diagnosis.

	Se (95% CI)	Sp (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)	Acc (95% CI)
Independent IFN-γ	93.7 (84.8 - 100)	97.8 (94.8 - 100)	93.7 (84.8 - 100)	97.8 (94.8 - 100)	96.8 (93.6 - 99.9)
Independent IP-10	75 (58.9 - 91.1)	82.6 (74.6 - 90.6)	60 (43.9 - 76.1)	90.5 (84 - 97)	80.6 (73.5 - 87.7)
Independent ADA (40 IU/L)	75 (74.6 - 75.4)	95.7 (95.6 - 95.8)	85.7 (85.4 - 86)	91.7 (91.5 - 91.8)	90.3 (90.2 - 90.4)
Independent ADA (25.8 IU/L)	100 (100 - 100)	84.8 (77.2 - 92.3)	69.6 (55.6 - 83.5)	100 (90.4-100)	88.7 (83 - 94.4)
IFN-γ (+) IP-10 (+) ADA(25.8 IU/L) (+)	75 (58.9 - 91.1)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	92 (86.5 - 97.4)	93.5 (89.1 - 98)
IFN-γ (+) IP-10 (+) ADA(25.8 IU/L) (-)	75 (58.9 - 91.1)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	92 (86.5 - 97.4)	93.5 (89.1 - 98)
IFN-γ (+) IP-10 (-) ADA(25.8 IU/L) (+)	93.7 (84.8 - 100)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	97.9 (94.9 - 100)	98.4 (96.1 - 100)
IFN-γ (-) IP-10 (+) ADA(25.8 IU/L) (+)	75 (58.9 - 91.2)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	92 (86.5 - 97.4)	93.5 (89.1 - 98)

IFN- γ : interferon-gamma; IP-10: interferon-gamma inducible protein of 10-kD; ADA: adenosine deaminase; Se: Sensitivity;

Sp: Specificity; PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value; Acc: Accuracy.

Se, Sp, PPV, NPV and Acc are expressed as percentages.

Performance outcomes when confirmed PITB was compared to non-PITB patients.

Of the 16 confirmed PITB cases, 15 (93.7%) were positive using the combination of either two biomarkers among ADA_(25.8IU/L), IFN- γ and IP-10 (Fig 4). Noteworthy, none of the non-PITB was positive (Sp=100%) using any of these combinations, which resulted in a PPV of 100% and an Acc of 93.5% in our samples, as illustrated in Table 2. Whichever combination of positive biomarkers was done, Sp and PPV achieved 100%, overcoming the lack of specificity of ADA_(25.8IU/mL) alone. But the combination of positivity of ADA_(25.8 IU/L) plus IFN- γ registered the best performance of all, with an Acc = 98.4% (95% CI 96.1 -

100%), Se = 93.7%, Sp = 100%, PPV = 100% and NPV = 97.9%. IFN- γ plus IP-10 and ADA (25.8 IU/L) plus IP-10 registered the same behavior, with a lower sensitivity (75%) but a Sp and a PPV of 100% (Table 2).

These results were illustrated using Venn's diagrams and can be seen in Fig 4. When the 16 confirmed PITB cases were analyzed, IFN- γ plus IP-10 plus ADA_(25.8 IU/L) positivity was registered in 12/16 (87,5%) cases. The intersection of only IFN- γ plus ADA_(25.8 IU/L) positivity added more 3 cases, summing 15/16 (93,7%), and in one case ADA_(25.8 IU/L) was lonely positive (Fig 4A). In the non-PITB group, we have observed no intersection among the three biomarkers positivity, which visually represents the specificity of 100% related to possible positivity combinations (Fig 4B). It is worth to note that the isolated positivity of ADA_(25.8 IU/L) have resulted in a mistaken diagnosis of 7/46 (15,2%) cases in non-PITB group (2 systemic erythematous lupus, 2 lymphomas, 1 poorly differentiated cancer, 1 empyema, 1 undefined diagnosis) if only this diagnostic test was used.

When Venn's diagram was applied in our 17 non-confirmed PITB cases, IFN- γ plus IP-10 plus ADA_(25.8 IU/L) positivity was found in 14/17 (82,3%) cases, IP-10 plus ADA_(25.8 IU/L) have included one more case and again, only one case presented the isolated positivity of ADA_(25.8 IU/L) (Fig 4C).

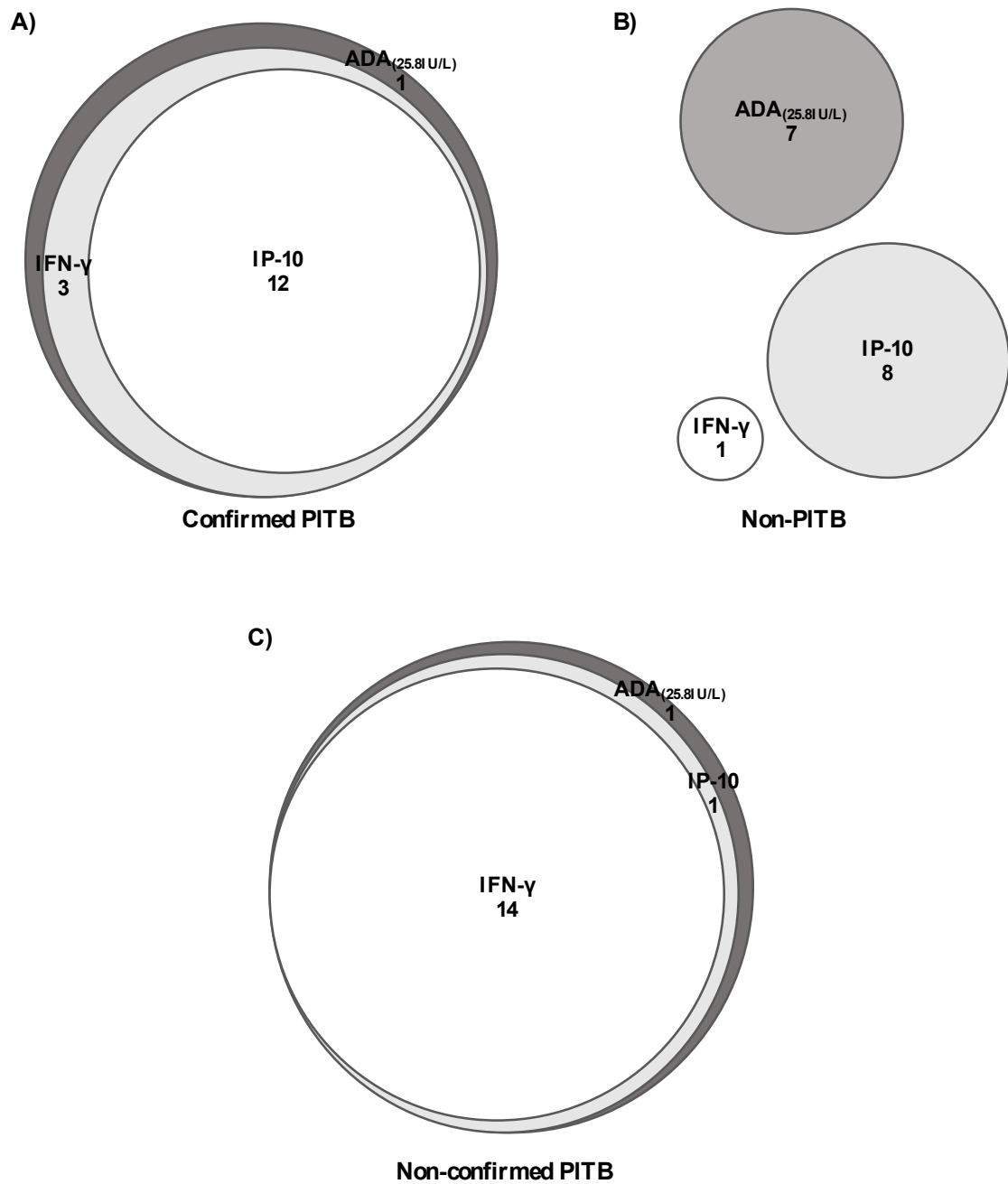


Figure 4 Venn's diagrams application on PITB diagnosis using ADA_(25.8 IU/L), IFN- γ and IP-10 positivity. A, B and C Venn's diagrams show the performance of the biomarkers positivity in three different groups of the study: confirmed PITB (N = 16), non-PITB (N = 46) and non-confirmed PITB (N = 17), respectively. IFN- γ : interferon-gamma; IP-10: interferon-

gamma inducible protein of 10-kD; ADA: adenosine deaminase; PITB: Pleural tuberculosis.

Numbers indicate the intersection positivity of the biomarkers.

Discussion

To help surpass the limitations of traditional and conventional methods for PITB diagnoses, such as the lack of sensitivity of microbiological methods on pleural specimens and the need of invasive procedures for pleural biopsy, the search for biological markers on PF has been the target of several studies [23 – 25]. In our study, we did not observe significant differences regarding IFN- γ and IP-10 production in Mtb-specific PF response between the non-PITB and confirmed PITB patients based on the QFT-GIT assay. However, unstimulated or background levels of IFN- γ and IP-10 in the same specimens were significantly higher in PITB group when compared to non-PITB. ADA activity, the only biomarker already available in the routine clinical practice for PITB diagnosis, provided good results when the standardized value of 40 IU/L was used, but the best cut-off value calculated in our sample was 1.6 times less than the one already used. Based on these results, the combinations of positive results of these three biomarkers showed to be useful, especially when IFN- γ and ADA (25.8 IU/L) were both positive, allowing rule-in of PITB diagnosis in 100% of the cases.

Several studies had already been published about the IGRAs performance on PB or adapted to PF in the PITB diagnosis [5, 14, 15, 17]. T-SPOT.TB® and QFT-GIT, two IGRAs approved by WHO for latent TB diagnosis [13], have been applied on PF for tuberculous pleurisy diagnosis based on the publication of Wilkinson *et al* [26], which showed that effective T-cells are 15 times higher on PF of PITB patients than on their PB. So, it was speculated that IGRAs could also be used on active sites of the disease in order to measure the Mtb-specific response according to the amount of cytokines and chemokines produced after

the stimulation by the antigens. In our sample, TB group presented a higher percentage of QFT-GIT positivity on PB when compared to non-PITB (54.5% vs 23.5%, $p = 0.01$). However, the failure of IGRAs on PB in differentiating active from latent TB have shown to be associated with low specificity in regions with high TB burden, as in Brazil. We agree with other previous results that do not suggest the use of IGRAs on PB to differentiate active and latent TB. Our results are in accordance with others which did not find benefits in the use of QFT-GIT on PF, with results of IFN- γ Mtb-specific antigens minus Nil/negative control showing the same behavior in TB and non-PITB groups. Neither the application of the same method for IP-10 showed significance. These results are possibly explained by the high basal levels of IFN- γ and IP-10 on tuberculous PF, leading to an increase lower than expected after *in vitro* antigen stimulation as they were already and naturally stimulated. Consequently, levels of Mtb-specific antigens minus Nil/negative control biomarkers on PF of TB patients did not show a substantial increase. Moreover, both IFN- γ and IP-10 basal levels proved to be good biomarkers to differentiate TB and non-TB pleural effusions and the use of QFT-GIT kit would only make the diagnosis of PITB unnecessarily more expensive.

In the last years, PF IFN- γ levels have been reported as a valuable diagnostic tool for PITB [7, 5, 27 – 30]. Our results are in accordance with previous reports, including two meta-analysis studies published in 2003 and 2007, which showed a wide range of values for IFN- γ (0.3 to 13 IU/mL) [28, 29]. Other investigations on PITB diagnosis evaluated the performance IFN- γ levels measured in pg/mL. Ambade *et al* [25] calculated a cut-off of 1,090 pg/mL to differentiate TB pleural effusions from non-PITB, with a Se = 88%, Sp = 85%. The levels generated by Liu *et al* [30] showed a best performance of this biological marker when compared to ADA to differentiate TB from malignant pleural effusions (IFN- γ : Cut-off = 70 pg/mL, AUC = 0.960, Se = 91.7%, Sp = 97.6%, PPV = 95.7%, NPV = 95.3%; ADA: Cut-off = 30 IU/L, AUC = 0.760, Se = 70.8%, Sp = 95.2%, PPV = 89.5%, NPV = 85.1%). IFN- γ

levels applied in a high burden setting for TB [7], presented a better performance than ADA and Xpert MTB/RIF, and based on a cut-off point of 107.7 pg/mL provided a Se of 92.5% and a Sp of 95.9% versus a 79% sensitive and 92.7% specific ADA (clinical cut point of 30 IU/L) and a 22.5% sensitive and 98% specific Xpert MTB/RIF®, which, in our sample, showed a positivity of 14.3% (Table S1). Thus, the comparison between different studies is impaired due to differences in the methods of estimations, units and cut-off values applied. Besides that, the results found in the present study are in agreement with previous reports which show IFN- γ as a better marker than ADA for the diagnosis of tuberculous pleurisy, and bringing IP-10 as an alternative method, although its poor performance.

IP-10, a relatively recent studied biomarker is a chemokine involved in trafficking monocytes and activated T-helper type 1 lymphocytes to the TB inflammation site [19, 31]. Previous studies summed 629 patients (304 with pleural TB) in whom IP-10 concentrations measured by ELISA, showed a mean sensitivity and specificity of 84% and 90%, respectively, to discriminate TB and non-PITB [32]. At a cut-off of 4,361.90 pg/mL, IP-10 was 75% sensitive and 82.6% specific in our sample. Dheda *et al* [33] calculated a ROC-derived cut-point of 28,170 pg/mL for IP-10, which missed approximately 20% of their TB cases and misdiagnosed another 20% of non-PITB cases. But when a lower cut-point (4,035 pg/mL) was used the NPV achieved 100%, which means that a negative test could exclude TB. Even though the average performance of IP-10, in accordance with Dheda's results, we presented a considerable number of false positives (5 malignancies, 1 endometriosis, 1 cardiac failure and 1 hepatic failure). In a study published in 2016, TB and malignant pleural effusions were compared using several biomarkers, including IFN- γ and IP-10 [34]. In their sample of 27 patients (5 pleural TB and 22 malignant pleural effusion), IP-10 presented the best AUC when compared to IFN- γ (AUC 0.950 and cut-off 4,005 pg/mL vs AUC 0.830 and 100.5 pg/mL), with both presenting the same sensitivity and specificity.

Tuberculous pleurisy is one of the most important differential diagnosis in cases with pleural effusion under investigation with high ADA levels [28]. Our results showed that tuberculous PF presented ADA levels 5 times higher than non-PITB effusions. A lower ADA cut-off point leads to a sensitivity of 100%, although a fall in specificity to 84.8%. The literature usually reports ADA levels between 30-60 IU/L for PITB diagnosis [25, 32]. Our value was slightly smaller than this range of values, even though other groups had reported values as low as 10 IU/L, 15 IU/L, 26 IU/L, 30 IU/L and 35 IU/L [2, 28, 35, 36]. There are also other reports suggesting that ADA values can vary according to age, protein, LDH and absolute lymphocyte count on PF, CD4 lymphocyte counts and geographic area [37 - 41] but these were not our scope. The use of a smaller ADA cut-point lead to seven false positive TB cases (2 systemic erythematous lupus, 2 lymphomas, 1 poorly differentiated cancer, 1 empyema, 1 undefined diagnosis) that could have been diagnosed with PITB if it was considered alone. These specific conditions are already known as possible false positive when it comes to PITB diagnosis using ADA and even the use of the standard cut-point of 40 IU/L generated 2 false positives PITB (1 systemic erythematous lupus and 1 empyema).

The combinatorial analysis of the biomarkers positivity showed an impressive good performance, in particular when IFN- γ plus ADA (25.8 IU/L) was analyzed. In the clinical practice, few studies used two or three assays in combination to improve their isolated diagnostic power for PITB: QFT-GIT plus polymerase chain reaction [42]; ADA plus lymphocyte percentage on PF [43]; QFT-GIT on PB, ADA and carcinoembryonic antigen (CEA) on PF [2]; T-SPOT.TB on PB and PF combined with ADA on PF [44]. In all cases, the diagnostic yield enhanced when at least two assays were combined. But, despite their performance, our results presented a better behavior, with cut-off point calculated based on a sample with very rigid criteria for PITB. To the best of our knowledge, we only found one study who tested the combination of IFN- γ plus ADA on PF. Keng *et al* [45], studied 88

patients only with lymphocytic pleural effusions and although they found a specificity of 100% when $ADA \geq 40$ IU/L and $IFN-\gamma \geq 75$ pg/mL were combined, their combination was poor accurate and sensitive (41.9% and 79.5%). In the same study, the authors also tested a new cut-off of 15.5 IU/L for ADA, which improved its performance. Maybe, if this lower cut-off was used, like we did in the present study, the combinatorial analysis with $IFN-\gamma$ could approximate their results with ours. Moreover, we also used neutrophilic pleural effusions, which can be encountered in tuberculous pleurisy, and even so our results were better than theirs.

Finally, the performance of an internal validation of the positive combinations in the non-confirmed PITB cases showed a sensitivity of 88.2% (15/17), when at least two biomarkers were used. The two exceptions were: i) an empiric case, woman, 22 years old, HIV negative, with an exudative and lymphocytic pleural effusion who had complete clinical and radiological improvement after TB treatment and who presented $IFN-\gamma$, IP-10, and $ADA_{(25.8 \text{ IU/L})}$ negative results. She also presented 36,000 red blood cells count in PF, which could have influenced the production and consequently, the measurement of these biomarkers; ii) a possible TB, woman, 19 years old, unknown HIV status, with an exudative and lymphocytic pleural effusion, with the highest ADA levels registered in the study (259 IU/L) and false negative results for $IFN-\gamma$ and IP-10.

Some limitations should be considered in our study. Pleural biopsies were not performed in all patients due to various reasons (old age, coagulopathy, a small amount of PF and refusal of consent the procedure). In two non-PITB cases (small cell lung cancer and renal failure) AFB smear and culture were lost, both showed all three biomarkers negative. Also, Xpert MTB/RIF® was performed only in 14 cases (seven each group, with only one case of positivity in the TB group), but as already reported, the sensitivity of molecular tests on pleural specimens is low [46 – 48]. Besides being offered, HIV status was only known in 59

subjects, with only 3 cases of positivity (one undefined pleural effusion with positive ADA and negative IFN- γ and IP-10, one renal failure with all three biomarkers negative, 1 probable TB with all the biomarkers positive). Between the 21 cases of unknown HIV status only one presented an indeterminate QFT-GIT on PB, which means that in 20 cases, besides the unknown immunological condition, they presented a positive response on mitogen tube which represents the positive response of lymphocytes of each patient. Finally, all measurements of IFN- γ and IP-10 were performed using the supernatant from QFT-GIT tubes, and not directly on PF without any processing.

In our study, as in previous data, PITB patients were more likely to be younger than non-TB ones (Table 1) [7, 15, 30]. Besides the clinical similarities between tuberculous and nontuberculous patients that were possibly related to the magnitude of effusion and to constitutional symptoms [15], time until diagnosis was higher in non-TB patients (Table 1). Tuberculous PF presented higher levels of total cell count, lymphocytic percentage, protein, albumin and DHL levels in the present study (Table 1) and also in previous data [15, 27, 49]. Moreover, we observed that unilateral pleural effusion was the most frequent radiological presentation among cases with TB (Table 1) in accordance to the previous publications [32, 50].

Of the three biomarkers analyzed in this study, IFN- γ showed the best performance. In addition, a lower cut-off point of ADA was identified as a perfect rule-in parameter to PITB, although showing lower specificity, when combined with IFN- γ it ensured the correct diagnosis in almost 99% of cases. The results should be extrapolated to countries with a similar prevalence of Brazil and be validated in different populations. Although measurements of IFN- γ are relatively expensive and not easily affordable, its use should be considered in future cost-effective studies which could balance the cost of a minimally

invasive exam *versus* invasive pleural biopsy procedures, time demanding culture results and the possible adverse effects due to empirical TB treatment.

In conclusion, IFN- γ , IP-10 and ADA levels were significantly higher in the PF from PITB than in non-PITB patients. IFN- γ is an excellent rule-in and rule-out test compared to IP-10 and ADA, whether used at its routine value of 40 IU/L or at a lower cut-off point calculated for the purposes of this study. The combination of IFN- γ and ADA (25.8 IU/L) showed to be particularly useful to clinicians as it prompts immediately treatment for TB when both biomarkers are positive or further investigation in cases of both negatives.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Domenico Capone, Dr. Walter Costa, and Dr. Hélio Siqueira, physicians of Tuberculosis Outpatient Clinics of HUPE/UERJ, which contributed in the medical care of the patients included in the study.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Available in: <http://www.who.int/tb>. Accessed on June 15, 2017
2. Liu Y, Ou Q, Zheng J, et al. A combination of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay and the detection of adenosine deaminase improves the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Emerg Microb & Infec* 2016; 5: e83
3. Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infectious Diseases* 2014; 14: 9
4. Trajman A, Pai M, Dheda K. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what Works and what does not? *Eur Respir J* 2008; 31: 1098-106
5. Lee LN, Chou CH, Wang JY, et al. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 173-9

6. Liu F, Gao M, Zhang X, et al. Interferon-Gamma Release Assay Performance of Pleural Fluid and Peripheral Blood in Pleural Tuberculosis. *PlosOne* 2013; 8 (12): 83857
7. Meldau R, Peter J, Theron G, et al. Comparison of same day diagnostic tools including Gene Xpert and unstimulated IFN- γ for the evaluation of pleural tuberculosis: a prospective cohort study. *BMC Pulm Med* 2014; 14: 58
8. Shimokata K, Saka H, Murate T, Hasegawa Y, Hasegawa T. Cytokine content in pleural effusion. *Chest* 1991; 99: 1103-7
9. Nemeth J, Winkler HM, Zwick RH, et al. Recruitment of Mycobacterium tuberculosis specific CD4⁺ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *J Int Med* 2008; 265: 163-8
10. Sutherland JS, Garba D, Fombah AE, Mendy-Gomez A, Mendy FS, et al. Highly Accurate Diagnosis of Pleural Tuberculosis by Immunological Analysis of the Pleural Effusion. *PLoS ONE* 2012; 7(1): e30324
11. Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, et al. Diagnosis and treatment of tuberculosis pleural effusion in 2006. *Chest* 2007; 131: 880-9
12. Light RW. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2010; 15(3):451
13. World Health Organization. Implementing tuberculosis diagnosis. Policy framework 2015. Available in: <http://www.who.int/tb>. Accessed on January 18, 2018
14. Losi M, Bossink A, Codecasa L, Jafari C, Ernst M, et al. Use of a T-cell interferon- γ release assay for the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Eur Respir J* 2007; 30: 1173-9
15. Dheda K, Zyl-Smit RN, Seche, LA, et al. Utility of quantitative T-cell responses *versus* unstimulated interferon- γ for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Eur Respir J* 2009; 34: 1118-26
16. Aggarwal AN, Agarwal R, Gupta D, et al. Interferon Gamma Release Assays for Diagnosis of Pleural Tuberculosis: a Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2451–9
17. Li ZZ, Qin WZ, Li L, Wu Q, Wang YJ. Accuracy of enzyme-linked immunospot assay for diagnosis of pleural tuberculosis: a meta-analysis. *Gen and Mol Res* 2015; 14 (3): 11672-80
18. Pang CS, Shen YC, Tian PW, et al. Accuracy of the interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy: an updated meta-analysis. *Peer J* 2015; 3: e951
19. Okamoto M, Kawabe T, Iwasaki Y, Hara T, Hashimoto N, et al. Evaluation of interferon- γ , interferon- γ -inducing cytokines, and interferon- γ -inducible chemokines in tuberculous pleural effusions. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 88-93

20. El Fenniri L, Toossi Z, Aung H, El Iraki G, Bourkkadi J, et al. Polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific effector memory CD4⁺ T cells at sites of pleural TB. *Tuberculosis* 2011; 91: 224–30
21. Kabeer BSA, Paramasivam P, Raja A. Interferon gamma and interferon gamma inducible protein-10 in detecting tuberculosis infection. *J Infec* 2012; 64 (6): 573-9
22. Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd edition. New York: Academic Press; 1974. p. 1092-99
23. Hiraki A, Aoe K, Matsuo K, et al. Simultaneous measurement of T-helper 1 cytokines in tuberculous pleural effusion. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 1172-7
24. Tiwari RP; Hattikudur NS, Bharmal RN, et al. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. *Tuberculosis* 2007; 87: 193-201
25. Ambade V, Arora B, Rai C, Nikumb SK, Basannar DR. Markers for differentiation of tubercular pleural effusion from non-tubercular effusion. *MJAFI* 2011; 67: 338-42
26. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, et al. Ex vivo Characterization of Early Secretory Antigenic Target 6 – Specific T Cells at Sites of Active Disease in Pleural Tuberculosis. *Clin Infec Dis* 2005; 40: 184-7
27. Aoe, K, Hiraki A, Murakami T, et al. Diagnostic significance of interferon- γ in tuberculous pleural effusions. *Chest* 2003; 123: 740-4
28. Greco S, Girardi E, Masciangelo R, Capocceta GB, Saltini C. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7 (8): 777-86
29. Jiang J, Shi HZ, Liang QL, Qin SM, Qin XJ. Diagnostic value of interferon- γ in tuberculous pleurisy. *Chest* 2007; 131: 1133-41
30. Liu YC, Lee SS, Shen YS, et al. Differential diagnosis of tuberculous and malignant pleurisy using pleural fluid adenosine deaminase and interferon gamma in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44: 88-94
31. Pokkali S, Das SD. Expression of CXC and CC type of chemokines and its receptors in tuberculous and non-tuberculous effusions. *Cytokine* 2008; 41: 307-14
32. Porcel JM. Advances in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Ann Transl Med* 2016; 4 (15): 282
33. Dheda K, Smit RN, Sechi L, et al. Clinical diagnostic utility of IP-10 and LAM antigen levels for the diagnosis of tuberculous pleural effusions in a high burden setting. *PLoS ONE* 2009; 4 (3): e4689
34. Chen KY, Feng PH, Chang CC, et al. Novel biomarker analysis of pleural effusion enhances differentiation of tuberculous from malignant pleural effusion. *Int J Gen Med* 2016; 9: 183-9

