Marcelo Genofre Vallada

Determinação da sensibilidade e especificidade de teste de liberação de interferon-gama por linfócitos ativos estimulados por antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* em crianças

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientadora: Prof. Dra. Sonia Regina Testa
Silva Ramos

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vallada, Marcelo Genofre

Determinação da sensibilidade e especificidade de teste de liberação de interferon-gama por linfócitos ativos estimulados por antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* em crianças / Marcelo Genofre Vallada. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Sonia Regina Testa Silva Ramos.

Descritores: 1.Tuberculose/diagnóstico 2.*Mycobacterium tuberculosis* 3.Interferon tipo II/uso diagnóstico 4.Criança

USP/FM/SBD-211/09

Aos meus pais, Kardec e Wilma

Para Guilherme, Lucas e Victor, que têm a
responsabilidade de amanhã nos superar.

Uma tese nunca é o trabalho de uma só pessoa, mas o resultados da ação de muitos, quer ajudando diretamente na realização da mesma, quer criando condições para que ela pudesse ser realizada. Muitas pessoas colaboraram na elaboração deste trabalho, e a todos o meu agradecimento:

- À Profa. Dra. Sonia Regina Testa Ramos, minha orientadora, pelo constante incentivo e infinita paciência.

- À Profa. Dra. Thelma S. Okay, Gilda Maria Bárbaro Del Negro e Lídia Yamamoto, do Laboratório de Investigação Médica do Departamento de Pediatria – LIM/36 – por todo o apoio técnico e científico para a realização desta tese, sem o qual ela não teria sido possível.

- Ao Dr. Cláudio do Amaral Antonio, médico do Instituto Clemente Ferreira, pela seleção dos pacientes para o estudo. À Elizabete Aparecida de Almeida, chefe do laboratório do Instituto Clemente Ferreira, e Mirian Dias Santos, auxiliar de enfermagem, pelo auxílio na coleta e encaminhamento das amostras. Ao Dr. Fernando Fiuza de Melo, do Instituto Clemente Ferreira, pela colaboração no estudo.

- À Dra. Claudine Sarmento da Veiga, pneumologista pediátrica, pelo entusiasmo e colaboração na seleção de casos para este trabalho.

- Ao Dr. Edson Vanderlei Zombini, médico do Hospital Infantil Cândido Fontoura, pelo inestimável empenho na seleção de pacientes para esta tese.

- À Dra. Joselina Magalhães Andrade Cardieri e Dra. Marina Buarque de Almeida, médicas do grupo de pneumologia do Instituto da Criança, pela valiosa colaboração na seleção de casos para este trabalho.

- À equipe do Setor de Coletas do Laboratório Clínico do Instituto da Criança, pelo bom humor e dedicação para que este trabalho desse certo: enfermeiras Simone Pavani, Eunice Kiyomi Suguita dos Santos, Maria de Fátima Silva Oliveira; auxiliares de enfermagem Sonia Rocha Lima, Sonia Regina Caetano, Myrtes de Paula Santos Silva, Marisa Apda Alves de Oliveira, Mercedes Pereira dos Santos, Paula Cristiane Pereira Bezerra, Maria Cicera Acioli Alfredo, Sonia Aparecida Teixeira Thomaz, Marcia Cristina Severiano Viana, Jumara Dotti, Paula Melo Gonçalves.

- Ao Prof. Dr. Cláudio Leone, do Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Saúde Pública da USP, pelo auxílio inestimável na análise estatística.

- Ao Dr. Pedro Takanori Sakane, fonte de inspiração e exemplo para todos os pediatras do Instituto da Criança.

- À Profa. Dra. Maria Ignez Saito, do Grupo de Adolescentes do Instituto da Criança, que sempre me estimulou a produzir mais e melhor.

- À Profa. Dra. Eva Maria Augusta Boeckh Haebisch, que me mostrou o que é a verdadeira curiosidade científica.

- À Dra. Isabel de Camargo Costa e Dra. Adriana Melo de Faria, médicas do Serviço de Infectologia Pediátrica do Hospital Infantil Sabará, que me garantiram a tranquilidade para escrever este trabalho.

- À Profa. Dra. Cléa Rodrigues Leone, Dra. Marta Miranda Leal, Dra. Silvia Maria de Macedo Barbosa, pela amizade e incentivo.

- Ao Dr. Sérgio Antonio Malaman, pelo otimismo contagiante e incentivo.

- Ao Nivaldo e à Milene, pela competência e dedicação que sempre nos atendem no serviço de reprografia.

RESUMO

Vallada MG. Determinação da sensibilidade e especificidade de teste de liberação de interferon-gama por linfócitos ativos estimulados por antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* em crianças [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 79p.

INTRODUÇÃO: A tuberculose é um problema grave de saúde pública, acometendo indivíduos em todas as faixas etárias e em todos os estratos socioeconômicos. Apesar de estarem sob grande risco de adoecimento, as crianças carecem de meios diagnósticos sensíveis e específicos. Neste estudo avaliou-se em crianças a acurácia de um teste baseado na dosagem de interferon-gama liberado por linfócitos após estímulo com antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* (QuantiFERON-TB Gold In Tube® [Cellestis, Carnegie, Austrália]). **MÉTODO:** Foram incluídas no estudo 184 crianças não infectadas e 11 crianças com infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Todas as crianças receberam previamente o BCG. Foram excluídas crianças com comprometimento do sistema imunológico. Obteve-se amostra de sangue de cada criança, e o material foi processado conforme as instruções do laboratório fabricante. O desempenho do teste foi avaliado pela construção de uma curva de características operacionais (ROC). **RESULTADOS:** Do total de 184 crianças sem infecção pela micobactéria, 74 (40,2%) eram do sexo feminino, e 130 (70,6%) tinham menos de quatro anos de idade. A idade média neste grupo foi de 35 meses. Seis (3,2%) crianças apresentaram resultado indeterminado do teste, uma criança (0,5%) apresentou um resultado positivo e 177 (96,2%) apresentaram resultado negativo. No grupo de 11 crianças

infectadas, sete (63,0%) eram meninas, e a idade média era de 58,5 meses. Duas (18,0%) crianças neste grupo apresentaram resultado negativo do teste. A curva ROC obtida evidenciou uma área sob a curva de 0,876 (I. C 95% - 0,82 a 0,92; $p < 0,001$), refletindo o desempenho preditivo elevado do teste. A sensibilidade do teste foi de 81,8% (IC 95% - 48,2% a 97,2%) e a especificidade de 98,8% (IC 95% - 96,0 a 99,8%), o valor preditivo positivo foi de 81,8% (IC 95%: 46,3% a 97,4%) e o valor preditivo negativo foi de 98,9% (IC 95%: 96,0% a 99,8%). CONCLUSÕES: Neste estudo o teste mostrou ter uma boa acurácia no diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* em crianças previamente vacinadas com o BCG, e sua utilização rotineira pode contribuir para a melhor avaliação de crianças expostas a um doente bacilífero e na tomada de decisões sobre a introdução de quimioprofilaxia ou tratamento.

Descritores: 1.Tuberculose/diagnóstico 2. *Mycobacterium tuberculosis*
3.Interferon tipo II/uso diagnóstico 4. Criança

SUMMARY

Vallada MG. Evaluation of the sensibility and the specificity of an interferon-gamma release assay after lymphocyte stimulation by specific *Mycobacterium tuberculosis* antigens in children [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 79p

BACKGROUND: Tuberculosis is a major public health problem, affecting people from all ages and diverse socioeconomic incomes. Despite the high risk that children have to develop the disease, accurate methods for diagnosis are not yet available. In this study the accuracy of an interferon-gamma release assay (QuantiFERON-TB Gold In Tube® [Cellestis, Carnegie, Australia]) was evaluated for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children.

METHODS: 195 children were evaluated, 184 children without mycobacterial infection, and 11 children infected by the *Mycobacterium tuberculosis*. All the children had been previously vaccinated with BCG. Immunocompromised children were excluded from the study. A blood sample was obtained from each child, and it was processed according the manufacturer's instructions. The performance of the assay was evaluated by a receiver operating characteristic (**ROC**) curve. **RESULTS:** In the group of 184 noninfected children, 74 (40.2%) were female and 130 (70.6%) were younger than four years old. The mean age in this group was 35 months. Six children (3.2%) had indeterminate test result, one child (0.5%) had a positive test result, and 177 (96.2%) children had negative test results. In the group of 11 infected children, seven (63.0%) were female, and the mean age in this group was 58.5 months. Two children (18.0%) in this group had a negative test result. The ROC curve determined an area under the curve of 0.876 (95% CI 0.82 to 0.92; $p < 0.001$), disclosing a high

positive predictive value for the test. The assay sensibility was 81.8% (95% CI, 48.2% to 97.2%) and the assay specificity was 98.8% (95% CI, 96.0% to 99.8%), the positive predictive value was 81.8% (95% CI: 46.3% to 97.4%) and the negative predictive value was 98.9% (95% CI: 96.0% to 99.8%).

CONCLUSIONS: In this study, the accuracy of the assay was high for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children previously vaccinated with BCG. The use of this assay for the routine evaluation of children exposed to the disease may help physicians to decide on whether to start chemoprophylaxis or tuberculosis treatment.

Descriptors: 1. Tuberculosis/diagnosis 2. *Mycobacterium tuberculosis*
3. Interferon type II/diagnostic use 4. Child

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1 –INTRODUÇÃO	1
1.1 – Tuberculose em crianças e dificuldades diagnósticas	1
1.1.1 – Microbiologia	1
1.1.2 – Prova tuberculínica	4
1.1.3 – Sistema de pontuação	6
1.1.4 – Dosagem de interferon-gama	7
1.2 – Justificativa	10
1.3 – Hipótese	11
2 – OBJETIVOS	13
2.1 – Objetivo geral	14
2.2 – Objetivos específicos	14
3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
3.1 – População	15
3.1.1 – Estudo da especificidade	15
3.1.2 – Estudo da sensibilidade	19
3.2 – Avaliação laboratorial	22
3.2.1 – Processamento do sangue.....	22
3.2.2 – Realização do teste imunoenzimático (ELISA)	23
3.3.3 – Interpretação dos resultados	25
3.3 – Análise estatística	26

4 – RESULTADOS	28
4.1 – Análise estatística	32
5 – DISCUSSÃO	38
6 – CONCLUSÕES	59
7 – ANEXOS	62
8 – REFERÊNCIAS	69

Apêndice

1 - INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

A tuberculose é um problema grave de saúde pública no Brasil, acometendo indivíduos em todas as faixas etárias e em todos os estratos socioeconômicos.

O Brasil, segundo a Organização Mundial da Saúde, ocupa o 15º lugar entre os 23 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo, com uma incidência de 48 casos por 100.000 habitantes em 2007, e um coeficiente de mortalidade de 4,4 óbitos para 100.000 habitantes ⁵². Deste modo, no ano de 2007 foram notificados 92.000 casos novos da doença, responsáveis por 8.400 mortes ⁵².

A incidência da doença é diferente nas várias regiões do país. Dados consolidados de 2006 pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN/MS), mostravam uma variação da incidência desde 27,9/100.000 na região Centro-Oeste até 52,6/100.000 na região Norte.

1.1 - Tuberculose em crianças e dificuldades diagnósticas

1.1.1 – Microbiologia

As crianças têm um grande risco de adoecimento após a infecção, especialmente aquelas com idade inferior a dois anos e, à semelhança dos adultos, há um nítido predomínio da tuberculose pulmonar ¹⁰. No Estado de São Paulo, dentre os 14.695 casos de doença pulmonar notificados em 2007, 458 (3,1%) ocorreram em indivíduos com menos de 15 anos, dos quais apenas 160 (34,9%) tiveram a confirmação microbiológica da micobactéria, pela

baciloscopia ou cultura positiva ¹¹. Estes dados vêm reforçar o fato de que, apesar do vasto conhecimento sobre a doença, seu agente etiológico e mecanismo de infecção, persistem as dificuldades para se identificar o microorganismo responsável e se estabelecer o diagnóstico na infância. Esta dificuldade é em grande parte decorrente do fato da doença cursar com número muito reduzido de bacilos, sendo trabalhosa a comprovação bacteriológica da infecção. Além disto, na criança pequena não é fácil se obter espécimes adequados para a pesquisa da bactéria.

Apesar das dificuldades, a pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* continua muito importante no atendimento ao doente, sendo prioritária tanto para o diagnóstico como para o controle do tratamento da tuberculose, além de permitir a identificação dos pacientes bacilíferos, que representam a principal fonte de transmissão da infecção ²⁴. Em crianças maiores, capazes de expectorar, o exame do escarro é mandatório, e pode ser realizado ambulatorialmente ^{4, 35}. Em crianças pequenas, há a necessidade de internação para a obtenção de material por meio do lavado gástrico. A positividade da cultura para a micobactéria pelo Método de Loewstein Jensen a partir de material obtido de lavado gástrico varia bastante nos diferentes estudos, raramente sendo superior a 50% ^{4, 16, 35}. Como alternativa pode-se realizar a cultura de material de lavado broncoalveolar, mas a maioria dos trabalhos concorda que a positividade é menor quando comparada ao lavado gástrico ^{1, 44, 54}. Há também o relato de bons resultados no isolamento do *Mycobacterium tuberculosis* com a indução do escarro após a inalação de solução salina hipertônica ^{54, 55}, com positividade de até 87% das amostras.

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada para a identificação do agente da tuberculose em diferentes materiais, mas os resultados em crianças são muito variáveis, devido aos segmentos diferentes utilizados como marcadores, o número de ciclos, a utilização ou não de reamplificação, e aos métodos de detecção. Na maioria dos estudos, a especificidade do método foi considerada boa, entre 80 a 100%, porém a sensibilidade variou muito, de 25% a 83%^{17, 22, 46}.

Até o presente momento, os testes sorológicos não apresentam sensibilidade e especificidade que justifiquem seu uso rotineiro na investigação clínica da tuberculose^{13, 47}. Os testes bioquímicos, como dosagem de adenosina deaminase (ADA), têm a sua utilização restrita basicamente na investigação de neurotuberculose e da tuberculose pleuropulmonar^{24, 49}.