35. Helmy NA, Eissa SA, Masoud HH, Elessawy AF, Ahmed RI. Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous and malignant pleural effusion. *Egypt J Chest Dis Tubercul* 2012; 61 (4):413–7
36. Arnold DT, Bhatnagar R, Fairbanks LD, Zahan-Evans N, Clive AO, Morley AJ, et al. Pleural Fluid Adenosine Deaminase (PFADA) in the Diagnosis of Tuberculous Effusions in a Low Incidence Population. *PLoS One* 2015; 10 (2): e0113047
37. Niwa Y, Kishimoto H, Shimotaka K. Carcinomatous and tuberculous pleural effusions. *Chest* 1985; 87: 351-5
38. Baganha MF, Pego A, Lima MA, et al. Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic population. *Chest* 1990; 97: 605-10
39. Tay TR, Tee A. Factors affecting pleural fluid adenosine deaminase level and the implication on the diagnosis of tuberculous pleural effusion: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13: 546
40. Abrao FC, Abreu IR, Miyaki DH, et al. Role of adenosine deaminase and the influence of age on the diagnosis of pleural tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18: 1363-9
41. Lee SJ, Kim HS, Lee SH, et al. Factors influencing pleural adenosine deaminase level in patients with tuberculous pleurisy. *Am J Med Sci* 2014; 348: 362-5
42. Gao Y, Ou Q, Huang F, et al. Improved diagnostic power by combined interferon-gamma release assay and nested-PCR in tuberculous pleurisy in high tuberculosis prevalence area. *FEMS Immunol Med microbiol* 2012; 66: 393-8
43. Garcia-Zamalloa A, Taboada-Gomez J. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase and lymphocyte proportion in pleural fluid for tuberculous pleurisy in different prevalence scenarios. *PLoS ONE* 2012; 7: e38729
44. Xu HY, Li CY, Su SS, et al. Diagnosis of tuberculous pleurisy with combination of adenosine deaminase and interferon- γ immunospot assay in a tuberculosis-endemic population. *Medicine* 2017; 96: 47
45. Keng LT, Shu CC, Chen JY, et al. Evaluating pleural ADA, ADA2, IFN- γ and IGRA for diagnosing tuberculous pleurisy. *J Infect* 2013; 67: 294-302
46. Lusiba JK, Nakiyingi L, Kirenga BJ, et al. Evaluation of Cepheid's Xpert MTB/RIF test on pleural fluid in the diagnosis of pleural tuberculosis in a high prevalence HIV/TB setting. *PLoS ONE* 2014; 9: e102702
47. Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, et al. *BMC Infec Dis* 2014; 14: 709
48. Sehgal IS, Dhooria S, Aggarwal NA, et al. Diagnostic performance of Xpert MTB/RIF in tuberculous pleural effusion: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 1133-6

49. Choi H, Chon HR, Kim K, et al. Clinical and laboratory differences between lymphocyte and neutrophil-predominant pleural tuberculosis. PLoS ONE 2016; 11 (10): e0165428
50. Bielsa S, Palma R, Pardina M, et al. Comparison of polymorphonuclear and lymphocyte rich tuberculous pleural effusions. Int J Tuberc Lung Dis 2013; 17: 85-9

Supporting Information

Table S1 Results with classical methods for pleural tuberculosis diagnosis in the study population

Method	Non-Pleural Tuberculosis (%)	Pleural Tuberculosis (%)	<i>p</i>
Mtb culture on PF (N=76)*			
Positive	0	9.7	0.1
Negative	100	90.3	
Mtb culture on PT (N=11)*			
Positive	0	22.2	0.04
Negative	100	66.7	
Contamination	0	11.1	
Xpert MTB/Rif® on PF (N=14)*			
Positive	0	14.3	0.44
Negative	100	85.7	
Pleural biopsy (N=39)*			
Granuloma	4.8	61.1	<0.0001
Without granuloma	95.2	38.9	
ADA (N=79)*			
Positive	4.3	81.8	<0.0001
Negative	95.7	18.2	

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*; PF: Pleural fluid; PT: Pleural tissue; ADA: Adenosine deaminase.

* Number of cases submitted to diagnostic method

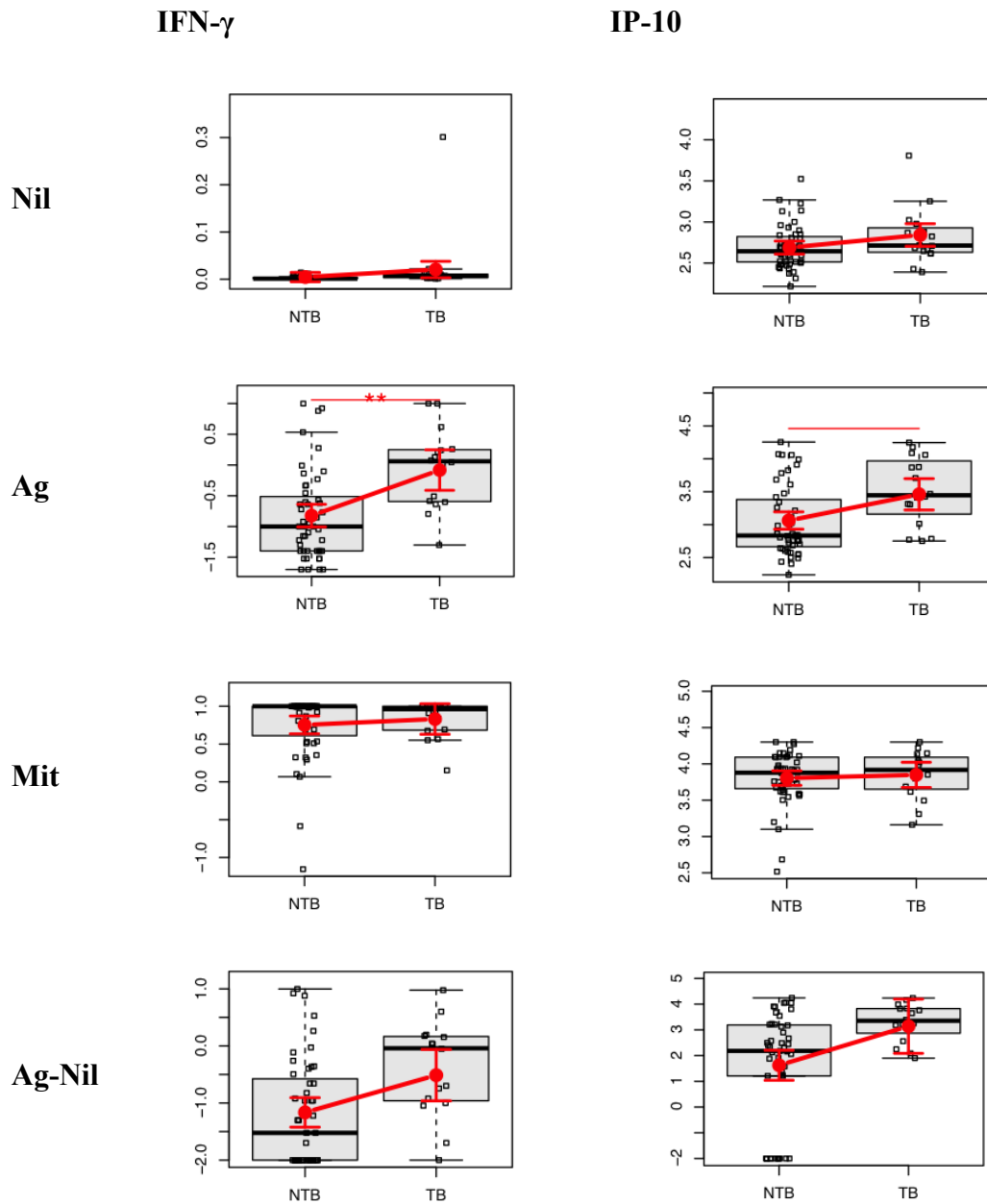


Figure S1 Concentration of IFN- γ , IP-10, and ADA in peripheral blood. Both biomarkers were measured on peripheral blood in the supernatants of QFT-GIT. Obtained levels from each biomarker were analyzed in a logarithmic scale and illustrated using boxplots to compare the groups: Non-PITB (N = 47) and PITB (n=33). Small black dots represent individual cases and box plots represent the interquartile range and sample median (central solid gray line). Bigger red dots and vertical bars represent linear model estimated adjusted means and 95% confidence intervals (CI 95%). PITB: Pleural tuberculosis; Non-PITB: Non-pleural tuberculosis; Nil: Negative control tube; Ag: *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen tube; Mit: Mitogen tube; * p = 0.001; ** p < 0.0001.

4.2 Artigo 2: *Hyporexia and cellular/biochemical characteristics of pleural fluid as predictive variables on a model for pleural tuberculosis diagnosis (Artigo submetido)*

Ana Paula Santos¹, Marcelo Ribeiro-Alves², Raquel da Silva Corrêa³, Isabelle Ramos Lopes³, Mariana Almeida³, Janaína Leung¹, Luciana Silva Rodrigues³, Rogério Rufino¹

¹ Pulmonary Care Department, Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro (UERJ), 20551-030, RJ, Brazil.

² Laboratory of Clinical Research on STD/AIDS, National Institute of Infectology Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), 21041-361, RJ, Brazil.

³ Immunopathology Laboratory, Medical Sciences Faculty (FCM), State University of Rio de Janeiro (UERJ), 20551-030, RJ, Brazil.

Submetido à Pulmonary Medicine em 06 de janeiro de 2019.

O artigo foi escrito na língua inglesa e submetido à um periódico classificado como B1 pela Plataforma Sucupira.

Neste artigo, por meio de uma análise retrospectiva com coleta de dados de pacientes com TBPI confirmada por critérios microbiológicos, histopatológicos ou de ADA ao longo de nove anos no Hospital Universitário Pedro Ernesto, foi criada um modelo preditivo baseado em árvore de decisão utilizando três variáveis clínicas e laboratoriais passíveis de utilização mesmo em unidades básicas de saúde. O rendimento da aplicação da árvore de decisão nos casos de TBPI confirmados revelou valores de Se, Sp e acurácia de 89,2%, 84,5% e 87,6%, respectivamente. O modelo foi validado nos casos de TBPI empíricos revelando uma *performance* semelhante e concluindo que o modelo pode ser utilizado como método alternativo para o diagnóstico de TBPI usando dados clínicos simples e características celulares e bioquímicas do LP, que são acessíveis e facilmente realizadas mesmo em unidades básicas de saúde.

O artigo é transcrito abaixo conforme o padrão da revista Pulmonary Medicine.

Hyporexia and cellular/biochemical characteristics of pleural fluid as predictive variables on a model for pleural tuberculosis diagnosis

Ana Paula Santos¹, Marcelo Ribeiro-Alves², Raquel da Silva Corrêa³, Isabelle Ramos Lopes³, Mariana Almeida³, Janaína Leung¹, Luciana Silva Rodrigues³, Rogério Rufino¹

¹ Pulmonary Care Department, Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro (UERJ), 20551-030, RJ, Brazil.

² Laboratory of Clinical Research on STD/AIDS, National Institute of Infectology Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), 21041-361, RJ, Brazil.

³ Immunopathology Laboratory, Medical Sciences Faculty (FCM), State University of Rio de Janeiro (UERJ), 20551-030, RJ, Brazil.

Correspondence should be addressed to Ana Paula Santos; dra.anapsantos@globocom

Abstract

Background and objectives: Pleural tuberculosis (PITB) diagnosis is a challenge due to its paucibacillary nature and the need of invasive procedures. We aimed to identify easily available variables and build a predictive model for PITB diagnosis which may allow earlier and affordable alternative strategy to be used in basic health care units. *Methods:* An observational case-control study compared PITB and non-TB patients followed at a tertiary/referral Brazilian hospital between 2010-2018. Unconditional logistic regression analysis was performed and a decision tree classifier (DTC) model was validated and applied in additional PITB patients with empiric diagnosis. The accuracy (Acc), sensitivity (Se), specificity (Sp), positive and negative predictive values were calculated. *Results:* From 1,135 TB patients, 160 were considered for analysis (111 confirmed PITB and 49 non-confirmed PITB). Fifty-eight non-TB patients were enrolled as controls. Hyporexia [adjusted *odds ratio* (aOR) 27.39 (95% CI 6.26 – 119.89)] and cellular/biochemical characteristics on pleural fluid (PF) (polimorphonuclear in two categories: 3-14% aOR 26.22, 95% CI 7.11 – 96.68 and < 3% aOR 28.67, 95% CI 5.51 – 149.25; and protein \geq 5g/dL aOR 7.24, 95% CI 3.07 – 17.11) were associated with higher risk for TB. The DTC constructed using these variables showed an Acc of 87.6%, Se of 89.2%, Sp of 84.5% for PITB diagnosis and was successfully applied in non-confirmed PITB patients. *Conclusions:* The DTC model developed in an area of high prevalence for TB showed an excellent performance for PITB diagnosis and can be considered as an alternative diagnostic strategy by using clinical patterns in association with PF cellular/biochemical characteristics, which are affordable and easily performed in basic health care units.

Introduction

Tuberculosis (TB) is a major public health problem worldwide [1]. Among extrapulmonary TB cases, pleural tuberculosis (PITB) is the most common presentation, summing 42% of them [2,3]. Besides its frequency, PITB diagnosis can be a challenge due to the paucibacillary nature of patients' biological samples and the need for invasive procedures [4].

The Ziehl Neelsen (ZN) stain and the *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) culture of pleural fluid (PF) and/or pleural tissue (PT) are the gold standard methods for tuberculous pleural effusion diagnosis but their success rates are relatively poor [5]. The identification of granuloma with caseous necrosis in histopathological examination of the PT is also considered as diagnostic criteria [6]. However pleural biopsy, besides being invasive, is operator dependent, relatively expensive, may be limited by clinical contraindications and associated with complications [7-9]. Adenosine deaminase (ADA) measurement in pleural effusion can give a putative diagnosis of PITB in high prevalence settings, considering that high ADA levels can also be observed in other infectious, inflammatory or malignant diseases [6,10,11]. Also, the evaluation of biomarkers on PF configures an alternative for TB diagnosis [12-14]. Recently we have shown that interferon-gamma (IFN- γ) is an excellent rule-in and rule-out test compared to other two biomarkers (interferon-gamma inducible protein 10 kD and ADA) and the combination of IFN- γ and ADA, in a reviewed cut-off point, showed to be particularly useful to PITB confirmation or exclusion of diagnosis [15]. However, these methods can be available at reference centers, while basic health care units can not count on them.

In order to surpass the limitations stated above, which compels the practice of a not uncommon empiric diagnosis based on clinical and radiological criteria, as previously published [16-19], we proposed the application of conventional biochemical and cellular data of PF, which lacks specificity when isolated applied [4], but when associated with clinical variables could discriminate between definite PITB and non-TB. For this purpose, we validated a predictive model, which was applied for empiric PITB cases in order to perform an internal validation.

Material and Methods

Study design and data collection

The study started after approval of ethics committee of Pedro Ernesto University Hospital from Rio de Janeiro State University (HUPE/UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil (approval number: 2612/2010). Then, an observational case-control study was conducted based on the data of medical records recovered of patients with pleural effusion under investigation attended between January 2010 and January 2018 at HUPE.

All patients with PITB diagnosis were attended at the Outpatient Clinic of Tuberculosis of HUPE. Patients with age below 18 years and those with TB treatment

outcomes that could not allow treatment response (default, failure and transference for another health unit) were excluded. Patients with non-TB pleural effusion were considered as controls and were drawn from the the Outpatient Clinic of Pleural Diseases of the same hospital.

We reviewed the medical records of all patients in order to evaluate physical, clinical and demographic information, medical history and laboratorial data. Signs and symptoms such as cough, fever, chest pain, dyspnea, night sweats, hyporexia and weight loss were included according subjective reported presence and duration. HIV status and other comorbidities were also recorded. Data on PF routine diagnostic tests, including chemistry panel, total and differential cell count, ADA measurement, cytopathology, and microbiological analysis (ZN and Lowenstein Jensen solid media culture) were registered. In those cases where pleural biopsy with Cope's needle was performed we registered histopathology analysis, acid-fast bacilli (AFB) staining and mycobacterial culture results.

Diagnostic criteria

PITB was stratified as follows: 1. Confirmed PITB (C-PITB): ZN stain positive or isolation of *Mycobacterium tuberculosis* on respiratory specimen, PF or PT, or identification of granuloma with/without caseous necrosis on PT histopathological analysis, or patients with clinical manifestations of PITB (fever, chest pain, dyspnea, cough night sweats, hyporexia and/or weight loss) and a lymphocytic and exudative pleural effusion with ADA dosage above 40 IU/L that fully recover after at least 6 months of antituberculous treatment; 2. Non-confirmed PITB (NC-PITB): cases with clinical manifestations of PITB (as above) that do not fill the criteria of confirmed PITB and that fully recover after at least 6 months of antituberculous treatment.

Non-tuberculosis (Non-TB) patients were defined as those with pleural or pleuropulmonary diseases other than TB with its diagnoses based on clinical, laboratory, radiological, microbiological or cytopathological/histopathological features.

Statistical analysis

Descriptive and logistic regression analysis

Categorical and continuous data were presented in frequency (percentage) and median and interquartile range (IQR), respectively. Fisher Exact Test and T-test were used for group comparisons.

Simple and multiple unconditional logistic regression analysis were performed and *odds ratios* (OR) and adjusted OR (aOR) with its 95% confidence interval (95% CI) were calculated. The level of significance used was of 0.05.

Decision Trees Classifier Model

Decision trees classifier (DTC) was selected as predictive model because it allows a clear and easy interpretation of the rules, and it was built with an implementation of the Quinlan's C4.5 algorithm available in the packages 'rpart' version 4.1-10 for the open source software R version 3.3.1 [20]. DTC was built with cases of C-PITB and non TB in a subset of nine [viral hepatitis, fever, dyspnea, hyporexia, weight loss, percentage of polymorphonuclear (PMN) cells, percentage of mononuclear (MN) cells, protein and albumin on PF] of 22 variables pre-selected (age, diabetes mellitus, renal failure, cardiac failure, cancer, previous transplant, viral hepatitis, autoimmune disease, immunosuppressive treatment, fever, cough, chest pain, dyspnea, weight loss, hyporexia, night sweating, chest X ray, percentage of PMN cells, percentage of MN cells, protein and albumin on PF) by successively eliminating at least 20% important variables (with importance as returned from random forest) using the out-of-bag error as minimization criterion from random forest (number of trees equal to 1,000) classifiers implemented in the R package 'varSelRF' version 0.7-5. The fitted tree was pruned in order to minimize the expected 10-fold cross-validation prediction accuracy. Pruning included a complexity parameter of 0.25, informing the algorithm that any split which does not improve the fit by 25% will likely be pruned off by 10-fold cross-validation, and that hence the algorithm need not pursue it. Also, performance of the built DTC was estimated by its leave-one-out cross-validation accuracy (Acc), sensitivity (Se), specificity (Sp), positive (PPV) and negative predictive values (NPV) and false-positive and negative ratios ratios with 95% CI and area under the receiver operating characteristics (ROC) curve (AUC).

Results

General population

From January 2010 to January 2018, 1,135 patients were identified and treated for active TB at HUPE. Of these, 397 cases had an extrapulmonary presentation of TB and 212 of them (53%) had PITB, being 160 considered for analysis. The other 52 patients were excluded according the exclusion criteria. The 58 non-TB cases included: 34 malignancies (16 adenocarcinoma, 4 lymphoma, 2 carcinoma, 1 spindle epithelial, 11 non-specified cell types), 11 renal/cardiac failure, 4 empyemas, 2 systemic lupus erythematosus, 1 hepatic disease, 1 chylothorax and 5 cases of undefined pleural effusion (Fig 1).

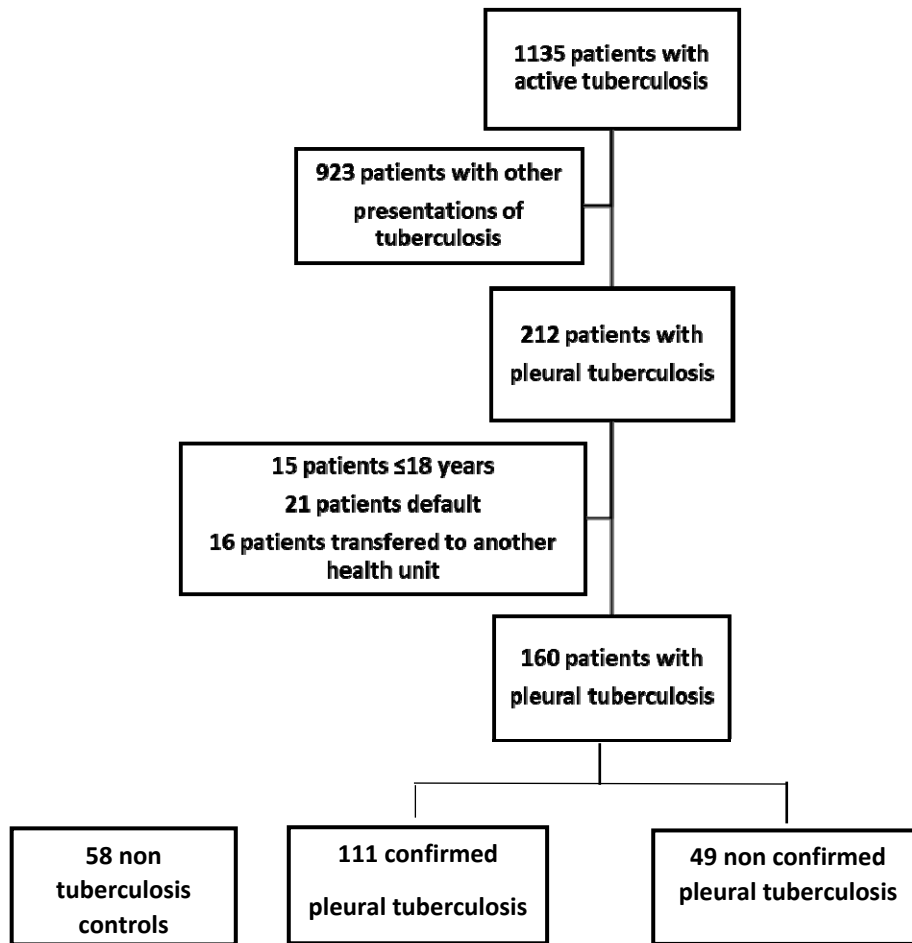


Figure 1: Flowchart of the study design. Pleural tuberculosis according the eligibility criteria and non-TB cases considered as controls.

The sociodemographic and clinical characteristics from all patients are shown in table 1. TB patients were younger than non-TB and were less likely to present other comorbidities such as cancer, cardiac failure, viral hepatitis and previous transplant. Also, fever, chest pain, hyporexia, weight loss and night sweats were more frequently observed in PITB cases, as well as higher levels of ADA dosage, mononuclear cells percentage, protein and albumin levels and lower polymorphonuclear cells percentage. Confirmed and non-confirmed PITB were homogeneous unless for age (Table 1).

Table 1: Baseline characteristics of the study population. Univariate analysis were performed comparing PITB and non-TB groups. Also confirmed and non-confirmed PITB groups were compared.

	Non TB	PITB		NTB vs TB	<i>p</i> C-PITB vs NC-PITB
	(58) N (%)	Confirmed (111) N (%)	Non Confirmed (49) N (%)		
Sex, %					
Male	32 (55.2)	64 (57.7)	30 (61.2)		
Female	26 (44.8)	47 (42.3)	19 (38.8)	0.64	0.73
Age, years					
Median (IQR)	62 (49-73)	43 (30-53)	32 (25-48)	< 0.0001	0.004
HIV status, %					
Positive	2 (3.4)	1 (0.9)	3 (6.1)		
Negative	37 (63.8)	66 (59.5)	29 (59.2)		
Refuse testing	-	2 (1.8)	1 (2.0)	0.68	0.26
Unknown	19 (32.8)	42 (37.8)	16 (32.7)		
Previous comorbidities, %					
Arterial Hypertension	17 (29.3)	25 (22.5)	6 (12.2)	0.27	0.28
Diabetes mellitus	8 (13.8)	9 (8.1)	2 (4.1)	0.29	0.27
Chronic Renal Failure	4 (6.9)	4 (3.6)	2 (4.1)	0.59	0.83
Cancer	10 (17.2)	2 (1.8)	1 (2.0)	< 0.0001	0.83
Cardiac Failure	7 (12.1)	-	1 (2.0)	< 0.0001	0.26
COPD / Asthma	2 (3.4)	1 (0.9)	-	0.27	0.67
Previous transplant	4 (6.9)	-	1 (2.0)	0.02	0.26
Autoimmune disease	2 (3.4)	6 (5.4)	3 (6.1)	0.79	0.82
Viral hepatitis	5 (8.6)	-	1 (2.0)	0.006	0.26
Immunosuppressive therapy	5 (8.6)	5 (4.5)	6 (12.2)	0.91	0.07
Signs/symptoms, %					
Fever	13 (22.4)	83 (74.8)	36 (73.5)	< 0.0001	0.63
Cough	29 (50)	65 (58.6)	30 (61.2)	0.41	0.54
Chest pain	25 (43.1)	71 (64.0)	26 (53.1)	0.04	0.41
Dyspnea	43 (74.1)	66 (59.5)	28 (57.1)	0.09	0.47
Hyporexia	2 (3.4)	57 (51.4)	22 (44.9)	< 0.0001	0.56
Weight loss	20 (34.5)	69 (62.2)	35 (71.4)	< 0.0001	0.13
Night sweats	10 (17.2)	58 (52.3)	22 (44.9)	< 0.0001	0.53
Duration of signs/symptoms, Days					
Median (IQR)	75 (30-180)	30 (20-60)	30 (17-90)	0.001	0.94
PF Characteristics					
Median (IQR)					
Total cell count, mm³	1135 (500-2600)	2305 (795-3875)	2435 (1300-3800)	0.72	0.65
Mononuclear, %	78 (56-90)	95 (90-98)	85 (70-95)	< 0.0001	0.44
Polimorphonuclear, %	20 (10-41)	5 (2-10)	15 (5-30)	< 0.0001	0.43
Total protein, g/dL	4.2 (3.6-5.3)	5.5 (5.0-5.9)	5.5 (5.1-6.3)	< 0.0001	0.44
Albumin, g/dL	2.6 (2.0-3.1)	2.9 (2.6-3.2)	2.9 (2.9-3.3)	0.006	0.19
LDH, UI/L	210 (137-697)	411 (256-780)	513 (324-727)	0.25	0.73
ADA, IU/L					
Median (IQR)	39 (24.5-74.5)	71.5 (46.5-93.2)	-	0.008	-
Chest Xray					
UPE	41 (70.7)	73 (65.8)	32 (65.3)		
BPE	9 (15.5)	3 (2.7)	1 (2.0)		
UPE + Pulmonary infiltrates	6 (10.3)	28 (25.2)	15 (30.6)	0.001	0.78
BPE + Pulmonary infiltrates	1 (1.7)	1 (0.9)	-		
Missing data	1 (1.7)	6 (5.4)	1 (2.0)		

PITB: Pleural tuberculosis; C-PITB: Confirmed pleural tuberculosis; NC-PITB: Non confirmed pleural tuberculosis IQR: Interquartile range; HIV: Human immunodeficiency virus; PF: Pleural fluid; UPE: Unilateral pleural effusion; BPE: Bilateral pleural effusion; LDH: Lactate dehydrogenase; ADA: Adenosine deaminase

Variables associated with PITB diagnosis using logistic regression models

Compared to non-TB, younger confirmed PITB patients presented higher risk for TB diagnosis (30 – 44 years: OR 4.6, 95% CI 1.63 – 12.99; 18 – 29 years: OR 6.16, 95% CI 1.79 – 21.16). This association persisted in multiple unconditional logistic analysis adjusting for gender, comorbidities, signs/symptoms, radiological appearance and cytological and biochemical pleural fluid analysis (Table 2).