1.1.2 - Prova tuberculínica

A prova cutânea da tuberculina é um método auxiliar para o diagnóstico da tuberculose e baseia-se na reação celular de hipersensibilidade do tipo tardia desenvolvida após a inoculação intradérmica do *Purified Protein Derivative* (PPD), um derivado protéico do *Mycobacterium tuberculosis*^{23, 29}. No Brasil, o antígeno padronizado e distribuído pelo Ministério da Saúde é o PPD RT 23, do qual são aplicadas duas unidades tuberculínicas (UT)^{7, 10}.

O resultado positivo evidencia apenas a infecção por micobactérias, não caracterizando a presença de doença. A prova tuberculínica é, atualmente, o instrumento padrão utilizado no diagnóstico da tuberculose latente. A

graduação da reação cutânea é utilizada para aumentar a especificidade do resultado, sendo avaliada após 72 a 96 horas da aplicação ^{7, 9, 10}.

A prova tuberculínica deve ser interpretada de forma especial nas pessoas vacinadas com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) há menos de dois ou de três anos ^{7, 10}. Uma vez que os antígenos utilizados no teste também estão presentes em outras micobactérias, o resultado positivo de uma prova tuberculínica pode não ser devido a uma infecção com o *Mycobacterium tuberculosis*, mas devido à vacinação com o BCG, o qual é derivado do *Mycobacterium bovis*, ou à exposição a outras micobactérias que não o *Mycobacterium tuberculosis*. Outras situações que podem interferir no resultado do exame, com uma prova cutânea negativa, são as doenças que comprometem o sistema imunológico, tanto as congênitas quanto as adquiridas, como a sarcoidose, as neoplasias malignas e doenças linfoproliferativas, a utilização de corticóides e outros fármacos com atividade imunossupressora. A vacinação com vírus vivo, particularmente o vírus do sarampo, também pode interferir com o resultado da prova tuberculínica. Indivíduos nos extremos de idade, como crianças com menos de dois meses e adultos com mais de 65 anos, e gestantes, freqüentemente apresentam resultados falso-negativos ^{7, 10}.

Uma vez que a vacinação com o BCG faz parte do programa básico de imunização no Brasil, a utilização do PPD possui limitações importantes para o seu uso na decisão diagnóstica, em particular nas crianças de baixa idade ^{7, 40}. No Brasil, alguns estudos indicam que a frequência de positividade da prova tuberculínica oscila entre 25% e 55% na população geral ¹⁰.

A prova tuberculínica pode ser interpretada como sugestiva de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* quando superior a 10mm em crianças não vacinadas com BCG ou vacinadas há mais de dois anos; ou superior a 15mm em crianças vacinadas com BCG há menos de dois anos. Há uma tendência atual em se considerar que a prova tuberculínica com o PPD com a presença de enduração maior que 10mm sugira infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nas crianças com história de contato íntimo com adulto com doença pulmonar e bacilífero, mesmo naquelas vacinadas com BCG em qualquer época^{9, 10}.

1.1.3- Sistema de pontuação

Frente a esta imensa dificuldade no diagnóstico da tuberculose em crianças, foi elaborado um sistema de pontuação para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, adotado pelo Ministério da Saúde^{10, 40, 41, 42}. Este sistema destina-se ao diagnóstico da tuberculose pulmonar na infância, e é fundamentado basicamente no quadro clínico-radiológico, na história epidemiológica de contato com adultos com tuberculose, geralmente bacilíferos, na interpretação particular da prova tuberculínica e, em pequeno número de casos, no exame bacteriológico, pois na maioria das vezes trata-se de doença não bacilífera. Em casos selecionados outros elementos podem contribuir, como biópsias, exames sorológicos e bioquímicos, principalmente nas localizações extrapulmonares da doença. Sant'Anna et al.^{41, 42} avaliaram o sistema preconizado pelo Ministério da Saúde e encontraram valores de sensibilidade e de especificidade que variaram, respectivamente, de 58,0% a

88,9% e 86,5% a 98% para diagnóstico de tuberculose pulmonar, conforme o número de pontos adotado.

1.1.4 - Dosagem de interferon-gama

Os testes laboratoriais que utilizam a dosagem de interferon-gama foram desenvolvidos com a intenção de substituir a prova tuberculínica no diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* ^{27, 29, 37}. Estes testes são baseados na observação de que a infecção pela micobactéria induz a uma forte resposta imune celular tipo T-helper 1.

O *Mycobacterium tuberculosis* é um patógeno intracelular, freqüentemente encontrado nos fagossomas dos macrófagos. Deste modo, enquanto a bactéria está latente no organismo, há pouca exposição dos antígenos bacterianos, diminuindo a probabilidade de serem reconhecidos por linfócitos B e estimularem uma resposta humoral com produção de anticorpos. Porém os antígenos bacterianos são processados pelos macrófagos infectados e apresentados a linfócitos T antígeno-específicos, os quais desencadeiam uma série de respostas imunes, levando ao aparecimento de linfócitos T sensibilizados e com capacidade de responder ao antígeno da micobactéria com a liberação de interferon-gama ^{4, 26, 27, 29}.

Assim, a liberação de interferon-gama por linfócitos T específicos para o *Mycobacterium tuberculosis* é utilizada como marcador de infecção. Testes *in vitro* utilizam diferentes antígenos micobacterianos para induzir a liberação de interferon-gama pelos linfócitos sensibilizados, visando com isto evidenciar a existência de infecção ^{8, 29, 36, 37, 53}. Os testes disponíveis comercialmente

utilizam os antígenos da região diferencial 1 (RD1) do *Mycobacterium tuberculosis* como estímulo para a produção do interferon-gama.

O primeiro teste disponível comercialmente e também o primeiro a receber a aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado no diagnóstico da tuberculose era baseado no próprio PPD ³⁷ (QuantiFERON-TB test®). A mensuração dos níveis de interferon-gama era realizada após a estimulação *in vitro* de uma amostra de sangue total com o PPD e antígenos de controle, e utilizava a técnica de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Este teste sofria interferência da vacinação com o BCG, levando a resultados falso-positivos, além de não discriminar a infecção tuberculosa da maioria das micobactérias não-tuberculosas, sendo logo abandonado ³⁷.

Uma segunda geração de testes passou a utilizar antígenos mais específicos para tentar melhorar a sensibilidade e a especificidade do exame ³⁷. A comparação do genoma de diferentes micobactérias levou à identificação da chamada região diferencial 1 (RD1), a qual está presente no *Mycobacterium tuberculosis* e no *Mycobacterium bovis*, mas que está ausente no BCG, devido às múltiplas passagens que a cepa utilizada para a vacina sofreu. As proteínas codificadas por esta região formaram a base dos testes baseados na secreção de interferon-gama pelos linfócitos T e que não apresentam reação cruzada com o BCG ^{12, 13, 19, 29, 36}. Dois antígenos foram estudados mais detalhadamente nos seres humanos, *Early Secretory Antigen Target 6* (ESAT-6) e *Culture Filtrate Protein 10* (CFP-10). O ESAT-6 é um antígeno codificado e expresso pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mas que está ausente no BCG e na maioria das micobactérias não tuberculosas, exceto no *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai* e *Mycobacterium marinum*. A CFP-10 é uma

proteína específica do *Mycobacterium tuberculosis*. Ensaio que utilizam estas proteínas como antígenos estimulam apenas linfócitos T previamente sensibilizados a elas a produzirem interferon-gama. A combinação das duas proteínas no mesmo ensaio aumenta a sensibilidade e a especificidade do teste no diagnóstico da infecção tuberculosa ^{12, 13, 19, 29, 36}.

Existem disponíveis comercialmente dois testes que utilizam a combinação de ESAT-6 e CFP 10, um baseado na técnica de *enzyme-linked immunosorbent spot* (ELISpot) (T--SPOT-TB®, Oxford Immunotec, Abingdon, UK) e o outro na de ELISA (QuantiFERON-TB Gold In-Tube®, Cellestis, Carnegie, Austrália). O primeiro está liberado na Europa para a utilização no diagnóstico *in vitro* da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, e o segundo está aprovado pelo FDA para a utilização nos Estados Unidos ^{19, 33}.

Os antígenos utilizados no teste QuantiFERON-TB Gold In Tube® compreendem uma combinação de peptídeos que simulam as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7,7(p4). Estes peptídeos agindo como antígenos estimulam a liberação de interferon-gama por linfócitos T de indivíduos infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*, mas não pelos linfócitos daqueles não infectados, mesmo que anteriormente vacinados com o BCG ^{19, 33, 36, 37}. O exame pode também resultar na liberação de interferon-gama pelos linfócitos de indivíduos infectados pelos *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai* e *Mycobacterium marinum*.

Desde o seu lançamento, vem aumentando consistentemente o número de estudos publicados que avaliam a utilização deste teste no diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Em 2008, Pai et al. ³⁸ publicaram uma revisão sistemática sobre os novos testes diagnósticos que

utilizam a estimulação de linfócitos T e quantificam a produção de interferon-gama. Neste artigo eles atualizaram uma revisão de 2007 ³⁴, feita pelo mesmo grupo, incorporando 20 novos estudos. Foram selecionados 22 artigos que utilizaram o QuantiFERON-TB Gold para o cálculo da sensibilidade do método, determinada como sendo 76%(IC 95%, 72% a 80%). Dos 16 estudos selecionados para a determinação da especificidade do método, 8 incluíam indivíduos previamente vacinados com BCG. Praticamente todos os estudos incluíam apenas adultos. A especificidade do teste para indivíduos vacinados com BCG foi de 96% (CI,94% a 98%). Apesar dos resultados promissores, os autores afirmam que os dados em crianças ainda são muito limitados, e novos estudos continuam necessários.

Os estudos iniciais que avaliaram a eficácia do novo teste quando utilizado para o diagnóstico de tuberculose em crianças utilizaram populações diferentes e apresentaram resultados conflitantes ^{20, 21, 50}. Além disto, as características epidemiológicas da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e dos critérios utilizados para o seu diagnóstico em criança são particulares no Brasil, principalmente pela alta cobertura vacinal com o BCG, acima de 95% da população ⁹. A disponibilidade de um teste sensível e específico quando utilizado em crianças, que diferencie a infecção pela micobactéria da resposta à vacinação pelo BCG, que seja de fácil e rápida realização e que permita a identificação das crianças com infecção latente, para realização de profilaxia ou seguimento clínico, permitiria um avanço significativo do controle da doença nesta faixa etária.

1.2 – Justificativa

A tuberculose ainda é um problema grave de saúde pública no Brasil, sendo que o país apresenta uma das incidências mundiais mais altas da doença. O diagnóstico precoce é importante para o início da terapia antes do aparecimento das complicações, porém deve ser o mais acurado possível, a fim de se evitar tratamentos desnecessários, com os riscos potenciais de efeitos adversos. Apesar de estar sob grande risco de adoecimento, a população pediátrica carece de meios diagnósticos sensíveis e específicos, sendo que o diagnóstico é, na maioria das vezes, presuntivo, sem o isolamento do agente infeccioso. Isto é especialmente preocupante quando se fala em diagnóstico de infecção latente, uma vez que a intervenção nestas crianças diminui substancialmente o risco do adoecimento futuro, marcadamente nos dois primeiros anos após a infecção. Em nossa população de crianças, a prova tuberculínica é pouco específica para o diagnóstico da infecção, pois sofre interferência da vacinação com o BCG.

A dosagem de interferon-gama produzido por linfócitos ativados, após o estímulo com antígenos específicos, mostrou ser bastante sensível e específica em adultos, podendo substituir com vantagens a prova tuberculínica. Estes testes *in vitro* ainda não foram devidamente avaliados na população pediátrica, especialmente nos menores de sete anos de idade, o que limita a sua utilização rotineira neste grupo. E dentre as linhas prioritárias de pesquisa recomendadas pelas diretrizes nacionais para tuberculose, está o desenvolvimento, validação e análise de acurácia de novos testes laboratoriais.

1.3 – Hipótese

O teste diagnóstico pelo método de ELISA para a detecção *in vitro* da produção de interferon-gama por linfócitos ativados, após a estimulação por antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* (QuantiFERON-TB Gold In Tub®, Cellestis, Carnegie, Austrália), é sensível e específico quando utilizado para a determinação de infecção pela micobactéria em crianças previamente imunizadas pelo BCG, à semelhança do que acontece com os indivíduos adultos.

2 - OBJETIVOS

2 - Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Determinar a acurácia de um teste diagnóstico para a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, baseado na detecção *in vitro* pela técnica de ELISA da produção de interferon-gama por linfócitos ativados após a estimulação por antígenos específicos (QuantiFERON-TB Gold In Tube®, Cellestis, Carnegie, Austrália), em crianças previamente imunizadas com a vacina de BCG.

2.2 – Objetivos específicos

Analisar a sensibilidade e a especificidade da utilização do QuantiFERON-TB Gold In Tube® (Cellestis, Carnegie, Austrália) em um grupo de crianças previamente imunizadas com o BCG.

Analisar a frequência de resultados indeterminados para o QuantiFERON-TB Gold In Tube® (Cellestis, Carnegie, Austrália) quando utilizado em crianças, verificando se estes resultados podem determinar alguma restrição na sua utilização neste grupo.

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 - Casuística e métodos

3.1 – População

As crianças incluídas neste estudo foram divididas em dois grupos:

- I. Crianças previamente imunizadas com o BCG, sem evidências de doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* nem contato com pessoa doente, para a avaliação da especificidade do teste diagnóstico.
- II. Crianças com sinais clínicos, laboratoriais e evidências epidemiológicas que indiquem doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* ou forte evidência de infecção, mesmo que ainda sem alterações clínicas presentes, para a avaliação da sensibilidade do teste diagnóstico.