Fever, chest pain, weight loss and hyporexia were the signs/symptoms considered as risk factors for C-PITB. Of these, hyporexia showed the highest aOR [27.39 (95% CI 6.26 – 119.89)]. Cytological characteristics on PF showed reverse behaviours, where the less the percentage of PMN cells the greater the chance of being diagnosed with pleural TB (PMN 3 – 14% aOR 8.78, 95% CI 3.35-22.97 and PMN < 3% aOR 28.67, 95% CI 5.51-149.25) and the higher the percentage range of MN the greater the chance of pleural TB diagnosis (MN 85 – 97.5% aOR 9.04, 95% CI 3.34 – 24.42 and MN \geq 97.5% aOR 33.67, 95% CI 6.26 – 181.01). Even missing data categories were included for these analyses were were associated with PITB diagnosis. Protein levels above 5g/dL was also identified as a risk factor for the infectious disease (aOR 7.24, 95% CI 3.07 – 17.11) (Table 2).

Table 2: Analysis of clinical, radiographic and laboratorial features in multiple unconditional logistic regression models for pleural tuberculosis

Features	Odds Ratio (95%CI)	Adjusted Odds Ratio (95% CI)	<i>p</i>
Gender			
Male	1	1	
Female	0.9 (0.48-1.71)	1.09 (0.54-2.21)	0.80
Age			
60 – 74 yrs	1	1	
≥ 75 yrs	0.29 (0.08-1.06)	0.2 (0.05-0.82)	0.02
45 – 59 yrs	1.66 (0.68-4.04)	1.25 (0.47-3.34)	0.65
30 – 44 yrs	4.6 (1.63-12.99)	5.02 (1.53-16.54)	0.008
18 – 29 yrs	6.16 (1.79-21.16)	6.31 (1.54-25.93)	0.01
Comorbidities			
Diabetes Mellitus	0.55 (0.2-1.5)	0.53 (0.18-1.56)	0.25
Cancer	0.09 (0.02-0.41)	0.07 (0.01-0.36)	0.001
Autoimmune disease	1.59 (0.31-8.12)	1.39 (0.27-7.23)	0.70
Renal failure	0.5 (0.12-2.08)	0.52 (0.11-2.5)	0.41
Immunosuppressive therapy	0.5 (0.14-1.79)	0.4 (0.11-1.47)	0.16
Fever	11.66 (5.37-25.3)	10.43 (4.62-23.58)	< 0.0001
Cough	0.7 (0.36-1.36)	0.67 (0.32-1.37)	0.27
Chest pain	2.51 (1.28-4.9)	3.32 (1.57-6.99)	0.002
Dyspnea	2.23 (1.05-4.71)	2.03 (0.89-4.61)	0.09
Weight loss	3.18 (1.61-6.25)	3.13 (1.51-6.49)	0.002
Hyporexia	30.83 (7.14-133.07)	27.39 (6.26-119.89)	< 0.0001
Night sweats	5.44 (2.48-11.92)	7.07 (2.87-17.43)	< 0.0001
PMN % in PF			
≥ 15%	1	1	
3 – 14%	7.31 (3.1-17.2)	8.78 (3.35-22.97)	< 0.0001
< 3%	29.23 (6-142.5)	28.67 (5.51-149.25)	0.0001
Missing data	55.54 (11.73-262.99)	58.45 (11.34-301.32)	< 0.0001
MN % in PF			
< 85%	1	1	
85 – 97.4%	7.31 (3.02-17.67)	9.04 (3.34-24.42)	< 0.0001
≥ 97.5%	34 (6.76-171.04)	33.67 (6.26-181.01)	< 0.0001
Missing data	64.6 (13.21-315.85)	66.61 (12.65-350.84)	< 0.0001
Total protein in PF (g/dL)			
< 5.0	1	1	
≥ 5.0	6.32 (2.91-13.7)	7.24 (3.07-17.11)	< 0.0001
Missing data	86.32 (11.03-675.53)	69.69 (8.76-554.25)	0.0001

CI: Confidence interval; UPE: Unilateral pleural effusion; BPE: Bilateral pleural effusion; PMN: Polymorphonuclear cells; PF: Pleural fluid; MN: Mononuclear cells; Non calculated

Decision Tree Classifier application on pleural TB diagnosis

Of the 22 variables pre-selected (age, diabetes mellitus, renal failure, cardiac failure, cancer, previous transplant, viral hepatitis, autoimmune disease, immunosuppressive treatment, fever, cough, chest pain, dyspnea, weight loss, hyporexia, night sweating, chest X ray, percentage of PMN cells, percentage of MN cells, protein and albumin on PF), the model chose 9 to build the DTC, including viral hepatitis, fever, dyspnea, hyporexia, weight loss, percentage of PMN cells, percentage of MN cells, protein and albumin on PF. By the end of the analysis, the pruned DTC used only three predictive variables for PITB discrimination: PMN cells and protein in pleural effusion and hyporexia.

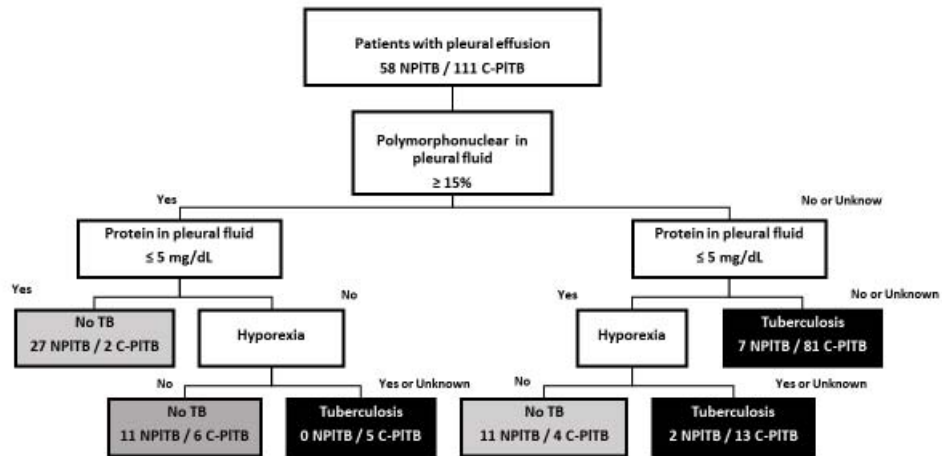


Figure 2: Discrimination between confirmed pleural tuberculosis and non-TB cases according to the decision tree classifier. Graphical representation of a decision tree classifier where the terminal branches filled gray were classified as non-TB and filled black terminal branches were classified as TB. The numbers inside the branches are the original diagnosis and their false positive results.

Figure 2 displays the DTC built to discriminate C-PITB from non-TB patients. Based on these 3 variables results, in 21 cases (12 PITB and 9 non-TB) the diagnostic classification of the DTC was mistaken. In these cases, the results of microbiological tests, PT biopsy and ADA dosage were of extremely importance for differential diagnosis.

With an area under the ROC curve of 88.7, the DTC proved to be 90.23% accurate with a Se of 92.47% (95% CI 88.99-95.95%) and a Sp of 87.6% (95% CI 84.4 – 90.7) (Table 3). The performance of the DTC applied for NC-PITB classification in order to perform an internal validation was 88.8% accurate, 93.9% sensitive and 84.5% specific (Table 3).

Noteworthy, almost 90% of the cases would be correctly treated just by applying the DTC as a diagnostic tool and using variables which can be afforded and performed in basic care health system.

Table 3: Performance characteristics of the decision tree analysis for definitive and empiric PITB cases.

	Confirmed Pleural Tuberculosis (95% CI)	Non Confirmed Pleural Tuberculosis (95% CI)
Accuracy	87.6 (84.4 – 90.7)	88.8 (84.8 – 92.8)
Sensitivity	89.2 (85.5 – 92.8)	93.9 (89.4 – 98.4)
Specificity	84.5 (78.5 – 90.4)	84.5 (78.2 – 90.7)
Positive predictive value	91.7 (88.4 – 95)	83.6 (77.1 – 90.2)
Negative predictive value	80.3 (74 – 86.7)	94.2 (90 – 98.5)
Area under ROC curve	88.7	90.1

CI: Confidence interval; ROC: Receiver operating characteristic

Discussion

The challenge of differentiating tuberculous pleural effusion from non-TB etiology, encouraged a great number of other studies in order to develop tools for differentiating PITB from other entities using scoring systems, decision tree classifiers and artificial neural networks [21-27]. Our DTC behaved as well as them, with an excellent accuracy and besides that we consider that our model, with only three predictive variables, and applied to a wide spectrum of patients, is easier to be used in clinical practice. Moreover, the DTC presented here was validated using an independent sample of patients, leading to a correct classification of almost 90% of cases.

In this study, a DTC model was built with an excellent accuracy for discriminating PITB in an area with high incidence of TB. The performance of the DTC was similar when either applied on confirmed PITB or on non-confirmed PITB cases, with sensitivity higher than 89%, for both groups. Noteworthy, the sensitivity of the proposed DTC model is much higher than either microbiological or histopathological analysis of pleural specimens for TB diagnosis [5,28]. Moreover, the decision tree presented here can also be considered as an alternative to ADA dosage, given the various performances of ADA for PITB diagnosis [11,29,30] and the lack of availability of the test in some scenarios. Also, doctors would be more confident to initiate anti TB therapy in cases empirically diagnosed because classically used methods could not define the diagnosis just by using this DTC.

To the best of our knowledge, until now, there are only two studies published that proposed DTCs which could be used in clinical practice [26,27]. In 2008, a model was used to discriminate between tuberculous and malignant pleural effusions based on four parameters: age > 35 years, ADA > 38 IU/L, temperature and LDH on pleural fluid [26]. This model was

92.2% sensitive and 98.3% specific, and the validation using an independent sample showed a sensitivity of 85% and a specificity of 97%. Even though TB and cancer are the two most frequent causes of exudative pleural effusions [31], other etiologies must be excluded during pleural diseases investigation. In our study, among the 58 non-TB patients, 41.4% had other etiologies than cancer.

Valdés *et al* [27] proposed a DTC to classify PF as tuberculous or non-tuberculous. The first model included PF lymphocyte count $> 31.5\%$ and ADA > 35 IU/L with a mean accuracy of 99%. Then, in order to be applied on institutions without the availability of ADA, a second model including PF lymphocyte count $> 31.5\%$, fever and cough, showed to be less accurate than the first one. In this research, only patients under 40 years old were included, while our study population included patients from 18 to 89 years and more than 50% were older than 45.

Polimorphonuclear cells percentage was identified by our statistical model instead of MN cells to be included in the decision tree classifier, although lymphocytic PF are commonest among tuberculous pleural fluid [9]. However, in many cases, PMN rather than MN are the predominant cell type in pleural effusion of TB cases, specially during the earlier phases of pleural inflammatory process, as shown by Jeon *et al* [9]. According to Lyadova [32], among immune cell populations, playing a dual role during TB pathophysiology, probably the least understood are neutrophils. It is already known that they participate in the generation of the acquired immunity and granuloma formation and may kill Mtb. But, at the same time, the cells can support mycobacterial growth, have been implicated in the transition from infection to active TB, mediate tissue destruction, disease severity and progression [32]. However, recent published studies [33-36], showed that TB disease alters neutrophil population, leading to the accumulation of heterogeneous subsets of immature and activated dysfunctional cells with a decline in true neutrophils.

Based on the observations pointed in the present study, it would be relevant do not reduce the importance of lymphocytes but bring out the role of neutrophils in the diagnosis of TB. In our series, 13 C-PITB cases (12%) had a percentage of neutrophils higher than 15%. Lin *et al* [37] casuistry showed that among 354 pleural TB effusion, 39 (11%) presented a PMN predominant in the pleural fluid. Interestingly, these patients presented a high mortality rate and a high risk for transmission.

Moreover, in our study, the addition of pleural fluid protein on the DTC helped in the correct discrimination of PITB, considering that according to Choi *et al* [38], PITB with predominant PMN in PF showed a more intense inflammatory response with higher level of total protein and albumin. As already published in the literature, since Light's criteria, an exudative pleural effusion is characteristic of inflammatory pleural diseases, including TB [39]. Our findings can be compared to those of Samanta *et al* [30] that showed higher levels of total protein and albumin on pleural effusion of TB patients than in lung cancer patients.

All of the commonest signs and symptoms of PITB and of other prevalent pleural diseases, namely fever, cough, chest pain, dyspnea, hyporexia, weight loss and night sweat, were considered in the training of the DTC here proposed. Among them, only hyporexia was preserved in the final model. This symptom also showed the highest aOR for PITB in the multiple unconditional logistic regression and was included in the DTC model (Figure 2). Our

literature search did not find any other publications which identified hyporexia as the most important clinical presentation for TB diagnosis among the other classical signs/symptoms.

There were some limitations of our study, most of which were attributable to the use of information from a retrospective cohort. We were dependent on documentation and interpretation of data in the medical records. However, data were reported in medical records according to standard questionnaires, by the attending physicians of the university institution, where physicians, nurses and students are trained to document data that could be used for research. Despite this, many missing data regarding biochemical and cellular characteristics of PF (40 cases) were registered. Besides that, the absence of data, like could happen in real life, was included in the DTC. Maybe, with more results available our model could present a higher accuracy. Also, the majority of non-TB cases had cancer (58.6%), with a minority of cases composed by less frequent pleural conditions such as empyema and auto immune diseases. Finally, but not a limitation of our study, but of the DTC model proposed itself, TB prevalence can affect the performance of this model in different settings and should be used with caution in low-prevalence settings.

Recently, clinical pathways have been used to optimize patient care for specific clinical conditions. Mummadi and Hahn [40], published their experience with the application of what they called “pleural pathway” in an institution at USA. They concluded that this “pleural pathway” and a centralized pleural service are associated with reduction in case charges, inpatient admissions, and length of stay for pleural conditions. We believe that the decision tree demonstrated in this article could be included in a “pleural pathway”, in order to organize steps of diagnosis, without neglecting the possibility of less frequent presentations of tuberculous pleural fluid.

The DTC based on PF cellular and biochemical characteristics does not replace microbiological tests for TB. Its disadvantage is the failure to provide microbiological confirmation and antituberculous sensitivity tests. Thus, we still advocate that pleural fluid and respiratory specimen should also be obtained whenever possible. Additionally, pathological analysis of pleural fluid and fragment may be indicated for cases with high suspicion of cancer [26,41]. However, the variables selected by this model can be easily available in primary health care units, which can not count on ADA’s dosage for PITB diagnosis in a routine basis.

Conclusions

In conclusion, the DTC model proposed in this study could identify PITB cases based on only three simple predictive variables that are easily available and collect in basic health care units, with a mean accuracy of almost 90%. ADA, microbiological and pathological analysis of pleural fluid should also be obtained whenever possible. Additionally, invasive diagnostic procedures, such as pleural biopsy, may be reserved for specific cases taken into account its risks *versus* benefits.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Funding Statement

The study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Thiago Mafort, Dr. Domenico Capone, Dr. Walter Costa and Dr. Hélio Siqueira, physicians of Pleural Diseases and Tuberculosis Outpatient Clinics of HUPE that contributed in the medical care of the patients included in the study.

References

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2015. Available in: <http://www.who.int/tb>. Accessed in March, 24 2017
- [2] Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infectious Diseases* 2014; 14:9
- [3] Light RW. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2010; 15(3):451
- [4] Greco S, Girardi E, Masciangelo R, Capocchetta GB, Saltini C. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003; 7:777-86
- [5] Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, et al. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest* 2007; 131(3): 880
- [6] Trajman A, Pai M, Dheda K. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what Works and what does not? *Eur Respir J* 2008; 31:1098-106
- [7] Lee LN, Chou CH, Wang JY, et al. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 173-9
- [8] Liu F, Gao M, Zhang X, et al. Interferon-Gamma Release Assay Performance of Pleural Fluid and Peripheral Blood in Pleural Tuberculosis. *PlosOne* 2013; 8 (12): 83857
- [9] Jeon D. Tuberculous pleurisy: an update. *Tuberc Respir Dis* 2014; 76: 153–9
- [10] Liang QL, Shi HZ, Qin SM et al. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: A meta-analysis. *Respir Med* 2008; 102: 744-54

- [11] Lima DM, Colares JKB, Fonseca AL. Combined use of the polymerase chain reaction and detection of adenosine deaminase activity on pleural fluid improves the rate of diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest* 2003; 124: 909-14
- [12] Shimokata K, Saka H, Murate T, Hasegawa Y, Hasegawa T. Cytokine content in pleural effusion. *Chest* 1991; 99: 1103-7 PMID: 1902158
- [13] Nemeth J, Winkler HM, Zwick RH, Rumetshofer R, Schenk P, Burghuber OC, et al. Recruitment of Mycobacterium tuberculosis specific CD4+ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *J Int Med* 2009; 265: 163-8
- [14] Sutherland JS, Garba D, Fombah AE, Mendy-Gomez A, Mendy FS, Antonio M, et al. Highly Accurate Diagnosis of Pleural Tuberculosis by Immunological Analysis of the Pleural Effusion. *PLoS ONE* 2012; 7(1): e30324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030324> PMID: 22295081
- [15] Santos AP, Corrêa RS, Ribeiro-Alves M, Soares da Silva ACO, Mafort TT, Leung J, et al. (2018) Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using IFN- γ , IP-10 and adenosine deaminase. *PLoS ONE* 13(8): e0202481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202481>
- [16] Sané M, Ba-Fall K, Lefebvre N et al. Empiric antituberculous therapy in patients with unexplained exsudative pleural effusion. Is it valid in Senegal? *Rev Pneumol Clin* 2007; 63 (4): 247-50
- [17] Seibert AF, Haynes Jr J, Middleton R, et al. Tuberculous pleural effusion: Twenty-year experience. *Chest* 1991; 99 (4): 883-6
- [18] Richter C, Perenboom R, Swai AB et al. Diagnosis of tuberculosis in patients with pleural effusion in an area of HIV infection and limited diagnostic facilities. *Trop Geogr Med* 1994; 46 (5): 293-7
- [19] Zhai K, Lu Y, Shi HZ. Tuberculous pleural effusion. *J Thorac Dis* 2016; 8 (7): E486-94
- [20] R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- [21] Carrión-Valero F, Perpiñá-Tordera M. Screening of tuberculous pleural effusion by discriminant analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(7):673–9
- [22] Neves DD, Dias RM, Cunha AJLA. Predictive model for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Braz J Infec Dis* 2007; 11(1):83-8
- [23] Porcel JM, Vives M. Differentiating tuberculous from malignant pleural effusions: a scoring model. *Med Sci Monit* 2003; 9: CR227-32
- [24] Sales RK, Vargas FS, Capelozzi VL et al. Predictive models of pleural effusions secondary to tuberculosis or câncer. *Respirology* 2009; 14:1128-33
- [25] Seixas JM, Faria J, Souza Filho JBO, et al. Artificial neural network models to support the diagnosis of pleural tuberculosis in adult patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17(5):682-6
- [26] Porcel JM, Alemán C, Bielsa S, et al. A decision tree for differentiating tuberculosis from malignant effusions. *Respir Med* 2008; 102:1159-64
- [27] Valdés L, San José JM, Pose A et al. Diagnosing tuberculous pleural effusion using clinical data and pleural fluid analysis. A study of patients less than 40 years old in an area with a high incidence of tuberculosis. *Respir Med* 2010; 104(8):1211-7
- [28] Brazilian Ministry of Health. Department of Epidemiological Vigilance. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011

- [29] Valdés L, San José E, Alvarez D et al. Diagnosis of tuberculosis pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysosyme and interferon gamma. *Chest* 1993; 103 (2):458
- [30] Villegas MV, Labrada LA, Saravia NG. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase and interferon gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest* 2000; 118 (5):1355
- [31] Villena V, López EA, Echave-Sustaeta J, et al. Prospective study of 1,000 consecutive patients with pleural effusion. Etiology of the effusion and characteristics of the patients. *Arch Bronconeumol* 2001; 38: 21-6
- [32] Lyadova IV. Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way? *Mediators of Inflammation* 2017. Article ID 8619307, 11 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/8619307>
- [33] Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria, *The Journal of Clinical Investigation* 2007, 117 (7): 1988–94
- [34] Reyes-Ruvalcaba D, González-Cortés C, Rivero-Lezcano OM. Human phagocytes lack the ability to kill *Mycobacterium gordonae*, a non-pathogenic mycobacteria. *Immunology Letters* 2008; 116 (1): 72–8
- [35] Corleis B, Korbel D, Wilson R, Bylund J, Chee R, and Schaible EU. Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cellular Microbiology* 2012; 14(7): 1109-21
- [36] Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2009; 89 (1):29–37
- [37] Lin MT, Wang JY, Yu CJ, Lee LN, Yang PC, TAMI Group. *Mycobacterium tuberculosis* and polymorphonuclear pleural effusion: incidence and clinical pointers. *Respir Med.* 2009;103(6):820-6. doi: 10.1016/j.rmed.2008.12.023
- [38] Choi H, Chon HR, Kim K, et al. Clinical and Laboratory Differences between Lymphocyte- and Neutrophil-Predominant Pleural Tuberculosis. *PLoS ONE* 2016; 11 (10): e0165428
- [39] Light RW, Macgregor I, Luchsinger C, Ball WC. Pleural effusions: The diagnostic separation of transudates and exsudates. *Ann Int Med* 1972; 77 (4): 507-14
- [40] Mummadi SR and Hahn PY. Outcomes of a Clinical Pathway for Pleural Disease Management: “Pleural Pathway”. *Pulmonary Medicine* 2018. Article ID 2035248, 6 pages.
<https://doi.org/10.1155/2018/2035248>
- [41] Samanta S, Sharma A, Das B, et al. Significance of total protein, albumin, globulin, serum effusion albumin gradient and LDH in the differential diagnosis of pleural effusion secondary to tuberculosis and cancer. *J Clin and Diag Res* 2016; 10 (8): 14-8

5 DISCUSSÃO

Apesar de historicamente negligenciada, talvez pela menor relevância na cadeia de transmissão da doença, a TB EP é uma apresentação frequente no Brasil e no mundo. Em algumas regiões do mundo, a TBPI é considerada a apresentação EP mais comum da doença. A apresentação clínica representada por uma variedade de sinais e sintomas, associado à sua característica paucibacilar e à necessidade de procedimentos invasivos para a coleta de espécimes biológicos, dificultam a confirmação do diagnóstico da TBPI (Amer et al. 2016). A linha de pesquisa conduzida ao longo desta tese resultou em dois trabalhos científicos capazes de auxiliar no diagnóstico desta apresentação da doença, seja em ambientes da atenção primária de saúde ou em hospitais terciários. De acordo com o PNCT e o Sistema Único de Saúde (SUS), a abordagem, o diagnóstico e o tratamento da TB devem ser descentralizados. Desta forma, as unidades básicas ou primárias de saúde e a estratégia de saúde da família têm a prerrogativa de investigar e acompanhar os casos da doença. Tendo em vista a necessidade de procedimentos invasivos para a propedêutica adequada aos casos de TBPI, esses pacientes em específico são encaminhados via sistemas de referência e contrarreferência do Sistema Nacional de Regulação (SISREG) às unidades secundárias e/ou terciárias onde podem ser submetidos aos exames invasivos que irão definir o diagnóstico. Essas unidades secundárias, muitas vezes, não dispõem de estrutura física para a realização da toracocentese e nem de estrutura laboratorial de retaguarda para a realização de testes imunológicos, como a dosagem de ADA, e mesmo dos testes microbiológicos e moleculares (Brasil 2015).

O primeiro artigo - *“Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using IFN- γ , IP-10 and adenosine deaminase”* (Santos et al. 2018), apresentou três biomarcadores capazes de excluir o diagnóstico de TB em 100% dos casos onde os resultados combinados dos exames sejam negativos. Através da aplicação do IGRA, o IFN- γ e o IP-10 foram dosados no sangue periférico e no LP de pacientes com DP em investigação. Seus pontos de corte, assim como o valor padronizado do ADA, foram recalculados para a população do estudo e o rendimento destes três marcadores, de forma isolada ou associada, foi comparado. Com uma acurácia de 98,4%, uma Se = 93,7% e uma Sp = 100% a associação de IFN- γ e ADA se mostrou a melhor combinação de resultados para o diagnóstico da TBPI, como foi ilustrado através dos diagramas de Venn.