3.1.1 – Estudo da especificidade

Para o estudo da especificidade do método foram recrutadas crianças que compareceram ao serviço de coleta da seção de laboratório do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de abril a julho de 2008. Foram critérios de inclusão:

- idade entre 3 meses e 6 anos e 11 meses;
- ter recebido a vacina de BCG, verificado por registro em carteira de vacina e pela presença de cicatriz;
- estarem no laboratório para a coleta de exame em avaliação de rotina (por exemplo, exames pré-operatórios) ou encaminhadas pelo Serviço de

Consulta de Urgência e Triagem para a coleta de exames para a avaliação complementar laboratorial de condição aguda de agravo da saúde (por exemplo, coleta de hemocultura para suspeita de infecção aguda, coleta de sangue para avaliação de distúrbios eletrolíticos ou metabólicos, realização de exames de coagulação, sorologia, entre outros);

-ter o consentimento informado dos pais ou representantes legais para a coleta de uma alíquota extra de sangue;

Foram considerados critérios de exclusão:

- a impossibilidade da comprovação da aplicação do BCG, pela falta de cicatriz e registro da aplicação da vacina em carteira própria;

- a presença de doenças crônica que impliquem em comprometimento do sistema imunológico (artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico e outras doenças reumáticas, tumores sólidos e doenças linfoproliferativas, transplante de órgão sólido ou transplante de medula óssea, infecção pelo HIV, imunodeficiências congênitas, insuficiência renal em diálise, e outras condições similares), bem como o uso de fármacos imunossupressores (uso prolongado de corticóides, uso recente de gamaglobulina endovenosa, transfusão recente de hemoderivados);

- paciente em investigação por suspeita clínica de tuberculose;

- presença no domicílio ou contato próximo com adulto com o diagnóstico de tuberculose nos últimos dois anos, tratado ou não;

- pacientes com dificuldade de acesso venoso para a coleta da amostra de sangue, ou aqueles cujo volume de sangue obtido na punção não tenha sido suficiente para completar o volume total de 3 mL necessários para a

realização dos testes, evitando-se sempre uma punção com a finalidade exclusiva de colher material para o estudo;

- recusa dos pais ou responsáveis legais em participar do protocolo.

O objetivo do trabalho e a necessidade da coleta de sangue para a realização do mesmo foram explicados a todos os pais ou responsáveis legais pelas crianças e, após a concordância na inclusão do paciente no estudo, foram solicitadas a leitura e a assinatura do termo de consentimento informado.

Todos os pais ou responsáveis legais pelas crianças incluídas no estudo para a determinação da especificidade do teste, conforme os critérios estabelecidos acima, responderam a um questionário para a determinação de exposição recente a pessoas com tuberculose, ou presença de sinais e sintomas ou achados radiológicos que possam estar relacionados com o diagnóstico de tuberculose. Deste modo, todas as crianças foram avaliadas para se verificar a presença de:

- contato com adulto com tuberculose tratada, que tenha recebido alta médica, de diagnóstico nos últimos dois anos;
- contato com adulto com o diagnóstico de tuberculose, não tratado ou tratado irregularmente, em qualquer tempo;
- contato com adulto com tosse crônica ou perda de peso não intencional recente;
- febre moderada e persistente por mais de 15 dias, especialmente se vespertina;
- tosse, perda de peso e sudorese noturna profusa;
- hemoptise;

- imagem pulmonar persistente, de evolução lenta, a despeito de tratamento com antibióticos ou Infiltrado nodular difuso (padrão miliar);
- adenomegalias hilares e/ou paratraqueais.

3.1.2 - Estudo da sensibilidade

Foram incluídas crianças com idade superior a três meses, de ambos os sexos, com o diagnóstico de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, nas seguintes condições:

- diagnóstico de tuberculose pulmonar, comprovado pela pesquisa positiva do *Mycobacterium tuberculosis* em escarro ou lavado de secreção gástrica ou lavado broncoalveolar, ou crianças que, após a aplicação do critério de pontos para o diagnóstico da tuberculose, adotado pelo Ministério da Saúde (Quadro 1), tenham uma somatória maior que 40 pontos, portanto com diagnóstico de doença pulmonar muito provável;
- meningite tuberculosa com a identificação do bacilo em líquido;

Quadro 1: Sistema de pontuação para o diagnóstico de tuberculose pulmonar em crianças e adolescentes – Ministério da Saúde do Brasil

		Pontuação
Quadro Clínico	Febre ou sintomas como: tosse, adinamia, expectoração, emagrecimento, sudorese, por mais de 2 semanas.	+ 15
	Assintomático ou com sintomas por menos de 2 semanas.	0
	Infecção respiratória com melhora sem antibióticos ou após uso de antibióticos para agentes infecciosos comuns.	- 10
Quadro Radiológico	Adenomegalia hilar ou padrão miliar	+ 15
	Condensação ou infiltrado (com ou sem escavação) inalterado por mais de 2 semanas.	
	Condensação ou infiltrado (com ou sem escavação) por mais de 2 semanas, evoluindo com piora ou sem melhora com a utilização de antibióticos para agentes infecciosos comuns.	+ 5
	Condensação ou infiltrado de qualquer tipo por menos de 2 semanas	- 5
Contato com adulto tuberculoso	Radiografia de tórax normal	
	Próximo, nos últimos 2 anos.	+ 10
Teste tuberculínico e Vacinação BCG	Ocasional ou negativo	0
	Vacinado há mais de 2 anos	0 + 5 + 10 +15
	- Menor de 5mm	
	- 5mm a 9mm	
	- 10mm a 14 mm	
	15mm ou mais	0 + 5 + 15
	Vacinados há menos de 2 anos	
	- Menor de 10mm	
	- 10mm a 14mm	
	15mm ou mais	0 + 5 + 15
	Não vacinados	
	- Menor de 5mm	
	- 5mm a 9mm	
	10mm ou mais	
Estado Nutricional	Desnutrição grave ou peso abaixo do percentil 10.	+ 5
	Peso igual ou acima do percentil 10.	0

Interpretação: **até 25 pontos:** TB pouco provável; **30 a 35 pontos:** TB possível; **40 pontos ou mais:** TB muito provável.

Fonte: Ministério da Saúde – Guia de Vigilância Epidemiológica ⁹

- comunicantes domiciliares de adulto bacilífero, com alta probabilidade de estarem infectados após avaliação epidemiológica e do resultado da prova tuberculínica, e para as quais o médico assistente de serviço especializado indicou a profilaxia, de acordo com protocolos internos dos respectivos institutos e hospitais;

- ter o consentimento informado dos pais ou representantes legais para a coleta de uma alíquota de sangue para o estudo.

Foram excluídas do estudo todas as crianças que apresentaram alguma das condições abaixo:

- presença de doença crônica com comprometimento do sistema imunológico, bem como o uso de fármacos imunossupressoras, tais como artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico e outras doenças reumáticas, tumores sólidos e doenças linfoproliferativas, uso prolongado de corticóides, transplante de órgão sólido ou transplante de medula óssea, infecção pelo HIV, imunodeficiências congênitas, uso recente de gamaglobulina endovenosa, transfusão recente de hemoderivados, insuficiência renal em diálise, e outras condições similares;

- crianças em tratamento ou quimioprofilaxia para tuberculose há mais de dois meses;

- recusa dos pais ou responsáveis legais em participar do protocolo.

O objetivo do trabalho e a necessidade da coleta de sangue para a realização do mesmo foram explicados a todos os pais ou responsáveis legais pelas crianças, e, após a concordância na inclusão do paciente no estudo, foram solicitadas a leitura e a assinatura do termo de consentimento informado.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), disponível no Apêndice.

3.2 - Avaliação laboratorial

3.2.1 - Processamento do sangue

A realização do teste seguiu as recomendações do laboratório fabricante (QuantiFERON-TB Gold In Tube®, Cellestis, Carnegie, Austrália), as quais constam das orientações que acompanham o produto. O protocolo recomendado pelo fabricante para a realização e interpretação do teste está disponível no Apêndice.