No segundo artigo, intitulado *“Hyporexia and cellular/biochemical characteristics of pleural fluid as predictive variables on a model for pleural tuberculosis diagnosis”*, foi

construído um modelo de árvore de classificação baseado em uma população com alta prevalência para TB a qual apresentou excelente desempenho (acurácia de 87,6%, Se = 89,2% e Sp = 84,5%) para o diagnóstico da doença pleural, utilizando como variáveis preditoras a dosagem de células polimorfonucleares e proteína no LP associada com hiporexia. O modelo apresentou-se como um método alternativo para diagnóstico das formas pleurais da TB, utilizando dados que são acessíveis e de fácil execução nas unidades básicas de saúde.

No artigo apresentado na seção 4.1, os pacientes foram incluídos de forma sequencial em um período de 20 meses. Os níveis basais de IFN- γ , IP-10 e ADA no LP de 16 pacientes com TBPI confirmada por exames microbiológicos ou histopatológicos foram maiores que os níveis nos casos de DP não tuberculoso. A partir de cálculo de pontos de corte através da análise da curva de característica de operação do receptor (ROC, do inglês *Receiver operating characteristic*), o rendimento desses biomarcadores analisados de forma isolada ou combinada se mostrou relevante e a aplicação nos diagramas de Venn ilustrou sua importância. A seguir, os resultados analisados em uma amostra de 17 casos de TB não confirmada, ou seja, diagnosticada através de dosagem de ADA ou de forma empírica, confirmou sua relevância.

Os resultados se mostram particularmente relevantes uma vez que a dosagem de biomarcadores para diagnóstico de doenças pleurais, entre eles a detecção de lipoarabinomana, a análise proteômica, metabólica, ou transcriptômica, IL-27, IFN- γ e IP-10, tem sido um alvo recente (Norbis et al. 2014, Porcel 2018).

A ADA, é o biomarcador mais antigo, utilizado para o diagnóstico da TB (Piras, 1978). Apesar dos questionamentos sobre o seu melhor ponto de corte e de poder ter seus valores elevados em outras condições clínicas, a dosagem de ADA é particularmente útil para o diagnóstico da doença infecciosa quando em valores acima de 40 UI/L e quando associada com derrame pleural exsudativo e linfocítico (Zhai et al. 2016). Os resultados sobre os melhores pontos de corte deste marcador variam (Ambade et al. 2001, Arnold et al. 2015, Greco et al. 2003, Helmy et al. 2012, Liu et al. 2016, Porcel 2016) e existem estudos sugerindo que o valor da ADA pode variar de acordo com idade, características bioquímicas e de citometria do LP, grau de imunossupressão e também com a área geográfica onde o estudo é conduzido (Lee et al. 2014, Niwa et al. 1985). Em nossa casuística, a dosagem de ADA em seu ponto de corte padrão foi 75% sensível e 95,7% específico. Contudo, o melhor ponto de corte calculado em nossa amostra foi de 25,8 UI/L, garantindo uma Se = 100% às custas de uma Sp = 84,8%.

Na população estudada para fins desta pesquisa, IFN- γ e IP-10 foram dosados utilizando a metodologia dos IGRAs e a resposta Mtb específica secundária à reação aos antígenos ESAT-6 e CFP-10 não se mostrou útil para este fim. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Losi (2007), Dheda (2009) e Mollo (2017), que também não encontraram benefício na aplicação do IGRA no LP para o diagnóstico de tuberculose. Por outro lado, os biomarcadores em sua forma basal já se mostraram elevados e estatisticamente maiores que o grupo não TB, possivelmente por já serem naturalmente estimulados. Desta forma, em suas concentrações basais, IFN- γ e IP-10 foram capazes de promover o diagnóstico de TBPI a partir de pontos de corte calculados pela técnica de curva ROC em 93,7% e 75%, respectivamente.

O IFN- γ foi o biomarcador com melhor performance entre os três analisados neste estudo. A revisão de Krenke (2010) e as metanálises de Greco (2003) e Jiang (2007) concluíram sobre a importância deste marcador, com Se e Sp médias de 87% e 89%, respectivamente. A partir dos 80 casos incluídos no estudo e com uma área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*) de 0,989, o valor de corte deste marcador foi de 2,33 UI/mL, garantindo uma Se = 93,7%, Sp = 97,8%, VPP = 93,7% e VPN = 97,8% para TBPI. Em apenas um caso do grupo não TB a dosagem de interferon foi considerada como falso positivo (paciente com insuficiência cardíaca e com derrame pleural compatível com exsudato linfocítico).

O IP-10, por sua vez, com um valor de AUC mais modesto (0,832) e um ponto de corte de 4.361,9 pg/mL, não apresentou um comportamento tão relevante como o IFN- γ , sendo considerado um exame menos acurado (80,6%). Os resultados especificamente deste biomarcador são compatíveis com os de Dheda (2009) e Okamoto (2005).

Apesar dos resultados promissores acerca dos três biomarcadores, sua importância não suplanta àquela dos exames microbiológicos, que além de continuarem sendo padrão ouro para diagnóstico da doença, também permitem a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos, especialmente em casos onde houver suspeita de TBMR (Talbot et al. 2005).

O destaque de nosso estudo foi identificar que a associação de resultados positivos dos três biomarcadores apresentou um rendimento melhor do que a aplicação dos mesmos de forma isolada. No entanto, a positividade combinada de IFN- γ e ADA (ponto de corte 25,8 UI/L) foi a mais acurada (98,4%). A representação de nossos resultados combinatórios através dos diagramas de Venn é bastante ilustrativo, pois percebe-se que entre os casos de TB confirmada a positividade de IFN- γ , IP-10 e ADA se sobrepõe, ao passo que entre os pacientes não-TB, os círculos que representam a positividade dos biomarcadores ficam

completamente separados. A ilustração dos casos de TB não confirmada revela novamente a sobreposição dos três círculos.

O benefício em associar outros biomarcadores ao ADA, já classicamente estabelecido na rotina de investigação de doenças pleurais, seria permitir o aumento da especificidade dos métodos associados, aumentando a possibilidade diagnóstica através da análise do LP, sem que sejam necessários procedimentos mais invasivos ou por vezes contraindicados.

No artigo 2, a partir de uma coorte de 1.135 pacientes notificados com TB entre 2010 e 2018, 212 (19%) apresentaram acometimento pleural. Entre eles, 58,7% eram do gênero masculino com mediana de idade de 41 anos [Intervalo Interquartil (IIQ) 28 – 51]. Esses dados coincidem com os da literatura que associam a maior ocorrência da TBPI em homens jovens (Choi et al. 2016, Machado et al. 2016, Neves et al. 2007, Porcel et al. 2008, Samanta et al. 2016). A frequência de comorbidades associadas entre os pacientes com TBPI, conforme revelada na tabela 1 do artigo 2, pode ser justificada pelo local onde o estudo foi conduzido, um hospital universitário de referência para acompanhamento de pacientes com AIDS, doenças reumatológicas e / ou transplantados, o que modifica o perfil de pacientes neste aspecto.

Conforme já descrito e publicado, o tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da TB pleural teve mediana de 30 dias (IIQ 20 - 60), o que pode ser considerado pequeno quando comparados aos estudos de Neves (2007) e Antonangelo (2012). E ainda que os pacientes de nossa amostra tenham sido investigados de forma adequada, 31% dos casos apresentaram o diagnóstico de TBPI de forma empírica, percentual semelhante ao encontrado por Machado (2016), que em sua casuística registrou 33% da população com TBPI diagnosticada de forma empírica.

O critério de diagnóstico mais comum para a pleurite tuberculosa no artigo 2 foi a dosagem de ADA (29%), seguido por 21% de critério histopatológico e 20% microbiológico. Esses dados são compatíveis com a literatura e confirmam a dificuldade de confirmação microbiológica das formas extrapulmonares da TB em face de sua manifestação paucibacilar (Demirer et al. 2012, Neves et al. 2007). Além disso, a aquisição de amostras de fragmento pleural tanto para análise histopatológica bem como para o incremento do rendimento microbiológico, pode ser contraindicada por condições clínicas do paciente ou mesmo recusada por eles (Koegeleberg e Diacon 2011).

Especificamente no cenário brasileiro, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias, em sua 16ª reunião ordinária, recomendou a incorporação do teste de dosagem de ADA no diagnóstico precoce da tuberculose EP, considerando-se as políticas públicas de

saúde que integram o PNCT (Brasil 2015). Além da dosagem de ADA, a análise de bioquímica, citometria global e específica, baciloscopia e cultura para micobactérias no LP além de métodos microbiológicos e histopatológicos no fragmento pleural são preconizados como métodos de diagnóstico de TBPI no âmbito da assistência médica pública regido pelo SUS. Todavia, a realidade e as dificuldades encaradas pelo SUS geram um incremento ainda maior no desafio do diagnóstico da TBPI (Brasil 2015).

Partindo do pressuposto que ambientes de atenção primária da saúde no Brasil não apresentam fácil acesso a procedimentos de toracocentese e biópsia pleural, inferimos que o tratamento desta apresentação da TB muitas vezes é feito com base em critérios clínicos e radiológicos. Por vezes, mesmo quando a toracocentese diagnóstica e de “alívio” é realizada, o LP é analisado apenas para a citometria global e específica e para bioquímica com dosagem de glicose, proteínas e LDH, o que permite sua classificação como transudato ou exsudato e de predomínio linfocítico ou neutrofílico (Ferreiro et al. 2014). Baseado nesta inferência e no perfil de nossa população propusemos a criação de uma árvore de classificação utilizando dados facilmente acessíveis em unidades básicas de atenção à saúde.

A árvore de classificação elaborada no artigo 2 utilizou critérios de citometria e bioquímica do LP e dados clínicos para a sugestão de diagnóstico de TBPI ou não TB e registrou uma acurácia de 87,6 %. Esta forma de auxílio para diagnóstico da TBPI vem sendo perseguida por grupos de pesquisa nacionais e internacionais, utilizando critérios variados, mas em sua grande parte de fácil aquisição (Demirer et al. 2012, Neves et al. 2007, Seixas et al. 2013).

Neves (2007) desenvolveu um modelo preditivo baseado em critérios sociodemográficos, clínicos e laboratoriais (incluindo citometria global, percentual de linfócitos, LDH, proteínas e ADA no LP) para identificar derrames pleurais de etiologia tuberculosa. Apesar de ter sido conduzido em uma população semelhante à nossa, acompanhada em hospital universitário no Rio de Janeiro, e do seu bom rendimento, o grupo utilizou a dosagem do ADA, tornando mais fácil a identificação de casos de TBPI. Em nossa árvore, foram utilizados apenas os critérios que habitualmente estão disponíveis na rede pública de saúde do Brasil e nossos resultados revelaram uma acurácia próxima de 90% mesmo quando aplicado em uma amostra cujo diagnóstico foi totalmente empírico. Já Demirer (2012) aplicou um modelo preditivo de regressão logística em uma população turca associando idade, dosagem de ADA e proteínas no LP. Mais uma vez, nossa árvore demonstrou uma maior acurácia e oferecendo um melhor rendimento, mesmo não utilizando ADA.

Em outro estudo brasileiro, Seixas (2013) criou um modelo de redes neurais e atingiu uma acurácia acima de 90%. Contudo, as variáveis utilizadas foram exatamente aquelas as quais carecemos nas redes de atenção básica (cultura para micobactérias, adenosina deaminase, sorologias e amplificação de ácidos nucleicos).

Apesar de serem alternativas interessantes, esses métodos de predição utilizando dados clínicos e laboratoriais necessitam ser validados externamente pois sua acurácia pode variar de acordo com a prevalência da doença em cenários diferentes. Solari (2017) identificou 12 artigos que ofereciam métodos preditores para diagnóstico de TBPI e os aplicou em uma população de 262 pacientes com derrame pleural exsudativo no Peru. Em geral, os valores de Se foram menores do que os reportados nos artigos originais, mantendo valores de Sp semelhantes. Dada a alta prevalência de TB no cenário peruano, os VPPs se mantiveram elevados (entre 90 – 100%) mas os VPNs não ultrapassaram 70%. No mesmo artigo, a dosagem de ADA em dois pontos de corte (40 UI/L e 60 UI/L) revelou um rendimento melhor que a aplicação dos modelos preditores.

Um ponto em comum entre a maioria dos autores que propuseram modelos preditores para diagnóstico de TBPI (Carrion-Valéro e Perpiñá-Tordera 2001, Neves et al. 2007, Porcel et al. 2008, Porcel e Vives 2003, Sales et al. 2009, Seixas et al. 2013, Solari et al. 2017, Valdés et al. 2010) é a inclusão da dosagem de ADA como um dos critérios do modelo. Partindo do pressuposto de que a dosagem de ADA, isoladamente, já é estabelecida como método para diagnóstico do DP tuberculoso, não me parece útil a criação de um modelo que associa outros critérios menos específicos. E, ainda que se pesem as críticas e desvantagens com relação à dosagem de ADA (Abrao et al. 2014, Baganha et al. 1990, Lee et al. 2014, Niwa et al. 1985, Tay e Tee 2013), seu rendimento para o diagnóstico da TBPI em locais de alta prevalência e poucos recursos não deve ser desmerecida. Deste modo, a aplicação desses modelos, incluindo aquele proposto por esta linha de pesquisa, deve ser reservada para cenários onde a disponibilidade ADA não for possível.

Ao longo da construção desta tese pudemos identificar que mesmo em unidades de referência terciária, a TBPI é considerada um grande desafio para diagnóstico. Em nossa unidade, dos 160 casos de TBPI incluídos para a confecção do artigo 2, 31% tiveram diagnóstico empírico. Se mesmo em uma unidade de referência encontramos este percentual, imaginamos que o diagnóstico nas unidades básicas de saúde seja ainda mais prejudicado, demandando maior tempo para tal, ou mesmo nem sempre tendo o diagnóstico concluído, aumentando a morbidade da TB e o risco de recidiva de formas disseminadas da doença nos casos autolimitados e não tratados.

No artigo 1 foram apresentados a dosagem e a associação de biomarcadores para o diagnóstico de tuberculose e a revisão do ponto de corte da ADA no cenário brasileiro. Além da dosagem do IFN- γ ter se confirmado como um excelente método, a associação de sua positividade com a da ADA foi capaz de confirmar a TB em 100% dos casos de nossa amostra, permitindo o início do tratamento para TB quando esses dois marcadores forem positivos e sugerindo a continuidade de investigação diagnóstica, eventualmente com procedimentos mais invasivos, quando ambos os resultados forem negativos. A dosagem de IFN- γ e do IP-10 foi realizada no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ. A ADA, por sua vez, foi quantificada através do método de Giusti em um laboratório terceirizado que presta serviços ao Hospital Universitário Pedro Ernesto (Laboratório Hermes Pardini®), o que pode dar margem a vieses relacionados à reprodutibilidade do estudo em outros cenários.

No segundo artigo, a aplicação da árvore de classificação utilizando variáveis facilmente acessíveis se mostrou muito útil para o diagnóstico da TB, com uma acurácia de próxima a 90%. Este modelo de método diagnóstico seria particularmente relevante para utilização em unidades básicas de saúde com poucos recursos ou mesmo nos locais remotos de nosso país, onde técnicas de coleta do material pleural ou mesmo de realização de determinados exames são mais limitadas. Conforme mencionado na discussão deste artigo, um elevado número de informações faltantes pode ter interferido nos resultados deste trabalho.

A despeito dos resultados aqui apresentados, salienta-se a necessidade de aplicação destas propostas em outros cenários, com diferentes índices de prevalência de etiologia de DP bem como de TB. As duas estratégias desenvolvidas sinalizam uma perspectiva e devem ser validados de forma prospectiva para consolidação de seu valor.

CONCLUSÕES

A busca de marcadores clínicos e imunológicos para o diagnóstico diferencial da tuberculose em pacientes com derrame pleural em investigação foi o objetivo principal desta tese, justificada pelas diferentes e numerosas etiologias para a formação dos derrames pleurais, assim como a pela importância epidemiológica da manifestação pleural da TB no Brasil e no mundo, e por todos os desafios para seu diagnóstico conforme apresentado ao longo da revisão de literatura realizada.

A partir dos resultados obtidos ao longo da pesquisa conclui-se para o:

a) Artigo 1:

- o IFN- γ e o IP-10 em suas concentrações basais encontram-se em valores mais elevados no LP de pacientes com TB do que naqueles com DP de outras etiologias;
- a aplicação do ensaio de liberação de IFN- γ (QTF-GIT) no LP para a dosagem de IFN- γ e IP-10 não se mostrou útil para este fim numa população de 80 pacientes;
- a ADA no LP de pacientes com DP em investigação se confirmou mais elevada em pacientes com DP de etiologia tuberculosa do que naqueles de outras etiologias;
- os pontos de corte de ADA, IFN- γ e IP-10 no LP para diagnóstico de TBPI foram 25,8 UI/L, 2,33 UI/mL e 4.361,9 pg/mL, respectivamente;
- o IFN- γ foi o biomarcador com melhor desempenho entre os três analisados neste estudo;
- a associação de resultados positivos de ADA (em seu ponto de corte recalculado) e IFN- γ no LP, apresentou o melhor rendimento para diagnóstico de TBPI;

b) Artigo 2:

- pacientes com TBPI foram mais jovens que os não TB e apresentaram menos frequentemente outras comorbidades;
- febre, dor torácica, hiporexia, perda ponderal e sudorese noturna foram mais observados nos pacientes com TBPI;

- ADA, percentual de linfócitos, proteína e albumina encontraram-se em níveis maiores no LP de pacientes com TB, por outro lado o percentual de neutrófilos foi menor neste grupo;
- idade, manifestações clínicas (febre, dor torácica, hiporexia e perda ponderal) e dados laboratoriais do LP (percentual de linfócitos e neutrófilos e proteínas totais) foram as variáveis identificadas em análises de regressão logística como fatores associados com diagnóstico de TBPI;
- uma árvore de classificação utilizando percentual de neutrófilos e dosagem de proteínas no LP e hiporexia como manifestação clínica foi construída com uma excelente acurácia para o diagnóstico de TBPI.

REFERÊNCIAS

- Abrahão RMCM, Nogueira PA, Malucelli MCI. Tuberculosis in county jail prisoners in the western sector of the city of São Paulo, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10 (2): 203-8.
- Abrao FC, Abreu IR, Miyaki DH, Busico MA, Younes RN. Role of adenosine deaminase and the influence of age on the diagnosis of pleural tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18: 1363-9.
- Adnan MHM, Husain W, Rachid NA. Data Mining for Medical Systems: A Review. In: *Proceedings on the International Conference on Advances in Computer and Information Technology*, pp. 17–22, Kuala Lumpur, Aug 2012.
- Aggarwal AN, Agarwal R, Gupta D, Dhooria S, Behera D. Interferon Gamma Release Assays for Diagnosis of Pleural Tuberculosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2451-9.
- Ambade V, Arora MM, Rai SP, Nikumb SK, Basannar DR. Markers for differentiation of tubercular pleural effusion from non-tubercular effusion. *Med J Armed Forces India* 2011; 67(4): 338-42.
- Amer S, El Hefnawy A, Wahab NA, Okasha H, Baz A. Evaluation of different laboratory methods for rapid diagnosis of tuberculous pleurisy. *Int J Mycobacteriol* 2016; 5: 437-45.
- Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 1995; 154: 3359–72.
- Antonangelo L, Capelozzi VL. Coleta e preservação do líquido pleural e biópsia pleural. *J Bras Pneumol* 2006; 32(Supl 4): S163-S169.
- Arnold DT, Bhatnagar R, Fairbanks LD, Zahan-Evans N, Clive AO, Morley AJ, et al. Pleural Fluid Adenosine Deaminase (PFADA) in the Diagnosis of Tuberculous Effusions in a Low Incidence Population. *PLoS One* 2015; 10 (2): e0113047.
- Baganha MF, Pêgo A, Lima MA, Gaspar EV, Cordeiro AR. Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic population. *Chest* 1990; 97: 605-10.
- Barnes PF, Mehra V, Hirshifield GR, et al. Characterization of T cell antigens associated with the cell wall protein-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* 1989;143 (8): 2656-62.
- Baumann MH, Nolan R, Petrini M, Lee YC, Light RW, Schneider E. Pleural tuberculosis in the United States: incidence and drug resistance. *Chest* 2007; 131: 1125-32.
- Bhatnagar R, Maskell N. The modern diagnosis and management of pleural effusions. *BMJ* 2015; 351: h4520.
- Blackmore CC, Black WC, Dallas RV, Crow HC. Pleural fluid volume estimation: a chest radiograph prediction rule. *Acad Radiol* 1996; 3:103-9.

Boehme C, Molokova E, Minja F, Geis S, Loscher T, Maboko L, et al. Detection of mycobacterial lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of Tanzanian patients with suspected tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 893-900.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Avaliação da Gestão do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (versão eletrônica) 2015 – [acesso em 04 fev 2019]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 2018; 9 (11): 1-18.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação / Secretaria de Vigilância em Saúde / Tuberculose. Situação epidemiológica. 2015 – [acesso em 27 dez 2019]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/tuberculose/situacao-epidemiologica>.

Bright TJ, Wong A, Dhurjati R, Bristow E, Bastian L, Coeytaux RR, et al. Effect of Clinical Decision Support Systems: A Systematic Review. *Ann Intern Med* 2012; 157 (1): 29-47.

Brito RS, Gounder C, Lima DB, Siqueira H, Cavalcante HR, Pereira MM, et al. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. *J Bras Pneumol* 2004; 30(4): 425-32.

Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL. Heterogeneity in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2017;17(11): 691-702.

Canõn ADO. Apoio ao diagnóstico de tuberculose pleural e meníngea [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; 2015. 105 f. Doutorado em Engenharia Elétrica.

Carrión-Valero F, Perpiñá-Tordera M. Screening of tuberculous pleural effusion by discriminant analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(7):673-9.

Center of Disease Control and Prevention. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection – United States, 2010. *MMWR* 2010; 59: 1-28.

Chegou NN, Black GF, Kidd M, van Helden PD, Walzl G. Host markers in Quantiferon supernatants differentiate active TB from latent TB infection: preliminary report. *BMC Pulmonary Medicine* 2009; 9: 21.

Chihota VN, Grant AD, Fielding K, Ndibongo B, van Zyl A, Muirhead D, et al. Liquid vs solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14: 1024-31.

Choi H, Chon HR, Kim K, Kim S, Oh KJ, Jeong SH, et al. Clinical and laboratory differences between lymphocyte and neutrophil-predominant pleural tuberculosis. *PLoS ONE* 2016; 11 (10): e0165428.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-44.

Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IFN gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol* 2002; 10(5):221-6.

Cruz-Knight W, Blake-Gumbs L. Tuberculosis: An overview. *Prim Care* 2013; 40 (3): 743-56.

Dallenga T, Schaible UE. Neutrophils in tuberculosis—first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? *Pathogens and Disease* 2016; 74 (3): ftw012.

Demirer E, Miller AC, Kunter E, Kartaloglu Z, Barnett SD, Elamin EM. Predictive models for tuberculous pleural effusions in a high tuberculosis prevalence region. *Lung*. 2012; 190: 239-48.

Dheda K, Zyl-Smit RN, Seche, LA, Badri M, Meldau R, Meldau S, et al. Utility of quantitative T-cell responses versus unstimulated interferon- γ for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Eur Respir J* 2009; 34: 1118-26.

Diacon AH, Van de Wal BW, Wyser C, Smedema JP, Bezuidenhout J, Bolliger CT, et al. Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *Eur Respir J* 2003; 22: 589-91.

Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Bement T, Campos-Neto A, Skeyke YA, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3285–90.

Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006; 101: 697-714.

Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Horsburgh CR, Salfinger M, Simone PM. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-95.

Fenniri LE, Toossi Z, Aung H, El Hiraki G, Bourkkad J, et al. Polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis*-specific effector memory CD4⁺ T cells at sites of pleural TB. *Tuberculosis* 2011; 91 (3): 224-30.

Ferreiro L, San José E, Valdés L. Tuberculous pleural effusion. *Arch Bronconeumol*. 2014; 50: 435-43.

Fogel N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis* 2015; 9(5): 527-31.

- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, del la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 2013; 4(1): 3-66.
- Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, Johnson JL, Riley LW, Maciel EL. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infect Dis* 2014; 14:9.
- Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, Sahn SA. Diagnosis and treatment of tuberculosis pleural effusion in 2006. *Chest* 2007; 131: 880-9.
- Gordon CE, Feller-Kopman D, Balk EM, Smetana GW. Pneumothorax following thoracentesis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2010; 170(4): 332-9.
- Greco S, Giraidi E, Masciangelo R, Capocchetta GB, Saltini C. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculosis pleurisy: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7(8): 777-86.
- Guirado E, Schlesinger LS. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Front Immunol* 2013; 4: 98-106.
- Gupta BK, Bharat V, Bandyopadhyay D. Role of Adenosine Deaminase Estimation in Differentiation of Tuberculous and Non-tuberculous Exudative Pleural Effusions. *J Clin Med Res* 2010; 2: 79-84.
- Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T Cells Are Expanded in Blood and Disease Sites in Patients with Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 803-10.
- Helmy NA, Eissa SA, Masoud HH, Elessawy AF, Ahmed RI. Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous and malignant pleural effusion. *Egypt J Chest Dis Tuberc* 2012; 61 (4):413-7.
- Hiraki A, Aoe K, Eda R, Maeda T, Muramaki T, Sugi K, et al. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest* 2004; 125: 987-9.
- Hopewell PC. Tuberculosis and other mycobacterial diseases. In: Broaddus VC, Mason RJ, Murray JF, Nadel JA. *Textbook of respiratory medicine*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. Cap 33. p. 979-1043.
- Hooper C, Gary Lee YC, Maskell N. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* 2010; 65 (Suppl 2): ii4eii17.
- Jacobson KR. Tuberculosis. *Ann Intern Med* 2017; 166(3): ITC17-ITC32.
- Jiang J, Shi HZ, Liang QL, Qin SM, Qin XJ. Diagnostic value of interferon- γ in tuberculous pleurisy. *Chest* 2007; 131: 1133-41.
- Kang JY, Rhee CK, Kang NH, Kim JS, Yoon HK, Song JS. Clinical Utility of Two Interferon-gamma Release Assays on Pleural Fluid for the Diagnosis of Tuberculous Pleurisy. *Tuberc Respir Dis* 2012;73(3):143-50.