O exame foi realizado com a utilização de três tubos: frasco controle negativo, frasco revestido com antígenos específicos da tuberculose (ESAT-6, CFP-10, TB7,7{p4}) e frasco controle positivo revestido com fitohemaglutinina como mitógeno.

Foram coletados 3 mL de sangue de cada criança, sendo 1 mL para cada um dos três tubos. Imediatamente após o preenchimento dos tubos, estes foram agitados por cinco a dez segundos, garantindo que toda a sua superfície fosse exposta ao sangue. Os tubos foram adequadamente identificados e nenhum deles permaneceu em temperatura ambiente por prazo superior a três horas após a coleta, antes de serem incubados a 37 °C.

O período de incubação a 37 °C em estufa foi de 16 a 20 horas. Os tubos foram mantidos em posição vertical dentro da estufa. Após este período,

o material foi centrifugado por 15 minutos em 2.000 a 3.000 rotações por minuto para a obtenção do plasma. Após a separação do plasma, o material foi acondicionado em microtubos de polipropileno do tipo Eppendorf com capacidade para 1,5 mL, e conservado em câmara fria em temperatura menor que -20°C até a realização do teste. O período de armazenamento não foi maior que quatro semanas.

3.2.2 – Realização do teste imunoenzimático (ELISA)

As amostras de plasma foram descongeladas e processadas em temperatura ambiente. Todos os reagentes utilizados também foram mantidos em temperatura ambiente durante todo o processo.

Reconstituiu-se a solução padrão adicionando-se água destilada ao frasco que o continha no volume indicado, produzindo-se uma solução com a concentração de 8,0 UI/mL de interferon-gama. Esta solução padrão foi utilizada para se obter uma série de quatro diluições, respectivamente com 4 UI/mL, 1 UI/ml, 0,25 UI/ml e 0 UI/mL de interferon-gama.

Os anticorpos conjugados liofilizados e congelados foram reconstituídos com água destilada e adicionados à solução diluente, na proporção de 10µL para cada 1,0 mL do diluente, para se obter a concentração de trabalho do concentrado.

As amostras de plasma a serem processadas foram previamente agitadas para se garantir que o interferon-gama estivesse igualmente distribuído em cada aliquota. Em cada orifício da placa de ELISA foram adicionados 50µL dos conjugados de anticorpos na concentração de trabalho.

Nos orifícios apropriados foram adicionados 50µL das amostras de plasma dos três frascos diferentes que compõem o teste, e, por último, foram colocados 50µL das soluções-padrão de interferon-gama nas suas diferentes diluições.

A placa de ELISA foi agitada por um minuto em aparelho próprio, para garantir mistura adequada do conjugado com as amostras de plasma e das diluições-padrão. As placas foram cobertas e ficaram incubando em temperatura ambiente por 120 minutos. Após a incubação, a placa foi lavada em aparelho próprio com a solução tampão previamente diluída. Utilizou-se cerca de 400µL para cada orifício, e o ciclo de lavagem foi repetido por seis vezes. A solução tampão residual foi retirada batendo a placa em um papel toalha absorvente com a abertura dos orifícios para baixo.

Em seguida, foram adicionados 100µL da solução enzimática do substrato em cada orifício, agitou-se em aparelho próprio, e as placas foram cobertas e novamente incubadas em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após este período, foram adicionados 50µL da “solução de parada” da reação enzimática em cada orifício da placa. Agitou-se a placa, e a densidade óptica foi medida em menos de cinco minutos após a adição da solução de parada, em aparelho de medida de absorbância.

Os valores da densidade óptica foram utilizados para o cálculo dos resultados. Utilizou-se um programa de computador fornecido pelo fabricante do teste (QuantiFERON-TB Gold In Tube Analysis Software®, Cellestis, Carnegie, Austrália). O programa realiza controle de qualidade do ensaio, gera uma curva padrão e fornece um resultado para cada indivíduo, expresso em UI/mL de interferon-gama para cada amostra.

Todas as amostras foram processadas em duplicata.

3.2.3 - Interpretação dos resultados

Cada paciente teve sua amostra de plasma avaliada para a produção de interferon-gama por linfócitos após a estimulação por antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis*, antígenos inertes (controle negativo) e mitógenos (controle positivo). Os possíveis resultados e as interpretações das várias combinações são descrita no Quadro 2.

Quadro 2 - Interpretação dos resultados possíveis de serem obtidos com a utilização do QuantiFERON-TB Gold IT

Controle Negativo [UI/mL]	Antígeno menos o negativo [UI/mL]	Mitogeno menos o negativo [UI/mL]	Resultado	Interpretação
$\leq 8,0$	$<0,35$	$\geq 0,5$	Negativo	Infecção pouco provável
$\leq 8,0$	$>0,35$ e $<25\%$ o valor do negativo	$\geq 0,5$	Negativo	Infecção pouco provável
$\leq 8,0$	$>0,35$ e $> 25\%$ o valor do negativo	qualquer	Positivo	Infecção provável
$\leq 8,0$	$<0,35$	$< 0,5$	Indeterminado	Resultado indeterminado
$\leq 8,0$	$>0,35$ e $<25\%$ o valor do negativo	$< 0,5$	Indeterminado	Resultado indeterminado
$\geq 8,0$	qualquer	qualquer	Indeterminado	Resultado indeterminado

Fonte: Cellestis, Carnegie, Austrália

3.3 - Análise estatística

Foram calculadas as relações obtidas subtraindo-se do valor da dosagem de interferon-gama no frasco contendo o antígeno específico para a micobactéria o valor encontrado para a dosagem de interferon-gama no frasco de controle negativo, para cada uma das duas medidas realizadas de cada amostra. Foram consideradas as médias aritméticas destas relações para cada amostra. Também foram determinadas as médias aritméticas das duas dosagens de interferon-gama realizadas para cada amostra contida no frasco com o antígeno específico para o *Mycobacterium tuberculosis*, cada amostra correspondendo a um paciente específico.

Estes dois parâmetros foram avaliados quanto às suas sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, pela construção das respectivas curvas de características operacionais (*receiver operating characteristic [ROC] curves*). Isto significa que a sensibilidade (capacidade de determinar a infecção em um grupo de pacientes infectados pela micobactéria) e a especificidade (identificação correta dos não infectados) foram determinadas nas várias probabilidades entre zero e um.

A área sobre a curva (A_z) foi utilizada para avaliar a acurácia preditiva da relação entre a dosagem de interferon gama no frasco recoberto com antígenos específicos subtraído o valor da dosagem no frasco controle negativo, e da dosagem de interferon-gama quando estimulados pelos antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis*, em todas as probabilidades. Foi o parâmetro utilizado para avaliar o desempenho discriminatório do teste em estudo. Uma área A_z de 0,50 corresponde a uma distribuição ao acaso, e uma área de 1,00 a um desempenho perfeito.

Para a construção das curvas ROC utilizou-se o programa estatístico MedCalc® versão 10.1.2.

4 - RESULTADOS

4 – Resultados

No período entre abril e julho de 2008, foram inicialmente selecionadas 220 crianças que compareceram serviço de coleta da seção de laboratório do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, cujos pais ou responsáveis legais concordaram em participar do estudo após a leitura do termo de consentimento informado e esclarecimento de eventuais dúvidas.