Karkhanis VS, Joshi JM. Pleural effusion: diagnosis, treatment, and management. *Open Access Emerg Med* 2012; 4: 31-52.

Keng LT, Shu CC, Chen JY, Liang SK, Lin CK, Chang LY, et al. Evaluating pleural ADA, ADA2, IFN- γ and IGRA for diagnosing tuberculosis pleurisy. *J Infect* 2013; 67 (4): 294-302.

Keshavjee S, Farmer P. Tuberculosis, drug, resistance, and the history of modern medicine. *N Engl J Med* 2012; 367 (10): 931-6.

Klimiuk J, Krenke R, Safianowska A, Korczynski P, Chazan R. Diagnostic performance of different pleural fluid biomarkers in tuberculous pleurisy. *Adv Exp Med Biol* 2015; 852: 21-30.

Ko JM, Park HJ, Kim CH. Pulmonary changes of pleural TB: up-to-date CT imaging. *Chest* 2014; 146:1604-11.

Koegelenberg CF, Diacon AH. Pleural controversy: close needle pleural biopsy or thoracoscopy-which first? *Respirology* 2011; 16: 738-46.

Koegelenberg CF, Diacon AH. Image-guided pleural biopsy. *Curr Opin Pulm Med* 2013; 19: 368-73.

Krenke R, Korczyński P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 367-75.

Kritski A, Conde MB, Souza GRM. *Tuberculose: do ambulatório à enfermaria*. 3a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 259 p.

Lalvani A. Diagnosing Tuberculosis Infection in the 21st Century. *Chest* 2007; 131: 1898-906.

Lalvani A, Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Brit Med Bull* 2010; 93: 69-84.

Lee LN, Chou CH, Wang JY, Hsu HL, Tsai TH, Jan IS, et al. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 173-9.

Lee SJ, Kim HS, Lee SH, Lee TW, Lee HR, Cho YJ, et al. Factors influencing pleural adenosine deaminase level in patients with tuberculous pleurisy. *Am J Med Sci* 2014; 348: 362-5.

Li ZZ, Qin WZ, Li L, Wu Q, Wang YJ. Accuracy of enzyme-linked immunospot assay for diagnosis of pleural tuberculosis: a meta-analysis. *Gen and Mol Res* 2015; 14 (3): 11672-80.

Liam CK, Lim KH, Wong CM. Tuberculous pleurisy as a manifestation of primary and reactivation disease in a region with a high prevalence of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3 (9): 816-22.

Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972;77(4):507-13.

Light RW. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2010; 15(3):451.
Light RW. Pleural effusions. *Med Clin North Am* 2011;95(6):1055-70.

Lin P, Flynn JL. The End of the Binary Era: Revisiting the Spectrum of Tuberculosis. *J Immunol* 2018; 201:2541-8.

Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy. *Expert Rev Respir Med* 2008;2(5):583-8.

Liu F, Gao M, Zhang X, Du F, Jia H, Yang X, et al. Interferon-Gamma Release Assay Performance of Pleural Fluid and Peripheral Blood in Pleural Tuberculosis. *PLoS ONE* 2013; 8 (12): 83857.

Liu Y, Ou O, Zheng J, Shen L, Zhang B, Weng X, et al. A combination of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay and the detection of adenosine deaminase improves the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Emerging Microbes & Infections* 2016; 5: e83.

Losi M, Bossink A, Codecasa L, Jafari C, Ernst M, Thijsen S, et al. Use of a T-cell interferon- γ release assay for the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Eur Respir J* 2007; 30: 1173-9.

Lusiba JK, Nakiyingi L, Kirenga BJ, Kiragga A, Lukande R, Nsereko M, et al. Evaluation of Cepheid's Xpert MTB/RIF Test on Pleural Fluid in the Diagnosis of Pleural Tuberculosis in a High Prevalence HIV/TB Setting. *PLoS ONE* 2014; 9(7): e102702.

Lyadova IV. Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way? *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 8619307.

Machado T, Fonseca AJ, Buenafuente SMF. Tuberculose pleural no estado de Roraima no período de 2005-2013: qualidade diagnóstica. *J Bras Pneumol* 2016; 42: 106-13.

Marjani M, Yousefzadeh A, Baghaei P, Tabarsi P, Moniri A, Masjedi MR, et al. Impact of HIV infection on tuberculous pleural effusion. *Int J STD AIDS* 2016; 27: 363-9.

Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, Lawn SD. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:709.

McAdam AJ, Milner DA, Sharpe AH. Doenças infecciosas. In: Robbins & Cotran. *Patologia. Bases patológicas para as doenças.* 9a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Cap 8. p. 349-418.

Meldau R, Peter J, Theron G, Calligaro G, Allwood B, Symons G, et al. Comparison of same day diagnostic tools including Gene Xpert and unstimulated IFN- γ for the evaluation of pleural tuberculosis: a prospective cohort study. *BMC Pulm Med* 2014; 14: 58.

Mendes JM, Lourenço MC, Ferreira RM, Fonseca LS, Saad MH. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from sputum samples from symptomatic outpatients. *J Bras Pneumol* 2007; 33 (5): 579-82.

Mollo B, Jouveshomme S, Philippart F, Pilmis B. Biological markers in the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Ann Biol Clin* 2017; 75 (1): 19-27.

Morimoto T, Takanashi S, Hasegawa Y, Fujimoto K, Okudera K, Hayashi A, et al. Level of antibodies against mycobacterial glycolipid, in the effusion for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Resp Med* 2006; 100: 1775-80.

Moutinho ILD. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. *Rev Med Minas Gerais* 2011; 21(1): 42-8.

Nemeth J, Winkler HM, Zwick RH, Rumetshofer R, Schenk P, Burghuber OC, et al. Recruitment of Mycobacterium tuberculosis specific CD4+ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *J Int Med* 2009; 265: 163-8.

Neves DD, Dias RM, Cunha AJLA. Predictive model for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Braz J Infec Dis* 2007; 11(1):83-8.

Niwa Y, Kishimoto H, Shimotaka K. Carcinomatous and tuberculous pleural effusions. *Chest* 1985; 87: 351-5.

Norbis L, Alagna R, Tortoli E, Codecasa LR, Migliori GB, Cirillo DM. Challenges and perspectives in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12: 633-47.

Okamoto M, Kawabe T, Iwasaki Y, Hara T, Hashimoto N, Imaizumi K, et al. Evaluation of interferon-gamma, interferon-gamma-inducing cytokines, and interferon-gamma-inducible chemokines in tuberculous pleural effusions. *J Lab Clin Med* 2005; 145(2): 88-93.

Orki A, Akin O, Tasci AE, Ciftci H, Urek S, Falay O, et al. The role of positive emission tomography/computed tomography in the diagnosis of pleural diseases. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009;57: 217–21.

Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4; 761-76.

Pang CS, Shen YC, Tian PW, Zhu J, Feng M, Wan C, et al. Accuracy of the interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy: an updated meta-analysis. *Peer J* 2015; 3: e951.

Pérez-Rodríguez E, Jiménez CD. The use of adenosine deaminase and adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6:259-66.

Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993 – 2006. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1350-7.

Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri S, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON-Plus and QuantiFERON-Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis* 2017; 106: 38-43.

Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace JR RJ. Mycobacterium: General characteristics, isolation, and staining procedures. Em: Murray P R, Baron EJ, Pfaller MA et al, editors. Microbiology. 8a ed. Washington: ASM Press, 2003. p.532-59.

Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2012; 7:353–84.

Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7 (2): 155-60.

Piras MA, Gakis C, Budroni M, Andreoni G. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. *Br Med J*. 1978 Dec 23-30;2(6154):1751-2.

Porcel JM, Vives M. Differentiating tuberculous from malignant pleural effusions: a scoring model. *Med Sci Monit* 2003; 9: CR227-32.

Porcel JM, Light RW. Diagnostic approach to pleural effusion in adults. *Am Fam Physician* 2006;73(7):1211-20.

Porcel JM, Alemán C, Bielsa S, Sarrapio J, Fernández de Sevilla T, Esquerda A. A decision tree for differentiating tuberculosis from malignant effusions. *Respir Med* 2008; 102:1159-64.

Porcel JM. Tuberculous pleural effusion. *Lung* 2009; 187: 263-70.

Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiology of pleural effusions: analysis of more than 3,000 consecutive thoracenteses. *Arch Bronconeumol* 2014; 50: 161-5.

Porcel JM, Statophoulos G, Lee VCG. Advances and controversies in pleural diseases. *J Thorac Dis* 2015; 7: 961–3.

Porcel JM. Advances in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Ann Transl Med* 2016; 4 (15): 282.

Porcel JM. Biomarkers in the diagnosis of pleural diseases: a 2018 update. *Ther Adv Respir Dis* 2018; 12: 1753466618808660.

Rosemberg J, Tarantino AB. Tuberculose. In: Tarantino. Doenças Pulmonares. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap 17. p. 294-380.

Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, Kofoed K, Eugen-Olsen J, Ravn P. CXCL-10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7. *Microbes and Infec* 2007; 9: 806-12.

Ruhwald M, Aabye MG, Ravn P. IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions. *Expert Ver Diagn* 2012; 12(2): 175-87.

Saguil A, Wyrick K, Hallgre J. Diagnostic Approach to Pleural Effusion. *Am Fam Physician* 2014; 90(2): 99-104.

Sahn SA, Heffner JE. Pleural fluid analysis. In: Light RW, Lee YCG, eds. Textbook of pleural diseases. 2nd ed. London: Arnold Press, 2008: 209-26.

Sahn SA, Huggins JT, San José ME, Álvarez-Dobaño JM, Valdés L. Can tuberculous pleural effusions be diagnosed by pleural fluid analysis alone? *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17: 787-93.

Sales R, Onishi R. Toracocentese e biópsia pleural. *J Bras Pneumol* 2006; 32 (Supl 4): S170-S173.

Sales RK, Vargas FS, Capelozzi VL, Seiscento M, Genofre EH, Teixeira LR, et al. Predictive models of pleural effusions secondary to tuberculosis or cancer. *Respirology* 2009; 14:1128-33.

Samanta S, Sharma A, Das B, Mallick AK, Kumar A. Significance of Total Protein, Albumin, Globulin, Serum Effusion Albumin Gradient and LDH in the Differential Diagnosis of Pleural Effusion Secondary to Tuberculosis and Cancer. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(8): BC14-8.

Sané M, Ba-Fall K, Lefebvre N, Mounguengui D, Camara P, Niang A, et al. Empiric antituberculous therapy in patients with unexplained exsudative pleural effusion. Is it valid in Senegal? *Rev Pneumol Clin* 2007; 63 (4): 247-50.

Santos AP, Corrêa RS, Ribeiro-Alves M, Soares da Silva ACO, Mafort TT, Leung J, et al. Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using IFN- γ , IP-10 and adenosine deaminase. *PLoS ONE* 2018; 13(8): e0202481.

Scharma SK, Mohan A, Kadiravan T. HIV-TB co-infection: epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Res* 2005; 550-67.

Sehgal IS, Dhooria S, Aggarwal AN, Behera D, Agarwal R. Diagnostic Performance of Xpert MTB/RIF in Tuberculous Pleural Effusion: Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2016;54(4):1133-6.

Seiscento M, Conde MB, Dalcolmo MM. Tuberculous pleural effusion. *J Bras Pneumol* 2006; 32 (Supl 4): S174-81.

Seiscento M, Vargas FS, Rujula MJP, Bombarda S, Uip DE, Galesi VMN. Aspectos epidemiológicos da tuberculose pleural no estado de São Paulo (1998-2005). *J Bras Pneumol* 2009; 35: 548-54.

Seixas JM, Faria J, Souza Filho JB, Vieira AF, Kritski A, Trajman A. Artificial neural network models to support the diagnosis of pleural tuberculosis in adult patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17(5):682-6.

Sharma N, Singh RK, Sharma P. Molecular Mycobacteriology and Expansion in Disease Diagnosis. *Indian J Clin Biochem* 2015; 31(2):138-47.

Shimokata K, Saka H, Murate T, Hasegawa Y, Hasegawa T. Cytokine content in pleural effusion. *Chest* 1991; 99: 1103-7.

Skouras VS, Magkouta SF, Psallidas I, Tsilioni I, Maragozidis P, Gourgoulisanis KI, et al. Interleukin-27 improves the ability of adenosine deaminase to rule out tuberculous pleural effusion regardless of pleural tuberculosis prevalence. *Infect Dis* 2015; 47: 477-83.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT). III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol* 2009; 35(10):1018-48.

Solari L, Soto A, Van der Stuyft P. Performance of clinical prediction rules for diagnosis of pleural tuberculosis in a high-incidence setting. *Tropical Medicine and International Health* 2017; 22(10): 1283–92.

Sonmezoglu Y, Turna A, Cevik A, Demir A, Sayar A, Dincer Y, et al. Factors affecting morbidity in chronic tuberculous empyema. *Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 56:99-102.

Steingart K, Schiller I, Horne D, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonar tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst* 2014; 1: CD009593.

Supriya P, Chanrasekaram P, Das SD. Diagnostic utility of interferon- γ -induced protein of 10 kDa (IP-10) in tuberculosis pleurisy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62 (2); 186-92.

Sutherland JS, Garba D, Fombah AE, Mendy-Gomez A, Mendy FS, Antonio M, et al. Highly Accurate Diagnosis of Pleural Tuberculosis by Immunological Analysis of the Pleural Effusion. *PLoS ONE* 2012; 7(1): e30324.

Sutherland JS, Mendy J, Gindeh A, Walzl G, Togun T, Owolabi A, et al. Use of lateral flow assays to determine IP-10 and CCL4 levels in pleural effusions and whole blood for TB diagnosis. *Tuberculosis* 2016; 96: 31-6.

Talbot EA, Adams LV, von Reyn CF. The Importance of Culture for Diagnosing Tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1213–14.

Tay TR, Tee A. Factors affecting pleural fluid adenosine deaminase level and the implication on the diagnosis of tuberculous pleural effusion: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13: 546.

Tiwari RP, Hattikudur NS, Bharmal RN, Kartikekeyan S, Deshmukh NM, Bisen PS. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. *Tuberculosis* 2007; 87: 193-201.

Valdés L, José ES, Alvarez D, Valle JM. Adenosina deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions; diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculosis pleurisy. *Eur Respir J* 1996; 9: 747-51.

Valdés L, Alvarez D, San José E, Penela P, Valle JM, García-Pazos JM, et al. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med* 1998;158: 2017-21.

- Valdés L, San José JM, Pose A, Gude M, González-Barcala FJ, Alvarez-Dobaño JM, et al. Diagnosing tuberculous pleural effusion using clinical data and pleural fluid analysis. A study of patients less than 40 years old in an area with a high incidence of tuberculosis. *Respir Med* 2010; 104(8):1211-7.
- Valdés L, San José E, Ferreiro L, Golpe A, Gude F, Álvarez-Dobaño JM, et al. Interleukin 27 Could Be Useful in the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusions. *Respiratory Care* March 2014, 59 (3) 399-405.
- Valdés L, San José E, Ferreiro L, Golpe A, González-Barcala FJ, Toubes ME. Predicting malignant and tuberculous pleural effusions through demographics and pleural fluid analysis of patients. *Clin Resp J* 2015; 9: 203-13.
- Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost Jr KC, et al. Mycobacterium: Phenotypic and Genotypic Identification. Em: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al, editors. *Microbiology*. 8a ed. Washington: ASM Press, 2003. p.560-84.
- Vorster MJ, Allwood BW, Diacon AH, Koegelenberg CF. Tuberculous pleural effusions: advances and controversies. *J Thorac Dis* 2015; 7(6):981-91.
- Walrath J, Zukowski L, Krywiak A, et al. Resident Th1-like effector memory cells in pulmonary recall responses to Mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 48–55.
- Walzl Z, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 343-54.
- Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, Ewer K, Prakash M, Klenerman P, et al. Ex vivo Characterization of Early Secretory Antigenic Target 6 – Specific T Cells at Sites of Active Disease in Pleural Tuberculosis. *Clin Infec Dis* 2005; 40: 184-7.
- Wong CL, Holroyd-Leduc J, Straus SE. Does this patient have a pleural effusion? *JAMA* 2009; 301(3):309-17.
- Wong PC. Management of tuberculous pleuritis: can we do better? *Respirology* 2005; 10:144–8.
- Wongtim S, Silachamroon U, Ruxrungtham K, Udompanich V, Limthongkul S, Charoenlap P, et al. Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions. *Thorax* 1999; 54: 921-4.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018 – [cited 2018 Dec 27] Available from: <http://www.who.int.tb>.
- Yang Q, Cai Y, Zhao W, Wu F, Zhang M, Luo K, et al. IP-10 and MIG are compartmentalized at the site of disease during pleural and meningeal tuberculosis and are decreased after tuberculosis treatment. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21 (12): 1635-44.
- Zhai K, Lu Y, Shi HZ. Tuberculous pleural effusion. *J Thorac Dis*. 2016; 8(7): E486-94.

Zhai W, Wu F, Zhang Y, Fu Y, Liu Z. The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis. *Int J Mol Sci* 2019; 20(2): 340-58.

Zumla A, James DG. Granulomatous infections: etiology and classification. *Clin Infect Dis* 1996; 23:146-58.

Zumla A, Raviglioni M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med* 2013; 368 (8):745-55.

APÊNDICE A – Formato final do 1º artigo científico (Artigo publicado)



RESEARCH ARTICLE

Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using IFN- γ , IP-10 and adenosine deaminase

Ana Paula Santos¹, Raquel da Silva Corrêa², Marcelo Ribeiro-Alves³, Ana Carolina Oliveira Soares da Silva², Thiago Thomaz Mafor¹, Janaina Leung¹, Geraldo Moura Batista Pereira^{2,4}, Luciana Silva Rodrigues^{2*}, Rogério Rufino^{1,4}

1 Department of Pulmonary Care, Pedro Ernesto University Hospital (HUPE)—State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2** Laboratory of Immunopathology, Medical Sciences Faculty (FCM)—State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **3** Laboratory of Clinical Research on STD/AIDS, National Institute of Infectology Evandro Chagas (INI)—Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **4** Laboratory of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

These authors contributed equally to this work.

* lrodrigues.uerj@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Santos AP, Corrêa RdS, Ribeiro-Alves M, Soares da Silva ACO, Mafor TT, Leung J, et al. (2018) Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using IFN- γ , IP-10 and adenosine deaminase. PLoS ONE 13(8): e0202481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202481>

Editor: Katalin Andrea Wilkinson, University of Cape Town, SOUTH AFRICA

Received: June 8, 2018

Accepted: August 4, 2018

Published: August 27, 2018

Copyright: © 2018 Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Fundação Carlos Chagas de Amparo à pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (grant #261101792014).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Pleural tuberculosis (PITB) is the most common extrapulmonary manifestation of this infectious disease which still presents high mortality rates worldwide. Conventional diagnostic tests for PITB register multiple limitations, including the lack of sensitivity of microbiological methods on pleural specimens and the need of invasive procedures such as pleural biopsy performance. In this scenario, the search for biological markers on pleural fluid (PF) has been the target of several studies as a strategy to overcome the limitations of PITB diagnosis. This study aims to evaluate the use either isolated or in combination with adenosine deaminase (ADA), interferon-gamma (IFN- γ), interferon-gamma inducible protein of 10-kD (IP-10) levels on PF in order to guide an accurate anti-TB treatment in microbiologically non-confirmed cases.

Methods and findings

Eighty patients presenting pleural effusion under investigation were enrolled in a cross-sectional study conducted at Pedro Ernesto University Hospital, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Peripheral blood (PB) and PF samples collected from all patients were applied to the commercial IFN- γ release assay, QuantiFERON-TB Gold In-Tube, and samples were analyzed for IFN- γ and IP-10 by immunoassays. ADA activity was determined on PF by the colorimetric method. Based on microbiological and histological criteria, patients were categorized as follow: confirmed PITB ($n = 16$), non-confirmed PITB ($n = 17$) and non-PITB ($n = 47$). The *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific production of IFN- γ and IP-10 on PB or PF did not show significant differences. However, the basal levels of these biomarkers, as well as the ADA activity on PF, were significantly increased in confirmed PITB in comparison to

non-PITB group. Receiver operating characteristics curves were performed and the best cut-off points of these three biomarkers were estimated. Their either isolated or combined performances (sensitivity [Se], specificity [Sp], positive predictive value [PPV], negative predictive value [NPV] and accuracy [Acc]) were determined and applied to Venn's diagrams among the groups. Based on the confirmed PITB cases, IFN- γ showed the best performance of them at a cut-off point of 2.33 IU/mL (Se = 93.8% and Sp = 97.9%) followed by ADA at a cut-off of 25.80 IU/L (Se = 100% and Sp = 84.8%) and IP-10 (Cut-point = 4,361.90 pg/mL, Se = 75% and Sp = 82.6%). IFN- γ plus ADA (cut-point: 25.80 IU/L) represent the most accurate biomarker combination (98.4%), showing Se = 93.7%, Sp = 100%, PPV = 100% and NPV = 97.9%. When this analysis was applied in non-confirmed PITB, 15/17 (88.2%) presented at least two positive biomarkers in combination.

Conclusion

IFN- γ , IP-10, and ADA in PITB effusions are significantly higher than in non-PITB cases. IFN- γ is an excellent rule-in and rule-out test compared to IP-10 and ADA. The combination of IFN- γ and ADA, in a reviewed cut-off point, showed to be particularly useful to clinicians as their positive results combined prompts immediate treatment for TB while both negative results suggest further investigation.

Introduction

Tuberculosis (TB) remains a global public health problem ranking above the Acquired Immuno-deficiency Syndrome (AIDS) as a leading cause of death between infectious diseases [1]. Among extrapulmonary presentations of the disease, pleural tuberculosis (PITB) is the most common [2], summing 42% of these cases [3]. Despite its frequency, PITB remains a challenge for diagnosis due to the paucibacillary nature in patients' biological specimens and the need for invasive procedures, which are not free from complications, are relatively expensive and time demanding [4–7].

Based on TB's pathophysiology that represents largely an immunological reaction in which a vast category of cytokines and chemokines are intimately involved, the evaluation of biomarkers on pleural fluid (PF) configures an alternative for TB diagnosis [8–10]. Until now, adenosine deaminase (ADA) is a useful and cost-effective PF marker routinely used in high prevalence settings for diagnosis of PITB [11]. However, high levels of ADA can also be observed in other types of infections, malignant pleural effusion, and rheumatic diseases, and thus is not specific for PITB [12].

The role of interferon-gamma release assays (IGRA) adapted to PF for PITB diagnosis is still under evaluation. Several studies in this line of investigations have been published using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay T-SPOT.TB (T-SPOT.TB; Oxford Immunotec Limited, United Kingdom) or the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT; Cellestis Limited, Australia), both IGRA tests approved by World Health Organization to be used only for latent TB diagnosis [13], however showing conflicting results [5, 14–18]. Since that there is an extensive literature [8, 9, 19, 20] regarding the evaluation of PF biomarkers showing that the TB's lymphocytic pleural effusion presents an increased expression of interferon- γ (IFN- γ) and its inducible chemokines, such as interferon- γ inducible protein of 10-kD (IP-10) [19, 21], we speculate that the application of IGRA could be extremely promising and show considerable adjuvant value on diagnosis of paucibacillary patients.

Given the importance of ADA for PITB diagnosis and the unsolved determination of the better cut-off value of this marker associated with the advent of new PITB biomarkers, we aimed to evaluate the use, either isolated or in combination, of ADA, IFN- γ , IP-10 as well as the Mtb-specific immune responses in PF samples based on QFT-GIT system in order to improve the differential diagnosis of PITB. Receiver operating characteristics (ROC) curves were generated to calculate the best cut-off value for each immunological marker on PF. Further, their performances were estimated in a cohort of patients presenting pleural effusion under investigation and results applied to Venn's diagrams. The data showed here revealed an effort to apply available diagnostic tools, either alone or in combination, to be used as potential candidates for differential diagnosis of PITB, especially in cases that do not fit into the TB gold standard methods.

Material and methods

Ethics statement

The study protocol was approved by the biomedical research ethics committee of Pedro Ernesto University Hospital, Rio de Janeiro State University (HUPE/UERJ; #1.100.772). All individuals signed a free written informed consent. All samples were fully anonymized before processing to protect the study participants' identities.

Study design, samples and data collection

A cross-sectional study was conducted at HUPE/UERJ a tertiary care center at RJ, Brazil. Patients aged ≥ 18 years with pleural effusion under investigation and with an indication of thoracentesis were consecutively enrolled from June 2015 to February 2017. Patients who refused being submitted to the procedure and pregnant women were excluded.

Peripheral blood (PB) was collected and drawn directly into each vacutainer tube provided as part of the QFT-GIT system (QFT-GIT; Cellestis Limited, Australia). Ultrasound-guided thoracentesis was performed by a trained pulmonologist who collected PF which was directly drawn into each tube of QFT-GIT and also sent for routine diagnostic tests, including chemistry panel, total and differential cell count, ADA measurement [22], cytopathology, Xpert MTB/RIF[®] assay and microbiological analysis [bacteria, fungi and mycobacteria (Lowenstein Jensen solid media)]. Pleural biopsy with Cope's needle was performed when there were no contraindications and pleural tissue was evaluated for histopathology analysis, acid-fast bacilli (AFB) staining and mycobacterial culture.

We reviewed the medical records of these patients to evaluate physical, clinical and demographic information, medical history and laboratory data. Signs and symptoms included subjective reported presence and duration such as a cough, fever, chest pain, dyspnea, night sweats and weight loss. HIV test was offered to all patients included in the study and their results, as well as the presence of other comorbidities, were also recorded. Radiological finds were based on the chest X-ray and were classified either as: unilateral pleural effusion (UPE) or bilateral pleural effusion (BPE). Data on the respiratory specimen (spontaneous sputum, induced sputum or bronchoalveolar lavage) were collected when available. <http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.saceaaw>

Study population and diagnostic criteria

Confirmed PITB cases were defined based on a positive result of the following microbiological and/or histopathological tests on PF or pleural tissue: AFB smear microscopy, mycobacterial culture or Xpert MTB/RIF[®] and/or evidence of granuloma with or without caseous necrosis.