Deste grupo de crianças foram excluídas quatro crianças nas quais houve perda do acesso venoso após a coleta dos exames de rotina, e não se conseguiu material na quantidade suficiente para a realização do teste. Estas crianças não foram puncionadas novamente para a obtenção de amostra para o estudo.

Todos as crianças receberam anteriormente a vacina de BCG segundo as informações dos pais ou responsáveis. Após a avaliação da presença de cicatriz vacinal, foram excluídas do estudo 18 crianças que não apresentavam a cicatriz bem visível, ou que não tinham nenhuma cicatriz.

Após a avaliação quanto à presença de doenças que sabidamente comprometem o sistema imunológico, ou o uso de fármacos em doses imunossupressoras, foram excluídas do estudo seis crianças.

Os pais ou responsáveis legais foram questionados sobre o contato da criança com adultos tratados ou em tratamento para tuberculose, e foram excluídas mais oito crianças que tinham história de contato atual ou passado com estes adultos. Nenhuma criança apresentava quadro clínico ou radiológico compatível com tuberculose. Deste modo, foram incluídas no estudo 184

crianças sem antecedentes epidemiológicos conhecidos para tuberculose, e sem alterações clínicas que pudessem ser atribuídas à doença.

Destas 184 crianças, 74 (40,2%) eram do sexo feminino e 110 (59,7%) do sexo masculino. A idade variou entre 3 meses e 71 meses, média de 35 meses e mediana de 35 meses.

As amostras de sangue obtidas destas crianças foram processadas em duplicata, e resultados discordantes foram repetidos. Do total dos 184 participantes, 6 (3,2%) apresentaram resultado indeterminado, todos eles por apresentarem uma dosagem de interferon-gama menor que 0,5 UI/mL no frasco do teste que continha o mitógeno. Todas as crianças que apresentaram um resultado indeterminado do teste tinham idade igual ou menor do que 40 meses. Considerando que 130 crianças tinham menos de quatro anos de idade, a porcentagem de resultados indeterminados nas crianças com menos de quatro anos foi de 4,6%.

Uma criança (0,5%) apresentou um resultado interpretado como positivo pelos parâmetros adotados pelo teste. Esta criança foi reavaliada para a presença de possível contato com adulto com tuberculose e para a presença de alterações clínicas que pudessem indicar a doença, mas nada foi encontrado. Como estava em seguimento ambulatorial no Instituto da Criança, foi possível a revisão do prontuário 10 meses depois, e continuava sem nenhuma manifestação clínica sugestiva de doença. Para este estudo, este resultado foi considerado como um falso positivo, pela impossibilidade de se estabelecer a presença de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nesta criança. A Tabela 1 apresenta um resumo dos valores de interferon-gama

encontrados para as 178 crianças deste grupo que tiveram um resultado conclusivo do teste.

Tabela 1 - Resultados da dosagem de interfero-gama em crianças sem infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*

Amostra	Média dos valores (limites)
Frasco controle negativo (UI/mL)	0,10 (0 – 1,89)
Frasco com o antígeno específico (UI/mL)	0,13 (0 – 2,96)
Diferença entre controle negativo e antígeno (UI/mL)	0,02 (-0,33 – 2,77)

Foram selecionadas onze crianças atendidas em quatro diferentes serviços médicos com o diagnóstico de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. As crianças foram avaliadas e seguidas no Hospital Infantil Candido Fontoura, no Hospital Geral de Taipas, no Instituto Clemente Ferreira e no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas. Todos os pais ou responsáveis legais foram informados do objetivo da pesquisa e autorizaram a coleta da amostra de sangue. Um resumo dos achados clínicos e epidemiológicos destas crianças está disponível no Anexo A.

Neste grupo, 7 (63%) crianças eram do sexo feminino e 4 (37%) do sexo masculino. A idade destas crianças variou entre 8 meses e 132 meses (média 58,5 meses). Seis (54%) crianças tiveram o diagnóstico de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Cinco (46%) crianças apresentavam doença atribuída à micobacteria, sendo três com doença pulmonar, uma com meningite tuberculosa e uma com pericardite tuberculosa. Nenhuma das crianças tinha

iniciado tratamento ou profilaxia há mais de dois meses antes da coleta das amostras para o teste.

Neste grupo de 11 pacientes, 2 (18,0%) apresentaram resultado negativo para infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* segundo os critérios de interpretação do teste: uma paciente de 31 meses do sexo feminino, com diagnóstico de tuberculose pulmonar, sintomática e com alterações radiológicas persistentes, e com baciloscopia de escarro positiva para BK; e um paciente de 8 meses do sexo masculino, com diagnóstico de tuberculose pulmonar, sintomático e com alterações radiológicas persistentes, sem identificação da micobactéria no escarro, com teste cutâneo de 23 mm. Os dois casos foram considerados como resultados falso-negativos. A tabela 2 apresenta o resumo dos valores do teste encontrados neste grupo de 11 crianças.

Tabela 2 – Resultados da dosagem de interfero-gama em crianças com infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*

Amostras	Média dos valores (limites)
Frasco controle negativo (UI/mL)	0,07 (0 – 0,26)
Frasco com o antígeno específico (UI/mL)	4,82 (0,03 – 12,31)
Diferença entre controle negativo e antígeno (UI/mL)	4,76 (-0,01 – 12,29)

4.1 - Análise estatística

Para a obtenção da curva de características operacionais (*receiver operating characteristic* [ROC] *curve*) foram excluídas as seis crianças cujo resultado do teste foi considerado indeterminado. Foram consideradas as 178 crianças sem infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e as 11 crianças infectadas.

A Figura 1 mostra a curva ROC para os valores obtidos pela subtração do valor encontrado para a dosagem de interferon-gama no frasco de controle negativo do valor da dosagem de interferon-gama no frasco contendo o antígeno específico para a micobactéria. O deslocamento da curva para a esquerda e a área sob a curva (Az) de 0,876 refletem o seu desempenho preditivo elevado. O intervalo de confiança 95% (IC 95%) é 0,821 a 0,920 e o nível de significância $< 0,001$.

Figura 1: Curva ROC para a diferença entre as dosagens de interferon gama nos frascos com a antígeno específico do *Mycobacterium tuberculosis* e o frasco controle negativo (Curva 1)

..... Intervalo de Confiança 95%

-

Para valores superiores a 0,305 UI/mL de interferon-gama, obtidos após a subtração do valor encontrado para a dosagem de interferon-gama no frasco de controle negativo do valor dosado após a estimulação com antígenos específicos da micobactéria, a sensibilidade determinada pelo programa estatístico é de 81,82% (IC 95%: 48,2% a 97,2%) e a especificidade de 98,88% (IC 95%: 96,0% a 99,8%), o valor preditivo positivo de 81,8% (IC 95%: 46,3% a 97,4%) e o valor preditivo negativo de 98,9% (IC 95%: 96,0% a 99,8%). O Anexo B apresenta os dados gerados pelo programa computacional com os

diferentes valores obtidos para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para diferentes valores.

A Figura 2 mostra a curva ROC para os valores absolutos da dosagem de interferon-gama no frasco contendo os antígenos específicos para a micobactéria. O deslocamento da curva para a esquerda e a área sob a curva (Az) de 0,91 refletem o seu desempenho preditivo elevado. O intervalo de confiança 95% (IC 95%) é 0,860 a 0,947 e o nível de significância $< 0,001$.