Non-confirmed PITB cases were consisted of: i) *possible PITB*—clinical manifestations suggesting TB (fever, chest pain, dyspnea, cough night sweats, hyporexia and/or weight loss), and a lymphocytic and exudative pleural effusion associated with ADA levels above 40 IU/L, followed by a full recovery after at least six months of anti-TB treatment; or ii) *empiric PITB*—cases with clinical manifestations suggesting TB (as previously described above) which do not fill the criteria of confirmed or possible PITB and that fully recover after at least six months of anti-TB treatment.

Non-PITB cases were defined as those with pleural or pleuropulmonary diseases, excluding active TB based on clinical, laboratory, radiological, microbiological and/or pathological features. Malignant pleural effusions were diagnosed by a positive PF cytologic result or malignant cells identified in the pleural tissue. Even when both of these tests results were negative, malignant effusion was diagnosed when a primary cancer was known to have disseminated and no other cause of pleural effusion was identified. Patients who did not fit the criteria used for PITB diagnosis defined as above and with unknown cause of pleural effusion were classified as "undefined" (UND) pleural effusion and considered as non-PITB.

QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay

QFT-GIT was performed in all patients with pleural effusion under investigation. Briefly, one milliliter of both PB and PF were directly drawn in each of the three tubes of QFT-GIT pre-coated with saline (Nil; negative control) or Mtb-specific antigens [early secretory antigenic target -6 (ESAT-6), culture filtrate protein-10 (CFP-10) and TB 7.7] or mitogen (Mit; positive control) and incubated for 24 h at 37°C. After centrifugation, the supernatant was collected and stored frozen at -20°C until the IFN- γ determination by an ELISA using QFT-GIT kit according to the manufacturer's instruction (Cellestis Limited, Australia). IFN- γ -Mtb-specific levels were calculated by subtracting the obtained value with the Nil/control tube. QFT-GIT applied on PB was defined with a positive result when IFN- γ levels in response to Mtb-specific antigens ≥ 0.35 IU/mL and IFN- γ levels in response to mitogen (mitogen minus Nil/control) ≥ 0.5 IU/mL. Indeterminate result was defined as IFN- γ of Nil/control > 8.0 IU/mL or positive control value < 0.5 IU/mL. Results were calculated according to the manufacturer's software. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0202481.g004>

IP-10 quantification

IP-10 supernatant levels were measured using the DuoSet ELISA kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Inc, MN, USA). Results were expressed in pg/mL after processing the data with software SoftMax Pro. The lower level of this assay was 31.3 pg/mL while its upper limit was 20,000 pg/mL and readings greater than this were set at 20,000 pg/mL for the purpose of analysis.

Statistical analysis

In the evaluation of the sociodemographic, clinical and laboratory features among the different groups of individuals, for continuous numerical variables, Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks tests was used for assessing the hypothesis that the different samples in the comparison were drawn from the same distribution or from distributions with the same median. Likewise, for categorical nominal variables, Fisher's exact tests were used in the evaluation of frequencies among the three different groups (confirmed PITB, non-confirmed PITB, and non-PITB) for assessing the hypothesis of independence between the groups of individuals and these variables.

Further, pairwise comparisons of each QFT-GIT parameter mean (Nil/control, Antigen, Mitogen and Antigen minus Nil/control) and ADA dosage were performed by contrasts between confirmed PITB and non-PITB groups obtained after both bi- and multivariate linear models fitted by ordinary least square regressions. The decision to use only these two groups (confirmed PITB and non-PITB) was based on the concern of possible bias. P-values were corrected by the Tukey Honest Significant Difference (HSD) method. After QFT-GIT parameters and ADA pairwise comparisons, we conducted Holm-Bonferroni Type I error adjustment for multiple comparisons. In order to eliminate sample bias, confounding variables (gender, duration of signs and symptoms, DHL, protein and albumin levels on PF, total, mononuclear (MN) and polymorphonuclear (PMN) cells on PF, chest X-ray, previous TB, history of smoke, and comorbidities as cancer, renal failure and use of immunosuppressive drugs) were selected by bivariate linear models fitted by ordinary least square regressions by backward elimination and were retained in multivariate models if they had any adjusted-P-value < 0.2 in any comparison. The cut-off points of the biomarkers for PITB diagnosis were calculated from the ROC curve using the Youden method. Again, in order to calculate the best cut-off values, only cases diagnosed using rigid criteria (confirmed TB) were included. Performance of PITB diagnosis algorithms by the three biomarkers' cut-off points was estimated by its leave-one-out cross-validation (LOOCV) accuracy (Acc), sensitivity (Se), specificity (Sp), positive (PPV) and negative predictive values (NPV), and false-positive and negative ratios with 95% CI. Result classifiers using either each biomarker or their combination were later evaluated, and their results illustrated by Venn's diagrams. All analysis was performed in software R v. 3.3.1. P-value < 0.05 denoted statistical significance.

Results

General characteristics of the study population

A total of 104 patients were submitted to thoracentesis at HUPE/USERJ between June 2015 and February 2017 in order to determine the pleural effusion etiology. Of these, 80 patients were enrolled in this study by fill the inclusion criteria and a great panel of laboratory investigations were performed, as depicted in Fig 1.

Culture on PF and pleural tissue were performed in 76 and 12 cases, respectively, and histopathological data were available for 39/80 cases (Fig 1). The positivity of this microbiological method in our sample was low, and solid culture on PF and pleural tissue registered values of 9.7% and 22.2%, respectively. Pleural tissue biopsy and the identification of granuloma on histopathological analysis showed a better yield than culture (61.1%). The yield of ADA dosage (> 40 IU/L) was 81.8% and in only 14.3% of PITB cases, Xpert MTB/RIF[®] detected Mtb (S1 Table). Thirty-three cases (41%) were diagnosed as PITB based on the diagnostic criteria previously described [16 confirmed PITB and 17 non-confirmed PITB (15 possible and 2 empiric)]. Forty-seven patients (59%) were enrolled as non-PITB patients: 27 malignancies, 10 renal/cardiac/hepatic failure, 2 empyema, 2 systemic lupus erythematosus, 1 chylothorax, 1 endometriosis and 3 undefined pleural effusion (Fig 1).

Sociodemographic, clinical and diagnostic characteristics of these patients are shown in Table 1. Except for age, a positive history of smoking and arterial hypertension, PITB and non-PITB groups were homogeneous. Non-PITB patients had a higher duration of signs/symptoms until diagnosis when compared to PITB patients (90 days vs 60 days, $p = 0.03$). Unilateral pleural effusion was the commonest radiological presentation of PITB group (97%) while non-PITB cases presented unilateral pleural effusion (68.1%), followed by bilateral pleural effusion (23.4%). Tuberculous PF presented higher levels of lymphocyte percentage ($p = 0.01$) and total

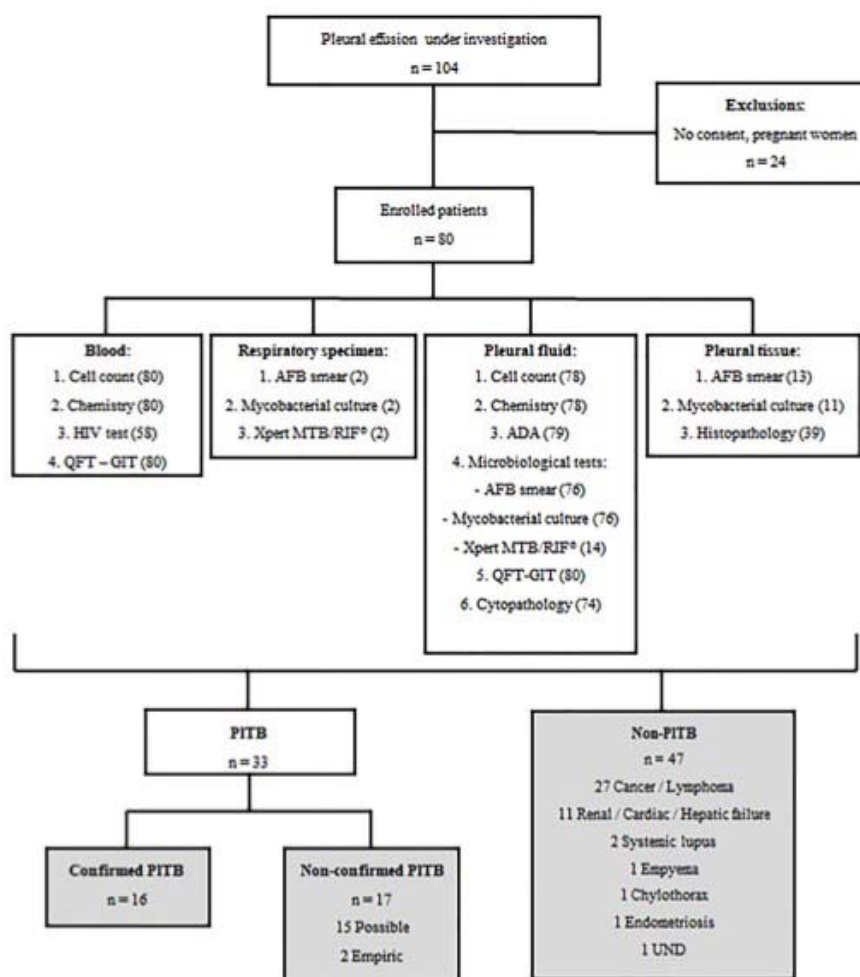


Fig 1. Flow chart of the study design and diagnostic testing performed. QFT-GIT: QuantiFERON-TB Gold in-Tube; AFB: acid-fast bacilli; ADA: adenosine deaminase; TB: Tuberculosis; UND: undefined diagnosis. Numbers in parenthesis refer to the patients submitted to the correspondent diagnostic test. Gray boxes show the final diagnosis and the study groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202481.g001>

protein ($p = 0.04$). Confirmed and non-confirmed PITB did not present statistically different characteristics (Table 1).

ADA activity measurement was performed in 79 out of 80 patients included in the study and was the most frequent diagnostic method used (Fig 1), contributing to PITB diagnosis in 81.8% of the patients. Using the classical cut-off point of 40 IU/L, ADA positivity showed statistically significant differences between PITB and non-PITB positivity frequencies when all cases were considered (S1 Table), while there was no difference between confirmed and non-confirmed PITB (Table 1).

Table 1. Baseline characteristics of the study population. Socio-demographic, clinical, laboratory and radiological features according to the diagnosis of PITB (confirmed and non-confirmed cases) and non-PITB.

Characteristics	Non-PITB	C-PITB	NC-PITB	Non-TB vs TB	C-PITB vs NC-PITB
	(N = 47)	(N = 16)	(N = 17)	p-Value	p-Value
Sex, (%)					
Male	26 (55)	11 (69)	12 (71)	0.25	1.0
Female	21 (45)	5 (31)	5 (29)		
Age, years					
Median (IQR)	62 (49–76)	42.5 (33–49)	45 (26–54)	< 0.0001	0.70
Smoke, (%)					
Yes	24 (51)	4 (25)	4 (23.5)	0.03	0.57
HIV status, (%)					
Positive	3 (4)	1 (6)	-		0.35
Negative	29 (62)	12 (75)	15 (88)	0.15	
Refuse testing	15 (34)	3 (19)	2 (12)		
Previous comorbidities, (%)					
Arterial hypertension	17 (36)	1 (6)	4 (23.5)	0.04	0.33
Diabetes mellitus	7 (15)	-	1 (6)	0.13	1.0
Renal failure	3 (6)	-	-	0.26	-
Systemic lupus	1 (2)	-	-	1	-
Viral hepatitis	3 (6)	-	-	0.26	-
Inflammatory bowel disease	-	1 (6)	-	0.41	0.48
Cancer	5 (11)	1 (6)	-	0.39	0.48
Corticosteroids use	-	1 (6)	-	0.24	0.48
Immunosuppressive therapy	3 (6)	-	-	0.26	-
Previous transplant	3 (6)	-	-	0.26	-
Previous tuberculosis	2 (4)	1 (6)	2 (12)	0.66	0.51
Signs/symptoms, (%)					
Fever	8 (17)	8 (50)	4 (23.5)	0.14	0.28
Cough	22 (47)	6 (37.5)	8 (47)	0.93	0.66
Chest pain	15 (32)	8 (50)	8 (47)	0.22	0.86
Dyspnea	34 (72)	12 (75)	7 (41)	0.47	0.14
Weight loss	13 (28)	6 (37.5)	6 (35)	0.81	0.86
Duration of signs/symptoms					
Median days (IQR)	90 (45–195)	60 (27.5–90)	52.5 (30–90)	0.03	0.55
Pleural fluid, Median (IQR)					
Total cell count, mm ³	1,150 (500–2600)	2,100 (635–3882)	3,600 (707–5000)	0.04	0.41
Lymphocyte, %	73 (56–90)	90 (61–96)	95 (90–97)	< 0.0001	0.55
Total protein, g/dL	4.1 (3.6–5.3)	5.55 (4.90–6.17)	5.65 (4.92–6.15)	< 0.0001	0.35
Albumin, g/dL	2.6 (1.9–3.0)	2.80 (2.60–3.10)	3.00 (2.30–3.10)	0.05	0.50
DHL, IU/L	185 (137–597)	457 (214–876)	393.5 (259.5–654)	0.003	0.90
ADA, (%)					
≥ 40 IU/L	2 (4.3)	12 (75)	15 (88.2)	< 0.0001	0.40
< 40 IU/L	44 (93.6)	4 (25)	2 (11.8)		

(Continued)

Table 1. (Continued)

Characteristics	Non-PITB (N = 47)	C-PITB (N = 16)	NC-PITB (N = 17)	Non-TB vs TB p-Value	C-PITB vs NC-PITB p-Value
Missing data	1 (2.1)	-	-		
Chest X-ray, (%)					
Unilateral pleural fluid	32 (68.1)	16 (100)	16 (94.1)	0.006	1
Bilateral pleural fluid	11 (23.4)	-	1 (5.9)		
Missing data	4 (8.5)	-	-		
Peripheral blood QFT-GIT, (%)					
Positive	11 (23.5)	9 (56.5)	9 (53)	0.01	0.53
Negative	35 (74.5)	6 (37.5)	8 (47)		
Indeterminate	1 (2)	1 (6)	-		

PITB: Pleural tuberculosis; C-PITB: Confirmed PITB; NC-PITB: Non-confirmed PITB; IQR: Interquartile range; HIV: Human immunodeficiency virus; DHL: Lactate dehydrogenase; ADA: adenosine deaminase; QFT-GIT: QuantiFERON-TB Gold In-Tube.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202481.t001>

QFT-GIT assay performed on PB was positive in 18/33 (54.5%) of the PITB patients, while 11/47 (23.5%) of non-PITB patients were positive ($p = 0.01$) (Table 1).

IFN- γ , IP-10, and ADA measurements in the pleural fluid

Firstly, we decided to determine whether these biomarkers known in the pathophysiology of TB were present at the local site of Mtb infection in our study population. ADA activity was performed directly in PF and the levels of IFN- γ and IP-10 was evaluated after stimulation with Mtb-specific antigens using the QFT-GIT system. In this analysis, we seek to identify possible differences according to the parameters of QFT-GIT performed on PF among confirmed PITB ($n = 16$) and non-PITB ($n = 47$) groups using an adjusted linear model. The obtained mean values were adjusted to avoid sample bias by selected sets of the following confounding factors: gender, previous TB, cancer, chest X-ray, protein level, PMN percentage and MN percentage for IFN- γ ; previous TB, protein level, PMN percentage and MN percentage for IP-10; and protein level, PMN percentage and MN percentage for ADA.

Mtb-specific stimulated PF samples did not demonstrate significant differences regarding both IFN- γ and IP-10 levels between confirmed PITB and non-PITB patients in our study population (Fig 2A and 2B). However, the unstimulated or background levels of IFN- γ and IP-10 (Nil/control tube) were higher increased in the PITB group when compared to non-PITB ($p < 0.0001$) (Fig 2A and 2B). IFN- γ and IP-10 levels in response to Mtb-specific antigens on PB also did not show significant differences (S1 Fig). ADA activity measurement in PF samples revealed significantly increased levels of this biomarker in confirmed PITB group ($p < 0.0001$) in comparison to non-PITB group, showing five times higher levels on confirmed PITB (61.05 IU/L in confirmed PITB vs 11.85 IU/L in non-PITB; $p < 0.0001$) (Fig 2C).

These data reinforce the idea that IFN- γ , IP-10, and ADA are produced in high levels in Mtb infection site and encourage the use of their baseline levels in the differential diagnosis routine of pleural effusion.

Performance and diagnostic usefulness of IFN- γ , IP-10, and ADA levels in pleural fluid

Since ADA's activity is a widely used method in clinical practice for PITB diagnosis and the vast literature data [8, 9, 19–21] in conjunction with the present study showing the greater

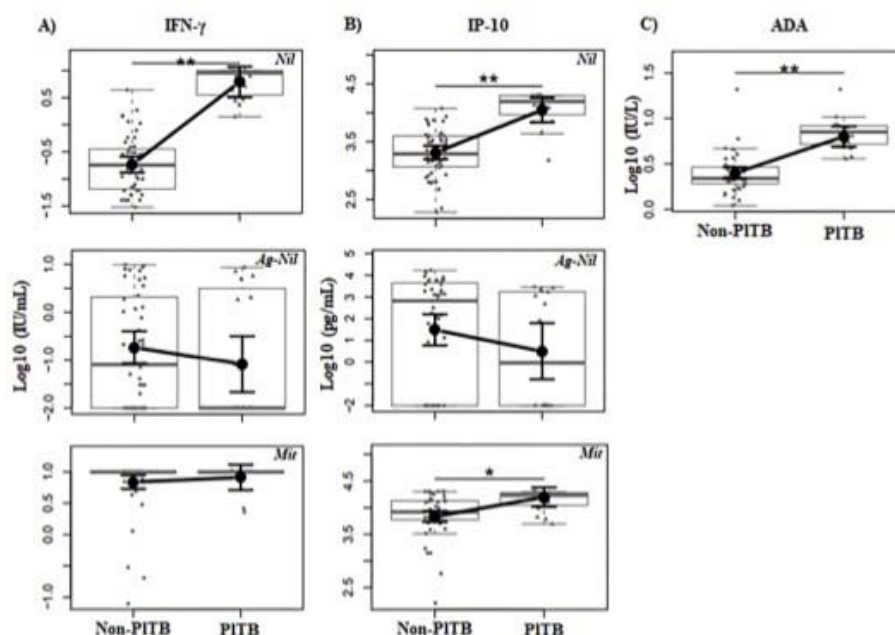


Fig 2. Concentration of IFN- γ , IP-10, and ADA in pleural fluid. (A) IFN- γ and (B) IP-10 were measured in the supernatants of the QFT-GIT system from PF and (C) ADA activity was measured directly in PF. Obtained levels from each biomarker were analyzed in a logarithmic scale and illustrated using boxplots to compare the groups: Non-PITB (N = 46) and confirmed PITB (n = 16). Small black dots represent individual cases and box plots represent the interquartile range and sample median (central solid gray line). Bigger black dots and vertical bars represent linear model estimated adjusted means and 95% confidence intervals (CI 95%). Comparisons of means among groups were performed by contrasts/differences obtained after both bi- and multivariate linear models fitted by ordinary least square regressions. The confounders for the parameters illustrated above were: (A) Nil/control (unstimulated) IFN- γ : gender, previous TB, cancer, chest X-ray, protein level, PMN percentage and MN percentage; Ag-Nil IFN- γ : gender, renal failure, and albumin; Mit-stimulated IFN- γ : smoke, chest X-ray, DHL, and albumin; (B) Nil/control (unstimulated) IP-10: previous TB, protein level, PMN percentage, and MN percentage; Ag-Nil IP-10: age, renal failure, and albumin; Mit-stimulated IP-10: previous TB, cancer, smoke, DHL, and albumin; and, (C) for ADA: protein level, PMN percentage, and MN percentage. Nil: Negative/control tube; Ag-Nil: Mtb-specific antigens minus Nil; Mit: Mitogen. * p = 0.001; ** p < 0.0001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202481.g002>

levels of IFN- γ and IP-10 in PF, we hypothesize that the combinations of these three biomarkers could improve the TB diagnostic accuracy. First of all, we calculate the best cut-off values for these three biomarkers using confirmed PITB and non-PITB (except one case in the non-PITB group was excluded due to missing data about ADA levels). Moreover, only IFN- γ and IP-10 unstimulated or background (from Nil/control tube) levels were used for the purpose of these analyses as they presented the highest values and statistical differences between the groups.

Receiver operating characteristics curves were performed as shown in Fig 3 and cut-off values were calculated according to the Youden's Index. IFN- γ registered the highest value of AUC (0.989), followed by ADA (0.960) and IP-10 (0.832). The optimal cut-point for ADA was 25.8 IU/L, which resulted in a Se of 100% (100–100), a Sp of 84.8% (77.2–92.3), a PPV of 69.6% (55.3–83.5), and a NPV of 100% (90.4–100). For IFN- γ , the optimal cut-off value calculated was 2.33 IU/mL, with a Se of 93.7% (84.8–100) and a Sp of 97.8% (94.8–100). Likewise,

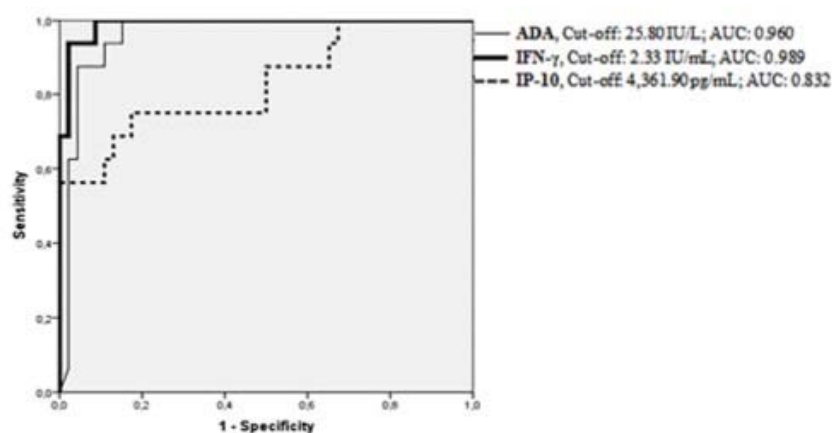


Fig 3. Receiver operating curves of ADA, IFN- γ , and IP-10 in pleural fluid. Receiver operating curves were plotted and each biomarker had its area under the curve (AUC) calculated. The best cut-off value for PITB diagnosis was established according to Youden's Index. The statistical analysis was performed using confirmed PITB (N = 16) and non-PITB (N = 46).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202481.g003>

the optimal IP-10 cut-off value was 4,361.90 pg/mL showing 75% and 82.6% of sensitivity and specificity, respectively (Table 2).

Combinatorial analysis and Venn's diagram application in pleural TB diagnosis using ADA_(25.8 IU/L), IFN- γ , and IP-10

Although the individual use of these three immunological markers had shown good performances, analysis in combination of their positivity offered much better results of specificity and PPV, with the capacity of ruling in PITB as a diagnosis in 100% of our samples when the combination of at least 2 of the biomarkers were positive (Table 2).

None of the confirmed PITB cases presented isolated positivity of IFN- γ or IP-10. Between them, IP-10 was the least specific (82.6%) showing positive results in 8 non-PITB cases (5 malignancies, 1 endometriosis, 1 cardiac failure and 1 hepatic failure). Only one case of cardiac failure among the 46 non-PITB cases was positive for IFN- γ alone (Sp = 97.8%). ADA independent results in their classical cut-point (40IU/L) have shown superior Sp, PPV, NPV, and Acc when compared to the one calculated in the present study (25.8 IU/L; Table 2).

Of the 16 confirmed PITB cases, 15 (93.7%) were positive using the combination of either two biomarkers among ADA_(25.8IU/L), IFN- γ and IP-10 (Fig 4). Noteworthy, none of the non-PITB was positive (Sp = 100%) using any of these combinations, which resulted in a PPV of 100% and an Acc of 93.5% in our samples, as illustrated in Table 2. Whichever combination of positive biomarkers was done, Sp and PPV achieved 100%, overcoming the lack of specificity of ADA_(25.8IU/mL) alone. But the combination of positivity of ADA_(25.8 IU/L) plus IFN- γ registered the best performance of all, with an Acc = 98.4% (95% CI 96.1–100%), Se = 93.7%, Sp = 100%, PPV = 100% and NPV = 97.9%. IFN- γ plus IP-10 and ADA_(25.8 IU/L) plus IP-10 registered the same behavior, with a lower sensitivity (75%) but a Sp and a PPV of 100% (Table 2).

These results were illustrated using Venn's diagrams and can be seen in Fig 4. When the 16 confirmed PITB cases were analyzed, IFN- γ plus IP-10 plus ADA_(25.8 IU/L) positivity was registered in 12/16 (87.5%) cases. The intersection of only IFN- γ plus ADA_(25.8 IU/L) positivity

Table 2. Performance outcomes of IFN- γ , IP-10, and ADA for the PITB diagnosis.

	Se (95% CI)	Sp (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)	Acc (95% CI)
Independent IFN- γ	93.7 (84.8–100)	97.8 (94.8–100)	93.7 (84.8–100)	97.8 (94.8–100)	96.8 (93.6–99.9)
Independent IP-10	75 (58.9–91.1)	82.6 (74.6–90.6)	60 (43.9–76.1)	90.5 (84–97)	80.6 (73.5–87.7)
Independent ADA _(40 IU/L)	75 (74.6–75.4)	95.7 (95.6–95.8)	85.7 (85.4–86)	91.7 (91.5–91.8)	90.3 (90.2–90.4)
Independent ADA _(25.8 IU/L)	100 (100–100)	84.8 (77.2–92.3)	69.6 (55.6–83.5)	100 (90.4–100)	88.7 (83–94.4)
IFN- γ (+)					
IP-10 (+)	7	100	100	92	93.5
ADA _(25.8 IU/L) (+)	(58.9–91.1)	(100–100)	(100–100)	(86.5–97.4)	(89.1–98)
IFN- γ (+)					
IP-10 (+)	75	100	100	92	93.5
ADA _(25.8 IU/L) (-)	(58.9–91.1)	(100–100)	(100–100)	(86.5–97.4)	(89.1–98)
IFN- γ (+)					
IP-10 (-)	93.7	100	100	97.9	98.4
ADA _(25.8 IU/L) (+)	(84.8–100)	(100–100)	(100–100)	(94.9–100)	(96.1–100)
IFN- γ (-)					
IP-10 (+)	75	100	100	92	93.5
ADA _(25.8 IU/L) (+)	(58.9–91.2)	(100–100)	(100–100)	(86.5–97.4)	(89.1–98)

IFN- γ : interferon-gamma; IP-10: interferon-gamma inducible protein of 10-kD; ADA: adenosine deaminase; Se: Sensitivity; Sp: Specificity; PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value; Acc: Accuracy.

Se, Sp, PPV, NPV and Acc are expressed as percentages.

Performance outcomes when confirmed PITB was compared to non-PITB patients.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202481.t002>

added more 3 cases, summing 15/16 (93.7%), and in one case ADA_(25.8 IU/L) was lonely positive (Fig 4A). In the non-PITB group, we have observed no intersection among the three biomarkers positivity, which visually represents the specificity of 100% related to possible positivity combinations (Fig 4B). It is worth to note that the isolated positivity of ADA_(25.8 IU/L) have resulted in a mistaken diagnosis of 7/46 (15.2%) cases in non-PITB group (2 systemic erythematous lupus, 2 lymphomas, 1 poorly differentiated cancer, 1 empyema, 1 undefined diagnosis) if only this diagnostic test was used.

When Venn's diagram was applied in our 17 non-confirmed PITB cases, IFN- γ plus IP-10 plus ADA_(25.8 IU/L) positivity was found in 14/17 (82.3%) cases, IP-10 plus ADA_(25.8 IU/L) have included one more case and again, only one case presented the isolated positivity of ADA_(25.8 IU/L) (Fig 4C).

Discussion

To help surpass the limitations of traditional and conventional methods for PITB diagnoses, such as the lack of sensitivity of microbiological methods on pleural specimens and the need of invasive procedures for pleural biopsy, the search for biological markers on PF has been the target of several studies [23–25]. In our study, we did not observe significant differences regarding IFN- γ and IP-10 production in Mtb-specific PF response between the non-PITB and confirmed PITB patients based on the QFT-GIT assay. However, unstimulated or background levels of IFN- γ and IP-10 in the same specimens were significantly higher in PITB group when

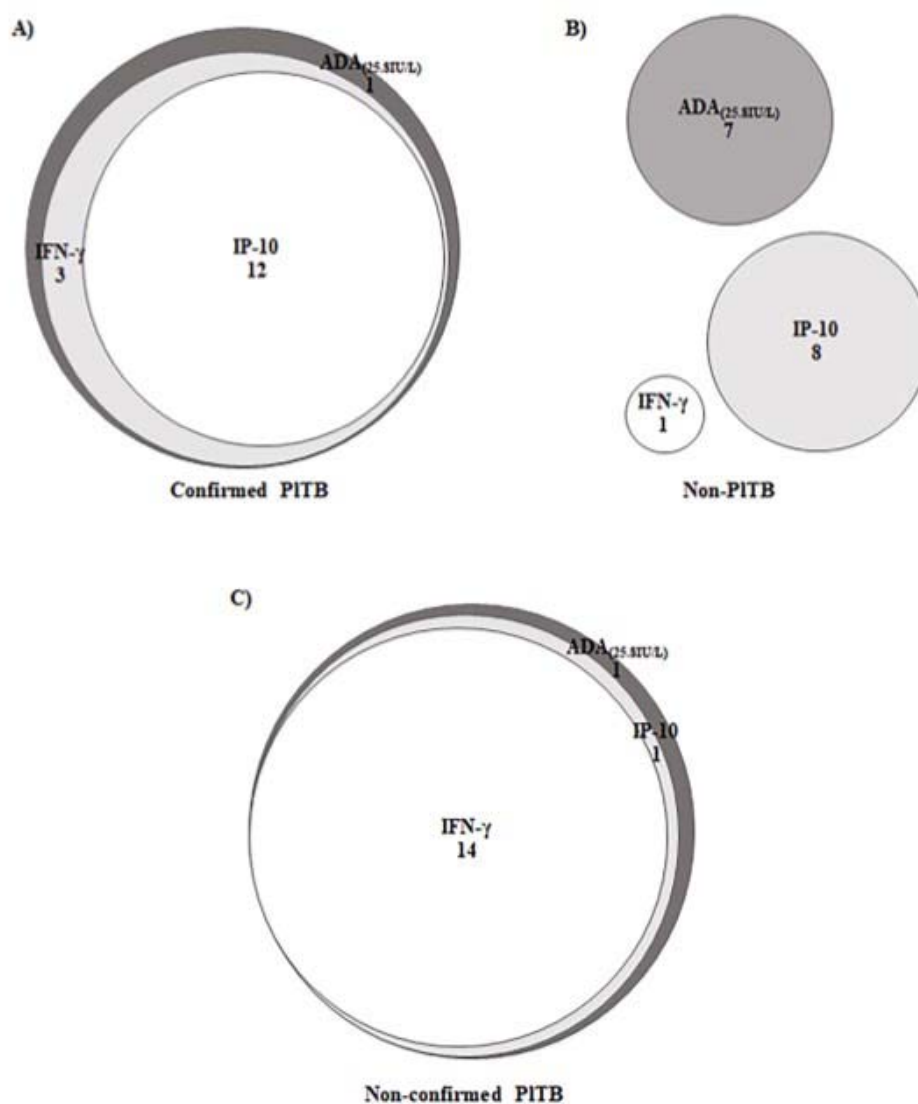


Fig 4. Venn's diagrams application on PITB diagnosis using ADA_(25 IU/L), IFN- γ and IP-10 positivity. A, B and C Venn's diagrams show the performance of the biomarkers positivity in three different groups of the study: confirmed PITB (N = 16), non-PITB (N = 46) and non-confirmed PITB (N = 17), respectively. IFN- γ : interferon-gamma; IP-10: interferon-gamma inducible protein of 10-kD; ADA: adenosine deaminase; PITB: Pleural tuberculosis. Numbers indicate the intersection positivity of the biomarkers.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202481.g004>

compared to non-PITB. ADA activity, the only biomarker already available in the routine clinical practice for PITB diagnosis, provided good results when the standardized value of 40 IU/L was used, but the best cut-off value calculated in our sample was 1.6 times less than the one

already used. Based on these results, the combinations of positive results of these three biomarkers showed to be useful, especially when IFN- γ and ADA_(25.8 IU/L) were both positive, allowing rule-in of PITB diagnosis in 100% of the cases.

Several studies had already been published about the IGRAs performance on PB or adapted to PF in the PITB diagnosis [5, 14, 15, 17]. T-SPOT.TB[®] and QFT-GIT, two IGRAs approved by WHO for latent TB diagnosis [13], have been applied on PF for tuberculous pleurisy diagnosis based on the publication of Wilkinson *et al* [26], which showed that effective T-cells are 15 times higher on PF of PITB patients than on their PB. So, it was speculated that IGRAs could also be used on active sites of the disease in order to measure the Mtb-specific response according to the amount of cytokines and chemokines produced after the stimulation by the antigens. In our sample, TB group presented a higher percentage of QFT-GIT positivity on PB when compared to non-PITB (54.5% vs 23.5%, $p = 0.01$). However, the failure of IGRAs on PB in differentiating active from latent TB have shown to be associated with low specificity in regions with high TB burden, as in Brazil. We agree with other previous results that do not suggest the use of IGRAs on PB to differentiate active and latent TB. Our results are in accordance with others which did not find benefits in the use of QFT-GIT on PF, with results of IFN- γ Mtb-specific antigens minus Nil/negative control showing the same behavior in TB and non-PITB groups. Neither the application of the same method for IP-10 showed significance. These results are possibly explained by the high basal levels of IFN- γ and IP-10 on tuberculous PF, leading to an increase lower than expected after *in vitro* antigen stimulation as they were already and naturally stimulated. Consequently, levels of Mtb-specific antigens minus Nil/negative control biomarkers on PF of TB patients did not show a substantial increase. Moreover, both IFN- γ and IP-10 basal levels proved to be good biomarkers to differentiate TB and non-TB pleural effusions and the use of QFT-GIT kit would only make the diagnosis of PITB unnecessarily more expensive.

In the last years, PF IFN- γ levels have been reported as a valuable diagnostic tool for PITB [7, 5, 27–30]. Our results are in accordance with previous reports, including two meta-analysis studies published in 2003 and 2007, which showed a wide range of values for IFN- γ (0.3 to 13 IU/mL) [28, 29]. Other investigations on PITB diagnosis evaluated the performance IFN- γ levels measured in pg/mL. Ambade *et al* [25] calculated a cut-off of 1,090 pg/mL to differentiate TB pleural effusions from non-PITB, with a Se = 88%, Sp = 85%. The levels generated by Liu *et al* [30] showed a best performance of this biological marker when compared to ADA to differentiate TB from malignant pleural effusions (IFN- γ : Cut-off = 70 pg/mL, AUC = 0.960, Se = 91.7%, Sp = 97.6%, PPV = 95.7%, NPV = 95.3%; ADA: Cut-off = 30 IU/L, AUC = 0.760, Se = 70.8%, Sp = 95.2%, PPV = 89.5%, NPV = 85.1%). IFN- γ levels applied in a high burden setting for TB [7], presented a better performance than ADA and Xpert MTB/RIF[®], and based on a cut-off point of 107.7 pg/mL provided a Se of 92.5% and a Sp of 95.9% versus a 79% sensitive and 92.7% specific ADA (clinical cut point of 30 IU/L) and a 22.5% sensitive and 98% specific Xpert MTB/RIF[®], which, in our sample, showed a positivity of 14.3% (S1 Table). Thus, the comparison between different studies is impaired due to differences in the methods of estimations, units and cut-off values applied. Besides that, the results found in the present study are in agreement with previous reports which show IFN- γ as a better marker than ADA for the diagnosis of tuberculous pleurisy, and bringing IP-10 as an alternative method, although its poor performance.

IP-10, a relatively recent studied biomarker is a chemokine involved in trafficking monocytes and activated T-helper type 1 lymphocytes to the TB inflammation site [19, 31]. Previous studies summed 629 patients (304 with pleural TB) in whom IP-10 concentrations measured by ELISA, showed a mean sensitivity and specificity of 84% and 90%, respectively, to discriminate TB and non-PITB [32]. At a cut-off of 4,361.90 pg/mL, IP-10 was 75% sensitive and 82.6%

specific in our sample. Dheda *et al* [33] calculated a ROC-derived cut-point of 28,170 pg/mL for IP-10, which missed approximately 20% of their TB cases and misdiagnosed another 20% of non-PITB cases. But when a lower cut-point (4,035 pg/mL) was used the NPV achieved 100%, which means that a negative test could exclude TB. Even though the average performance of IP-10, in accordance with Dheda's results, we presented a considerable number of false positives (5 malignancies, 1 endometriosis, 1 cardiac failure and 1 hepatic failure). In a study published in 2016, TB and malignant pleural effusions were compared using several biomarkers, including IFN- γ and IP-10 [34]. In their sample of 27 patients (5 pleural TB and 22 malignant pleural effusion), IP-10 presented the best AUC when compared to IFN- γ (AUC 0.950 and cut-off 4,005 pg/mL vs AUC 0.830 and 100.5 pg/mL), with both presenting the same sensitivity and specificity.

Tuberculous pleurisy is one of the most important differential diagnosis in cases with pleural effusion under investigation with high ADA levels [28]. Our results showed that tuberculous PF presented ADA levels 5 times higher than non-PITB effusions. A lower ADA cut-off point leads to a sensitivity of 100%, although a fall in specificity to 84.8%. The literature usually reports ADA levels between 30–60 IU/L for PITB diagnosis [25, 32]. Our value was slightly smaller than this range of values, even though other groups had reported values as low as 10 IU/L, 15 IU/L, 26 IU/L, 30 IU/L and 35 IU/L [2, 28, 35, 36]. There are also other reports suggesting that ADA values can vary according to age, protein, DHL and absolute lymphocyte count on PF, CD4 lymphocyte counts and geographic area [37–41] but these were not our scope. The use of a smaller ADA cut-point lead to seven false positive TB cases (2 systemic erythematous lupus, 2 lymphomas, 1 poorly differentiated cancer, 1 empyema, 1 undefined diagnosis) that could have been diagnosed with PITB if it was considered alone. These specific conditions are already known as possible false positive when it comes to PITB diagnosis using ADA and even the use of the standard cut-point of 40 IU/L generated 2 false positives PITB (1 systemic erythematous lupus and 1 empyema).

The combinatorial analysis of the biomarkers positivity showed an impressive good performance, in particular when IFN- γ plus ADA ($_{25.8 \text{ IU/L}}$) was analyzed. In the clinical practice, few studies used two or three assays in combination to improve their isolated diagnostic power for PITB: QFT-GIT plus polymerase chain reaction [42]; ADA plus lymphocyte percentage on PF [43]; QFT-GIT on PB, ADA and carcinoembryonic antigen (CEA) on PF [2]; T-SPOT.TB on PB and PF combined with ADA on PF [44]. In all cases, the diagnostic yield enhanced when at least two assays were combined. But, despite their performance, our results presented a better behavior, with cut-off point calculated based on a sample with very rigid criteria for PITB. To the best of our knowledge, we only found one study who tested the combination of IFN- γ plus ADA on PF. Keng *et al* [45], studied 88 patients only with lymphocytic pleural effusions and although they found a specificity of 100% when ADA ≥ 40 IU/L and IFN- $\gamma \geq 75$ pg/mL were combined, their combination was poor accurate and sensitive (41.9% and 79.5%). In the same study, the authors also tested a new cut-off of 15.5 IU/L for ADA, which improved its performance. Maybe, if this lower cut-off was used, like we did in the present study, the combinatorial analysis with IFN- γ could approximate their results with ours. Moreover, we also used neutrophilic pleural effusions, which can be encountered in tuberculous pleurisy, and even so our results were better than theirs.

Finally, the performance of an internal validation of the positive combinations in the non-confirmed PITB cases showed a sensitivity of 88.2% (15/17), when at least two biomarkers were used. The two exceptions were: i) an empiric case, woman, 22 years old, HIV negative, with an exudative and lymphocytic pleural effusion who had complete clinical and radiological improvement after TB treatment and who presented IFN- γ , IP-10, and ADA($_{25.8 \text{ IU/L}}$) negative results. She also presented 36,000 red blood cells count in PF, which could have influenced the

production and consequently, the measurement of these biomarkers; ii) a possible TB, woman, 19 years old, unknown HIV status, with an exudative and lymphocytic pleural effusion, with the highest ADA levels registered in the study (259 IU/L) and false negative results for IFN- γ and IP-10.

Some limitations should be considered in our study. Pleural biopsies were not performed in all patients due to various reasons (old age, coagulopathy, a small amount of PF and refusal of consent the procedure). In two non-PITB cases (small cell lung cancer and renal failure) AFB smear and culture were lost, both showed all three biomarkers negative. Also, Xpert MTB/RIF[®] was performed only in 14 cases (seven each group, with only one case of positivity in the TB group), but as already reported, the sensitivity of molecular tests on pleural specimens is low [46–48]. Besides being offered, HIV status was only known in 59 subjects, with only 3 cases of positivity (one undefined pleural effusion with positive ADA and negative IFN- γ and IP-10, one renal failure with all three biomarkers negative, 1 probable TB with all the biomarkers positive). Between the 21 cases of unknown HIV status only one presented an indeterminate QFT-GIT on PB, which means that in 20 cases, besides the unknown immunological condition, they presented a positive response on mitogen tube which represents the positive response of lymphocytes of each patient. Finally, all measurements of IFN- γ and IP-10 were performed using the supernatant from QFT-GIT tubes, and not directly on PF without any processing.

In our study, as in previous data, PITB patients were more likely to be younger than non-TB ones (Table 1) [7, 15, 30]. Besides the clinical similarities between tuberculous and nontuberculous patients that were possibly related to the magnitude of effusion and to constitutional symptoms [15], time until diagnosis was higher in non-TB patients (Table 1). Tuberculous PF presented higher levels of total cell count, lymphocytic percentage, protein, albumin and DHL levels in the present study (Table 1) and also in previous data [15, 27, 49]. Moreover, we observed that unilateral pleural effusion was the most frequent radiological presentation among cases with TB (Table 1) in accordance to the previous publications [32, 50].

Of the three biomarkers analyzed in this study, IFN- γ showed the best performance. In addition, a lower cut-off point of ADA was identified as a perfect rule-in parameter to PITB, although showing lower specificity, when combined with IFN- γ it ensured the correct diagnosis in almost 99% of cases. The results should be extrapolated to countries with a similar prevalence of Brazil and be validated in different populations. Although measurements of IFN- γ are relatively expensive and not easily affordable, its use should be considered in future cost-effective studies which could balance the cost of a minimally invasive exam *versus* invasive pleural biopsy procedures, time demanding culture results and the possible adverse effects due to empirical TB treatment.

In conclusion, IFN- γ , IP-10 and ADA levels were significantly higher in the PF from PITB than in non-PITB patients. IFN- γ is an excellent rule-in and rule-out test compared to IP-10 and ADA, whether used at its routine value of 40 IU/L or at a lower cut-off point calculated for the purposes of this study. The combination of IFN- γ and ADA ($_{25.8}$ IU/L) showed to be particularly useful to clinicians as it prompts immediately treatment for TB when both biomarkers are positive or further investigation in cases of both negatives.

Supporting information

S1 Table. Results with classical methods for pleural tuberculosis diagnosis in the study population.
(DOCX)

S1 Fig. Concentration of IFN- γ and IP-10 in peripheral blood. Both biomarkers were measured on peripheral blood in the supernatants of QFT-GIT. Obtained levels from each biomarker were analyzed in a logarithmic scale and illustrated using boxplots to compare the groups: Non-PITB (N = 47) and PITB (n = 33). Small gray dots represent individual cases and box plots represent the interquartile range and sample median (central solid gray line). Bigger black dots and vertical bars represent linear model estimated adjusted means and 95% confidence intervals (CI 95%). PITB: Pleural tuberculosis; Non-PITB: Non-pleural tuberculosis; Nil: Negative control tube; Ag: *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen tube; Mit: Mitogen tube; * p = 0.001; ** p < 0.0001. (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Domenico Capone, Dr. Walter Costa, and Dr. Hélio Siqueira, physicians of Tuberculosis Outpatient Clinics of HUPE/UERJ, which contributed in the medical care of the patients included in the study.

Author Contributions

Conceptualization: Geraldo Moura Batista Pereira, Luciana Silva Rodrigues.

Data curation: Ana Paula Santos.

Formal analysis: Ana Paula Santos, Marcelo Ribeiro-Alves.

Investigation: Ana Paula Santos, Thiago Thomaz Mafort, Janaina Leung.

Methodology: Ana Paula Santos, Raquel da Silva Corrêa, Ana Carolina Oliveira Soares da Silva.

Resources: Rogério Rufino.

Supervision: Luciana Silva Rodrigues, Rogério Rufino.

Validation: Ana Paula Santos.

Writing – original draft: Ana Paula Santos.

Writing – review & editing: Ana Paula Santos, Luciana Silva Rodrigues, Rogério Rufino.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Available in: <http://www.who.int/tb>. Accessed on June 15, 2017
2. Liu Y, Ou Q, Zheng J, Shen L, Zhang B, Weng X et al. A combination of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay and the detection of adenosine deaminase improves the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Emerg Microb & Infect* 2016; 5: e83
3. Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, Johnson JL, Riley LW and Maciel EL. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infectious Diseases* 2014; 14: 9 <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-9> PMID: 24400848
4. Trajman A, Pai M, Dheda K. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what Works and what does not? *Eur Respir J* 2008; 31: 1098–106 <https://doi.org/10.1183/09031936.00147507> PMID: 18448504
5. Lee LN, Chou CH, Wang JY, Hsu HL, Tsai TH, Jan IS, et al. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 173–9
6. Liu F, Gao M, Zhang X, Du F, Jia H, Yang X, et al. Interferon-Gamma Release Assay Performance of Pleural Fluid and Peripheral Blood in Pleural Tuberculosis. *PlosOne* 2013; 8 (12): 83857

7. Meldau R, Peter J, Theron G, Calligaro G, Allwood B, Symons G, et al. Comparison of same day diagnostic tools including Gene Xpert and unstimulated IFN- γ for the evaluation of pleural tuberculosis: a prospective cohort study. *BMC Pulm Med* 2014; 14: 58 <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-58> PMID: 24708530
8. Shimokata K, Saka H, Murate T, Hasegawa Y, Hasegawa T. Cytokine content in pleural effusion. *Chest* 1991; 99: 1103–7 PMID: 1902158
9. Nemeth J, Winkler HM, Zwick RH, Rumetshofer R, Schenk P, Burghuber OC, et al. Recruitment of Mycobacterium tuberculosis specific CD4⁺ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *J Int Med* 2009; 265: 163–8
10. Sutherland JS, Garba D, Fombah AE, Mendy-Gomez A, Mendy FS, Antonio M, et al. Highly Accurate Diagnosis of Pleural Tuberculosis by Immunological Analysis of the Pleural Effusion. *PLoS ONE* 2012; 7(1): e30324 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030324> PMID: 22295081
11. Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, Sahn SA. Diagnosis and treatment of tuberculosis pleural effusion in 2006. *Chest* 2007; 131: 880–9 <https://doi.org/10.1378/chest.06-2063> PMID: 17356108
12. Light RW. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2010; 15(3):451 <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01723.x> PMID: 20345583
13. World Health Organization. Implementing tuberculosis diagnosis. Policy framework 2015. Available in: <http://www.who.int/tb>. Accessed on January 18, 2018
14. Losi M, Bossink A, Codecasa L, Jafari C, Ernst M, Thijsen S, et al. Use of a T-cell interferon- γ release assay for the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Eur Respir J* 2007; 30: 1173–9 <https://doi.org/10.1183/09031936.00067307> PMID: 17715165
15. Dheda K, Zyl-Smit RN, Seche LA, Badri M, Meldau R, Meldau S, et al. Utility of quantitative T-cell responses versus unstimulated interferon- γ for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Eur Respir J* 2009; 34: 1118–26 <https://doi.org/10.1183/09031936.00005309> PMID: 19386693
16. Aggarwal AN, Agarwal R, Gupta D, Dhooria S and Behera D. Interferon Gamma Release Assays for Diagnosis of Pleural Tuberculosis: a Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2451–9 <https://doi.org/10.1128/JCM.00823-15> PMID: 25994163
17. Li ZZ, Qin WZ, Li L, Wu Q, Wang YJ. Accuracy of enzyme-linked immunospot assay for diagnosis of pleural tuberculosis: a meta-analysis. *Gen and Mol Res* 2015; 14 (3): 11672–80
18. Pang CS, Shen YC, Tian PW, Zhu J, Feng M, Wan C, et al. Accuracy of the interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy: an updated meta-analysis. *Peer J* 2015; 3: e951 <https://doi.org/10.7717/peerj.951> PMID: 26038718
19. Okamoto M, Kawabe T, Iwasaki Y, Hara T, Hashimoto N, Imaizumi K, et al. Evaluation of interferon- γ , interferon- γ -inducing cytokines, and interferon- γ -inducible chemokines in tuberculous pleural effusions. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 88–93 <https://doi.org/10.1016/j.lab.2004.11.013> PMID: 15746651
20. El Fenniri L, Toossi Z, Aung H, El Iraki G, Bourkkadi J, Benamor J, et al. Polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific effector memory CD4⁺ T cells at sites of pleural TB. *Tuberculosis* 2011; 91: 224–30 <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.12.005> PMID: 21459675
21. Kabeer BSA, Paramasivam P, Raja A. Interferon gamma and interferon gamma inducible protein-10 in detecting tuberculosis infection. *J Infect* 2012; 64 (6): 573–9
22. Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd edition. New York: Academic Press; 1974. p. 1092–99
23. Hiraki A, Aoe K, Matsuo K, Murakami K, Murakami T, Onoda T, et al. Simultaneous measurement of T-helper 1 cytokines in tuberculous pleural effusion. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 1172–7 PMID: 14677892
24. Tiwari RP; Hattikudur NS, Bharmal RN, Kartikekeyan S, Deshmukh NM, and Bisen PS. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. *Tuberculosis* 2007; 87: 193–201 <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.07.005> PMID: 17029964
25. Ambade V, Arora B, Rai C, Nikumb SK, Basannar DR. Markers for differentiation of tubercular pleural effusion from non-tubercular effusion. *MJAFI* 2011; 67: 338–42
26. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, Ewer K, Prakash M, Klenerman P, et al. Ex vivo Characterization of Early Secretory Antigenic Target 6 –Specific T Cells at Sites of Active Disease in Pleural Tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 184–7
27. Aoe K, Hiraki A, Murakami T, Eda R, Maeda T, Sugi K, et al. Diagnostic significance of interferon- γ in tuberculous pleural effusions. *Chest* 2003; 123: 740–4 PMID: 12628872
28. Greco S, Girardi E, Masciangelo R, Capocotta GB, Saltini C. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7 (8): 777–86 PMID: 12921155

29. Jiang J, Shi HZ, Liang QL, Qin SM, Qin XJ. Diagnostic value of interferon- γ in tuberculous pleurisy. *Chest* 2007; 131: 1133–41 <https://doi.org/10.1378/chest.06-2273> PMID: 17426220
30. Liu YC, Lee SS, Chen YS, Tu HZ, Chen BC, and Huang TS. Differential diagnosis of tuberculous and malignant pleurisy using pleural fluid adenosine deaminase and interferon gamma in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44: 88–94 <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2010.04.001> PMID: 21439509
31. Pokkali S, Das SD. Expression of CXC and CC type of chemokines and its receptors in tuberculous and non-tuberculous effusions. *Cytokine* 2008; 41: 307–14 <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.12.009> PMID: 18226915
32. Porcel JM. Advances in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Ann Transl Med* 2016; 4 (15): 282 <https://doi.org/10.21037/atm.2016.07.23> PMID: 27570776
33. Dheda K, Smit RN, Sechi L, Badri M, Meldau R, Symons G, et al. Clinical diagnostic utility of IP-10 and LAM antigen levels for the diagnosis of tuberculous pleural effusions in a high burden setting. *PLoS ONE* 2009; 4 (3): e4689 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004689> PMID: 19277111
34. Chen KY, Feng PH, Chang CC, Chen TT, Chuang HC, Lee CN, et al. Novel biomarker analysis of pleural effusion enhances differentiation of tuberculous from malignant pleural effusion. *Int J Gen Med* 2016; 9: 183–9 <https://doi.org/10.2147/IJGM.S100237> PMID: 27354819
35. Helmy NA, Eissa SA, Masoud HH, Elessawy AF, Ahmed RI. Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous and malignant pleural effusion. *Egypt J Chest Dis Tuberc* 2012; 61 (4):413–7
36. Arnold DT, Bhatnagar R, Fairbanks LD, Zahan-Evans N, Clive AO, Morley AJ, et al. Pleural Fluid Adenosine Deaminase (PFADA) in the Diagnosis of Tuberculous Effusions in a Low Incidence Population. *PLoS One* 2015; 10 (2): e0113047 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113047> PMID: 25647479
37. Niwa Y, Kishimoto H, Shimotaka K. Carcinomatous and tuberculous pleural effusions. *Chest* 1985; 87: 351–5 PMID: 3971760
38. Baganha MF, Pêgo A, Lima MA, Gaspar EV, Cordeiro AR. Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic population. *Chest* 1990; 97: 605–10 PMID: 1689629
39. Tay TR, Tee A. Factors affecting pleural fluid adenosine deaminase level and the implication on the diagnosis of tuberculous pleural effusion: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13: 546 <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-546> PMID: 24238276
40. Abrao FC, Abreu IR, Miyaki DH, Busico MA, Younes RN. Role of adenosine deaminase and the influence of age on the diagnosis of pleural tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18: 1363–9 <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0257> PMID: 25299872
41. Lee SJ, Kim HS, Lee SH, Lee TW, Lee HR, Cho YJ, et al. Factors influencing pleural adenosine deaminase level in patients with tuberculous pleurisy. *Am J Med Sci* 2014; 348: 362–5 <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000260> PMID: 24762755
42. Gao Y, Ou Q, Huang F, Wang S, Shen L, Shen Y, et al. Improved diagnostic power by combined interferon-gamma release assay and nested-PCR in tuberculous pleurisy in high tuberculosis prevalence area. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 66: 393–8 <https://doi.org/10.1111/1574-695X.12006> PMID: 23163870
43. Garcia-Zamalloa A, Taboada-Gomez J. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase and lymphocyte proportion in pleural fluid for tuberculous pleurisy in different prevalence scenarios. *PLoS ONE* 2012; 7: e38729 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038729> PMID: 22723878
44. Xu HY, Li CY, Su SS, Yang L, Ye M, Ye JR, et al. Diagnosis of tuberculous pleurisy with combination of adenosine deaminase and interferon- γ immunospot assay in a tuberculosis-endemic population. *Medicine* 2017; 96: 47
45. Keng LT, Shu CC, Chen JY, Liang SK, Lin CK, Chan gLY, et al. Evaluating pleural ADA, ADA2, IFN- γ and IGRA for diagnosing tuberculous pleurisy. *J Infect* 2013; 67: 294–302 <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.05.009> PMID: 23796864
46. Lusiba JK, Nakiyingi L, Kirenga BJ, Kiragga A, Lukande R, Nsereko M, et al. Evaluation of Cepheid's Xpert MTB/RIF test on pleural fluid in the diagnosis of pleural tuberculosis in a high prevalence HIV/TB setting. *PLoS ONE* 2014; 9: e102702 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102702> PMID: 25051491
47. Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, Lawn SD. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 709
48. Sehgal IS, Dhooria S, Aggarwal NA, Behera D, Agarwal R. Diagnostic performance of Xpert MTB/RIF in tuberculous pleural effusion: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 1133–6 <https://doi.org/10.1128/JCM.03205-15> PMID: 26818675
49. Choi H, Chon HR, Kim K, Kim S, Oh KJ, Jeong SH, et al. Clinical and laboratory differences between lymphocyte and neutrophil-predominant pleural tuberculosis. *PLoS ONE* 2016; 11 (10): e0165428 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165428> PMID: 27788218

50. Bielsa S, Palma R, Pardiña M, Esquerda A, Light RW, Porcel JM. Comparison of polymorphonuclear and lymphocyte rich tuberculous pleural effusions. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17: 85–9 <https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0236> PMID: 23164256

APÊNDICE B – Instrumento de coleta de dados do 1º artigo científico (Artigo publicado)

Diagnóstico de Tuberculose Pleural utilizando a dosagem de interferon gama (IGRA) e IP-10

Dados Sócio Demográficos	
Nome:	
Prontuário:	
Endereço – Rua:	
Endereço – Nº:	
Endereço – Complemento:	
Endereço – Bairro:	
Endereço – Cidade/UF:	
Endereço – CEP:	
Telefone – Residencial:	
Telefone – Celular:	
Telefone – Comercial:	
Data Nascimento:	
Idade:	
Naturalidade:	
Etnia:	1. Branco 2. Negro 3. Pardo 9. Sem dado
Estado Civil:	1. Não casado 2. Casado 9. Sem dado
Escolaridade:	1. Analfabeto 2. Ensino Fundamental 3. Ensino Médio 4. Ensino Superior 9. Sem dado
Profissão:	
Critérios de Elegibilidade	
Derrame pleural com indicação de toracocentese	1. Sim 2. Não
Idade > 18 anos	1. Sim 2. Não
Assinatura TCLE	1. Sim 2. Não
Colaboração durante o exame	1. Sim 2. Não
Anamnese	
Tempo de evolução da doença (em semanas)	_____
Principal hipótese diagnóstica:	1. Tuberculose 2. Neoplasia 3. Insuficiência cardíaca 4. Derrame parapneumônico 5. Empiema 6. Hipoalbuminemia

	7. Outros (_____)
Tuberculose prévia	1. Sim 2. Não 9. Sem dado
AIDS	1. Sim 2. Não 9. Sem dado
Comorbidades 1. Diabetes 2. Colagenose 3. Insuficiência cardíaca 4. Neoplasia 5. Cirrose hepática 6. Hipotireoidismo 7. Outras (_____)	1. Sim 2. Não 9. Sem dado
Uso de medicamentos 1. Esquema anti tuberculose 2. Diurético 3. Imunossuppressores 4. Corticóide 5. Quimioterápico 6. Antiretrovirais	1. Sim 2. Não 9. Sem dado

Exames complementares	
Ht	_____
Hb	_____
Leuco	_____
Plaquetas	_____
INR	_____
Relação PTT	_____
Glicose	_____
Proteínas totais	_____
Albumina	_____
LDH	_____
Colesterol	_____
Triglicérides	_____
Amilase	_____
Bilirrubinas totais	_____

Bilirrubina direta	_____
Bilirrubina indireta	_____
Data (dd/mm/aaaa):	
IGRA sérico	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 9. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa):	
Resultado IGRA sérico (unidade)	
Radiografia de tórax	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 9. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa):	
Resultado da radiografia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 9. Sem dado
<ol style="list-style-type: none"> 1. Derrame pleural unilateral 2. Derrame pleural bilateral 3. Infiltrado pulmonar 4. Cavitação 5. Alargamento do mediastino 6. Massa pulmonar 7. Outros (_____) 	
Tomografia de tórax	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 9. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa):	
Resultado da tomografia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 9. Sem dado
<ol style="list-style-type: none"> 1. Derrame pleural unilateral 2. Derrame pleural bilateral 3. Infiltrado pulmonar 4. Cavitação 5. Linfodomegalia mediastinal 6. Massa pulmonar 7. Outros (_____) 	

Procedimento	
Data (dd/mm/aaaa):	
Intercorrências	<ol style="list-style-type: none"> 1. Não 2. Sangramento 3. Pneumotórax 9. Outro (_____)
Toracocentese	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 9. Sem dado

Volume de líquido pleural retirado (ml)	
Biópsia pleural	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 9. Sem dado
Número de fragmentos	

Resultados do líquido pleural	
Citometria global	
Polimorfonucleares	
Mononucleares	
Hemáceas	
LDH	
Proteínas totais	
Albumina	
Glicose	
pH	
Adenosina D Aminase (ADA)	
Colesterol total	
Triglicérides	
Bilirrubina total	
Bilirrubina direta	
Bilirrubina indireta	
Amilase	
Baciloscopia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negativa 2. 1+ 3. 2+ 4. 3+ 9. Sem dado
Cultura micobactérias	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negativa 2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 3. MNTB 4. Contaminada 9. Sem dado
Bacterioscopia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negativa 2. Coco Gram positivo 3. Coco Gram negativo 4. Bacilo Gram positivo 5. Bacilo Gram negativo 9. Sem dado
Cultura germes comuns	
Pesquisa direta fungos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negativa 2. Hifa 3. Levedura 9. Sem dado
Cultura para fungos	
Citopatologia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negativo para malignidade 2. Positivo para malignidade 9. Sem dado
IGRA pleural	

Resultados do fragmento pleural	
Baciloscopia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negativa 2. 1+ 3. 2+ 4. 3+

	9. Sem dado
Cultura micobactérias	1. Negativa 2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 3. MNTB 4. Contaminada 9. Sem dado
Bacterioscopia	1. Negativa 2. Coco Gram positivo 3. Coco Gram negativo 4. Bacilo Gram positivo 5. Bacilo Gram negativo 9. Sem dado
Cultura germes comuns	
Pesquisa direta fungos	1. Negativa 2. Hifa 3. Levedura 9. Sem dado
Cultura para fungos	
Histopatologia	1. Granuloma sem necrose caseosa 2. Granuloma com necrose caseosa 3. Positivo para malignidade 9. Sem dado

Conclusão diagnóstica

Tuberculose confirmada (Caso)	1. Não 2. Microbiologia 3. Histopatologia 4. Bioquímica (exsudato linfocítico com ADA > 40 UI)
Outro diagnóstico (Controle)	1. Não 2. Insuficiência cardíaca 3. Neoplasia 4. Derrame parapneumônico 5. Outro
IGRA pleural	
IGRA sérico	
Relação IGRA pleural/IGRA sérico	

Evolução dos casos de Tuberculose

Tempo de tratamento (em meses)	
Esquema anti Tuberculose	1. Esquema básico 2. Outros
Desfecho de tratamento	1. Completou tratamento 2. Abandono 3. Óbito 4. Falência 5. Transferência 6. Mudança do diagnóstico 9. Sem dado

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do 1º artigo científico (Artigo publicado)

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UERJ
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - FCM
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA - LIP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento

Título do projeto: ESTUDO DE BIOMARCADORES PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES MICOBACTERIANAS

Nome dos pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. GERALDO MOURA BATISTA PEREIRA
Nome dos médicos responsáveis: Prof. Dr. ROGÉRIO LOPES RUFINO ALVES, Prof.^ª Dr.^a. LUCIANA SILVA RODRIGUES, Dr. THIAGO MAFORT (PhD) e Dr.^a. ANA PAULA SANTOS (MSc)

Nomes e telefones de contato para questões e problemas: Dra. Luciana Silva Rodrigues, Telefone: (21) 2868-8690 e Dr. Thiago Mafort ou Dra. Ana Paula Santos, Telefone: (21) 3176-6872

Justificativa do projeto:

A tuberculose é uma doença séria e somente a pesquisa tem trazido progressos no conhecimento e tratamento desta enfermidade. Estamos iniciando uma nova pesquisa que tem por finalidade identificar novas formas de diagnóstico de uma das apresentações mais comuns de tuberculose, a pleural.

A pleura é uma pele fina que envolve o pulmão e o agente causador da tuberculose pode gerar uma inflamação na pleura que como consequência produz uma quantidade aumentada de líquido, chamado de “água na pleura” ou derrame pleural. Para saber se esse líquido é causado pela tuberculose é necessário coletar um pouco desse material para fazer uma pesquisa das células e do agente causador da tuberculose. No entanto, nem sempre a bactéria pode ser identificada. Além disso, existem outras doenças, como o câncer de pulmão, que podem apresentar características semelhantes à tuberculose pleural e assim confundir o diagnóstico, o que pode gerar um atraso no início do tratamento correto e a progressão da doença.

Esta pesquisa consiste em usar um pouco do líquido pleural que será coletado para tentar identificar novas células e marcadores inflamatórios que são específicos para o diagnóstico de tuberculose pleural. Você já irá fazer o procedimento que se chama punção torácica ou toracocentese e biópsia pleural conforme solicitado por um médico que está investigando a causa da “água na pleura”. Nós iremos usar um pouco desse líquido e um pouco de sangue para análise em nossa pesquisa. Além disso, se você for diagnosticado com tuberculose, necessitaremos de uma nova coleta de sangue ao final do seu tratamento.

Você, então, está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa e é importante que leia esse documento com atenção para decidir se você aceita ou não ser incluído no grupo que vai participar desse estudo. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será respeitada e o seu tratamento médico acontecerá normalmente como o de todos os pacientes que frequentam esse serviço clínico, não havendo nenhum prejuízo para a sua assistência médica enquanto durar o seu tratamento. Da mesma forma, se você aceitar participar da pesquisa e a qualquer momento quiser desistir dessa participação, a sua

assistência médica continuará acontecendo normalmente. Para o seu tratamento e para a pesquisa serão necessárias a punção torácica, a biópsia da pleura, a coleta de sangue e a realização de uma radiografia do tórax após o procedimento. Esses materiais serão utilizados para a realização dos exames já comumente usados para o diagnóstico da tuberculose. Um pouco do seu sangue será utilizado para realização do exame que pesquisa a infecção pelo HIV (vírus causador da AIDS) uma vez que esta infecção é um fator de risco para a tuberculose. Um pouco do líquido pleural será armazenado no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Caso o voluntário participante do projeto desejar, ele poderá entrar em contato com o pesquisador responsável para saber detalhes sobre os resultados.

Para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto, vejam a seção seguinte.

Procedimentos e riscos:

Punção torácica e biópsia da pleura: Um médico bem treinado neste procedimento identificará o líquido na pleura através da radiografia de tórax, do exame clínico e por vezes utilizando um aparelho de ultrassonografia do tórax. Este exame radiológico não emite radiação e não gera qualquer risco ou desconforto. Após identificar o líquido, será feita uma anestesia no local para que você não sinta dor, usando um medicamento anestésico chamado lidocaína, semelhante ao usado pelos dentistas, e que não costuma gerar nenhum efeito colateral quando aplicado. Após a anestesia, será feita uma punção usando uma agulha para coletar o líquido da pleural. Serão retirados cerca de 60 ml deste material para análise. Caso o médico que está fazendo o exame julgue necessário tirar um pouco mais de líquido para aliviar os seus sintomas de cansaço, ele assim fará. Também será realizada a biópsia da pleura neste momento, ainda sob o efeito da anestesia local, usando uma agulha específica para este procedimento. Serão coletados de 5-10 pedacinhos pequenos da sua pleura que também serão enviados para análise. O exame deve durar cerca de 30 a 45 minutos e durante todo o tempo você ficará acordado (a). Normalmente, a realização destes procedimentos é bem tolerada. Algumas complicações relacionadas ao procedimento podem acontecer, mas é muito raro. Essas complicações são: entrada de ar na pleura (pneumotórax) ou entrada de sangue na pleura (hemotórax). Caso isso ocorra você receberá todo o tratamento necessário no Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Coleta de sangue: Um profissional bem treinado neste procedimento fará a punção da veia do seu braço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico aquele usado quando se tira sangue para exame. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (mancha roxa) no local, e infecção (muito raramente). A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e não causará nenhuma complicação.

Radiografia de tórax: Apesar de ser um exame comum, expõe você à radiação, mas o exame é necessário para o diagnóstico e acompanhamento.

Benefícios:

Os exames realizados neste estudo poderão contribuir para o diagnóstico da tuberculose pleural. Os voluntários do estudo já tem uma doença na pleura e necessitarão realizar estes procedimentos. Esse estudo beneficiará futuramente toda a população, pois a identificação células e marcadores inflamatórios específicos permitirão o diagnóstico correto e precoce da tuberculose pleural.

Ressarcimento de Despesas:

Não haverá nenhum tipo de compensação financeira para os participantes da pesquisa. Por outro lado todos os exames serão feitos no Hospital Universitário Pedro Ernesto e não serão cobrados.

Confiabilidade:

As pessoas que vão puncionar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constará o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra.

Responsabilidade:

A Comissão de Ética em Pesquisa responsabilizará o coordenador do estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o mesmo.

Declaração:

O médico da equipe de pesquisa colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contatar o pesquisador responsável: Dr. Thiago Mafort.

Participação Voluntária/Retirada:

Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não. Mesmo se decidir participar, você é livre para desistir do estudo a qualquer momento sem dar um motivo ou explicação. Isto não afetará seu cuidado médico futuro de qualquer forma.

Anuência para fazer parte do Estudo

Assinando este documento você concorda que: 1- Você teve uma chance para fazer perguntas. 2- Você é voluntário (a) para participar deste estudo.

Nome: _____ Data: ____/____/____

Assinatura _____

Pesquisador supervisor da assinatura do termo de consentimento:

Nome: _____ Data: ____/____/____

Assinatura _____

APÊNDICE D – Instrumento de coleta de dados do 2º artigo científico (Artigo submetido)

Número: ____ / ____

Sexo: ____ 0. Masculino 1. Feminino 9. SD

Idade: _____

Raça: ____ 0. Negra 1. Branca 2. Parda 3. Outra 9. SD

Comorbidades: 0. Não 1. Sim 9. SD

HAS:	Neoplasia:	CCD:
DMID:	Transplante:	Inibidor TNF:
DMNID:	DAI:	IS:
ICC:	IRC-HD:	QT:
DPOC/Asma:	Hepatite viral:	PPD: (mm)
PID:	TB prévia:	

História Social: 0. Não 1. Sim 9. SD

Tabagismo atual:	Alcoolismo:
Tabagismo prévio:	Droga ilícita:

HIV: _____ 0. Negativo 1. Positivo 3. Não realizado 9. SD

Clínica: 0. Não 1. Sim 9. SD Tempo máximo sintomas em dias: _____

Febre:	Tosse:	Anorexia:
Dispneia:	Perda ponderal:	
Dor torácica:	Sudorese:	

Radiologia tórax: ____ 0. Não 1. DP unilateral 2. DP bilateral 3. DP unilateral+ infiltrado pulmonar 4. DP bilateral + infiltrado pulmonar 5. Unilateral cavitária 6. Unilateral não cavitária 7. Bilateral cavitária 8. Bilateral não cavitária 9. SD

Sangue: _____ 0. Não 1. Sim 9. SD Data: _____

Ht: _____ Leuco: _____ Linfócitos: _____

LDH: _____ Proteínas: _____ Albumina: _____

Material respiratório: _____ 0. Não 1. Sim 9. SD Data: _____

Qual? _____ 0. EE 1. EI 2. LBA 9. SD

BAAR: _____ 0. Negativo 1. 1+ 2. 2+ 3. 3+ 4. Positiva (sem +) 9. SD

Cultura: _____ 0. Negativo 1. 1+ 2. 2+ 3. 3+ 4. Positiva (sem +) 9. SD

Toracocentese: _____ 0. Não 1. Sim 9. SD Data: _____

Citometria total: _____ PMN: _____ MN: _____

Hemáceas: _____ LDH: _____ Proteínas: _____

Albumina: _____ Glicose: _____ ADA: _____

BAAR: _____ Cultura: _____

Biópsia pleural: _____ 0. Não 1. Sim 9. SD Data: _____

BAAR: _____ Cultura: _____

Histopatologia: _____ 0. Não realizada 1. Granuloma com necrose 2. Granuloma sem necrose

3. Outro dado inflamatório: _____

Critério diagnóstico: _____ 1. Microbiológico 2. Histopatológico 3. ADA

4. Empírico 9. SD

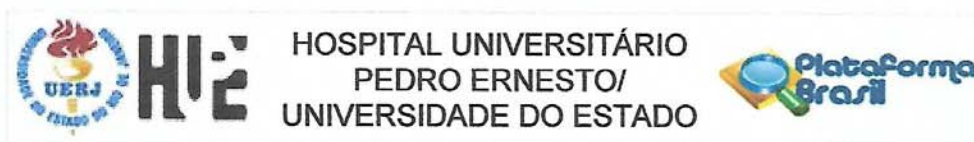
Tratamento: _____ 1. Esquema básico 2. Outro Data: _____

Tempo de tratamento em meses: _____

Desfecho: _____ 1. CT 2. Abandono 3. Falência 4. Óbito 5. Tx 6. MD

9. SD

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética para o 1º artigo científico (Artigo publicado)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Busca de novos marcadores para o diagnóstico da Tuberculose Pleural

Pesquisador: Luciana Silva Rodrigues

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45780115.6.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.100.772

Data da Relatoria: 10/06/2015

Apresentação do Projeto:

A tuberculose (TB) é a principal causa de morte em adultos, por doença infecciosa única, nos países em desenvolvimento. Seu agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) infecta um terço da humanidade e são diagnosticados anualmente cerca de 9 milhões de novos casos de TB, com um milhão e meio de mortes em todo o mundo (Organização Mundial da Saúde, 2014). A TB Pleural é a manifestação extrapulmonar mais frequente da TB no adulto. Atualmente, há uma grande dificuldade no diagnóstico da doença devido à confirmação bacteriológica estar somente presente em apenas um quarto dos casos. Esta dificuldade é caracterizada pela maioria dos casos serem paucibacilares, sendo a positividade da baciloscopia em líquido pleural variando de 0 a 5% e a positividade cultura do tecido em torno de 40% (Gopi et al., 2006). Além das análises microbiológicas e histológicas, níveis superiores a 40UI/L de adenosina deaminase (ADA) no líquido pleural são fortemente sugestivos de TB Pleural (Sharma et al., 2005). No entanto, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos constitui uma necessidade premente, uma vez que

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.100.772

os resultados da análise do líquido pleural, atualmente empregadas, raramente confirmam o diagnóstico de TB Pleural – visto que uma neoplasia, por exemplo, também pode causar um derrame pleural exsudativo com predominância de linfócitos e atividade aumentada de ADA. Além disso, cabe salientar que atrasos no diagnóstico e, por conseguinte, no início da terapia estão associados à mortalidade elevada. O presente estudo se propõe a utilizar uma série de estratégias altamente inovadoras, como a transcriptômica, metabolômica, proteômica quantitativa e citometria de fluxo multiparamétrica na busca de novos biomarcadores que auxiliem não apenas para o diagnóstico da TB Pleural, como também no controle da doença em nosso país.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar biomarcadores circulantes e no líquido pleural capazes de auxiliar no diagnóstico diferencial da TB Pleural, bem como buscar indicadores pró-fibróticos e do grau de severidade da doença.

Objetivo Secundário:

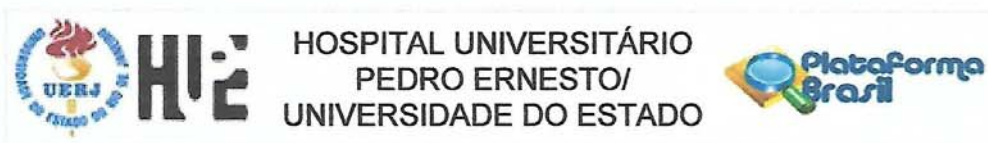
Traçar a composição metabólica, assim como o perfil proteômico do líquido pleural de pacientes com TB Pleural e com outros diagnósticos exsudativos. Correlacionar estes dados aos achados clínicos, radiológicos e laboratoriais de forma a definir biomarcadores que possibilitem o diagnóstico diferencial de TB Pleural. Pretendemos, ainda, identificar e caracterizar funcionalmente subpopulações leucocitárias M. tuberculosis específica no líquido pleural. E, finalmente, comparar os níveis de marcadores pró-fibróticos em sangue periférico e líquido pleural com dados radiológicos, clínicos e histopatológicos no diagnóstico da TB pleural.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos potenciais conhecidos são aqueles pertinentes ao procedimento de punção torácica e biópsia pleural realizados como ferramenta diagnóstica, descritos no termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), bem como no termo de responsabilidade apresentado aos pacientes.

Estes procedimentos são realizados como rotina no ambulatório para o diagnóstico das doenças com derrame pleural e conta com uma equipe de médicos e enfermeiros capacitados e bem treinados. As amostras coletadas serão manipuladas em

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.100.772

cabine de segurança biológica classe II B2 e a equipe utilizará equipamentos de proteção individual adequados, não oferecendo riscos aos profissionais. Benefícios: A identificação de novos alvos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de métodos diagnósticos que diferenciem a TB Pleural de outras patologias com derrame pleural exsudativo, podem impactar de maneira significativa a assistência primária aos pacientes com TB, permitindo acesso rápido à terapia vigente, diminuição do número de óbitos e contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos os dados necessários para apreciação ética. Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos eminentes ao participante de pesquisa envolvido.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.100.772

a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais e anuais referentes ao andamento da pesquisa ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 10 de Junho de 2015

Assinado por:
MICHELLE QUARTI MACHADO DA ROSA
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética para o 2º artigo científico (Artigo submetido)



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 15 de setembro de 2010

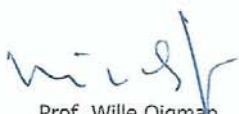
Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Coord. Prof. Geraldo Moura Batista Pereira

Registro CEP/HUPE: 2612/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0064.0.228.000-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "ESTUDO DE BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES MICOBACTERIANAS" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

ANEXO C – Comprovação de submissão do 2^o artigo científico (Artigo submetido)

Hindawi

6316081.v1 (Research Article)

Title	Hyporexia and cellular/biochemical characteristics of pleural fluid as predictive variables on a model for pleural tuberculosis diagnosis
Journal	Pulmonary Medicine
Issue	Regular
Additional Files	Cover Letter
Manuscript Number	6316081 (Research Article)
Submitted On	2019-01-06
Author(s)	Ana Paula Santos , Marcelo Ribeiro-Alves, Raquel Corrêa, Isabelle Ramos Lopes, Mariana Almeida, Janaína Leung, Luciana Rodrigues, Rogério Rufino
Editor	
Status	Under Review
Supplementary Materials	View Supplementary Materials