Para valores superiores a 0,185 UI/mL de interferon-gama dosados após a estimulação com antígenos específicos da micobactéria, a sensibilidade determinada pelo programa estatístico foi de 90,91% (IC 95%: 58,7% a 98,5%) e a especificidade de 84,83% (IC 95%: 78,7% a 89,6%), o valor preditivo positivo de 27% (IC 95%: 13,8% a 44,1%) e o valor preditivo negativo de 99,3% (IC 95%: 96,4% a 99,9%). O Anexo C apresenta os dados gerados pelo programa computacional com os diferentes valores obtidos para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para diferentes medidas de interferon gama após estimulação com o antígeno específico para o *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 2 – Curva ROC para a dosagem de interferon gama nos frascos contendo antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* (Curva 2)

A Figura 3 mostra a comparação entre as duas curvas anteriores. A diferença entre as áreas é de 0,0335 (IC 95%: -0,0777 a 0,145), com nível de significância de 0,555 mostrando não haver diferença significativa entre elas.

Figura 3: Comparação das curvas 1 e 2

5 – DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

A tuberculose é uma doença endêmica no Brasil ⁵², e um dos pilares do controle da doença é a diagnóstico rápido e acurado dos indivíduos infectados. A presença de tuberculose em uma criança freqüentemente representa um evento sentinela na comunidade, e sugere a transmissão recente por um ou mais adultos bacilíferos. Além disto, as crianças têm um risco muito maior de progressão da infecção para doença do que os adultos ³⁵, especialmente aquelas menores de dois anos de idade ³¹. O risco de desenvolver doença é maior para crianças menores de 5 anos e adolescentes, e maior nos dois primeiros anos que se seguem à infecção ^{31, 32}.

As manifestações clínicas da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* são muito variáveis ^{29, 32, 35, 43}, e refletem respostas diferentes do sistema imunológico. Uma porcentagem grande das crianças permanece assintomática, enquanto outras desenvolvem manifestações respiratórias e sintomas gerais, como perda de peso e febre. Pode haver a disseminação da micobactéria para outras regiões anatômicas, sendo a forma meníngea da tuberculose a apresentação extra-pulmonar mais freqüente em pediatria ⁴⁸. Esta miríade de apresentações clínicas é um complicador a mais no reconhecimento da criança doente.

O diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* é ainda a principal dificuldade no atendimento à criança exposta. Durante muito tempo, o diagnóstico teve como base a identificação da exposição a um indivíduo doente, geralmente um adulto com o qual a criança teve um contato próximo, na presença de alterações ao exame radiológico do tórax, na positividade do teste cutâneo da turberculina e na pesquisa e cultura do *Mycobacterium*

tuberculosis em secreções pulmonares, gástricas ou de outros líquidos habitualmente estéreis como o líquido e o líquido pleural ^{32, 35, 43, 45}.

Todas estas abordagens diagnósticas apresentam limitações. As evidências radiológicas incluem a presença de adenopatia mediastinal ou hilar, e alterações no parênquima pulmonar ⁴³. A presença de cavernas é rara em crianças pequenas e mais frequente em adolescentes. Pode haver o comprometimento difuso do parênquima pulmonar, caracterizando uma doença miliar. Entretanto, a maioria das alterações do exame radiológico do tórax não é específica para a doença ⁵¹. O exame tomográfico do tórax detecta com maior acurácia a presença de adenomegalias e alterações do parênquima, mas implica na exposição a uma maior quantidade de radiação, é mais caro e necessita de um serviço especializado para a sua realização, o que limita o seu uso rotineiro, em especial nas populações mais carentes, as quais freqüentemente também são as mais acometidas pela doença.

Em crianças há uma grande dificuldade em se obter material adequado para o exame microbiológico, particularmente naquelas de baixa idade. Além disto, crianças com menos de dez anos são usualmente paucibacilares ³², e a porcentagem de positividade no exame direto da secreção pulmonar de crianças com forte suspeita de tuberculose geralmente não é maior que 10% a 15%. A positividade da cultura nestas crianças é um pouco maior, entre 30% e 40%, mas a demora para o resultado final limita sua utilidade para a decisão de se iniciar o tratamento ³². Crianças com infecção latente pela micobactéria não apresentam nenhuma manifestação clínica, e a pesquisa direta e a cultura são amiúde negativas ^{29, 43}.

Assim, a acurácia baixa da abordagem tradicional para a identificação de criança infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* constitui em um desafio para a pesquisa de novos métodos diagnósticos e aprimoramento das técnicas já existentes. Alguns avanços foram realizados recentemente, porém várias das novas modalidades diagnósticas para a tuberculose não foram validadas para o uso em crianças ou não estão disponíveis rotineiramente em países em desenvolvimento ²⁹.

Entre as novas alternativas disponíveis para se diagnosticar a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* está o teste baseado na liberação de interferon-gama por linfócitos T. Este exame está fundamentado na detecção *in vitro* do interferon-gama liberado por linfócitos T previamente sensibilizados pela micobactéria, e que são expostos a duas proteínas presentes na parede bacteriana: ESAT-6 (*early secretory antigen target-6*) e CFP-10 (*culture filtrate protein 10*). Como estes antígenos estão ausentes do BCG e da maioria das micobactérias presentes no meio ambiente, a exposição anterior a estas bactérias ou à vacina não induz a um resultado positivo, tornando-o um marcador mais específico da infecção do que o teste tuberculínico com a utilização do PPD ^{12, 19, 27, 36}. Como o ESAT-6 também está presente no *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai* e *Mycobacterium marinum*, há a possibilidade de um resultado positivo expressar a infecção por algum destas micobactérias.

Há dois testes utilizados comercialmente em larga escala, ambos com os mesmos princípios, sendo que o que os diferencia é principalmente o método utilizado para a detecção do interferon-gama. O teste T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec Ltda, Abingdon, UK) utiliza a técnica de *enzyme-linked*

immunosorbent spot (ELISpot) e o QuantiFERON-TB Gold In-Tube® (Cellestis, Carnegie, Austrália) utiliza a técnica de *enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA). A partir do ano de 2004, os dois teste passaram a ser progressivamente mais utilizados no diagnóstico de tuberculose, com o aumento da publicação de estudos nos quais eram comparados os respectivos desempenhos com os métodos tradicionais, habitualmente a prova cutânea da tuberculina ^{34, 38}. Porém, a maioria dos estudos tinha a casuística constituída de adultos, sendo repetidamente enfatizado pelos diferentes grupos de autores a falta de dados em crianças e a necessidade da avaliação do seu desempenho nesta faixa etária, por ser uma população altamente vulnerável. Isto porque, uma vez que a imunidade celular se desenvolve durante os primeiros anos de vida, a produção e liberação de interferon-gama por linfócitos T poderiam variar com a idade, interferindo na acurácia dos resultados do teste diagnóstico para tuberculose ²⁶.

Frente ao impacto da doença em crianças e às dificuldades diagnósticas discutidas anteriormente, e considerando o potencial benefício da utilização do teste de liberação de interferon-gama por linfócitos T nesta população, o propósito de presente estudo foi de determinar a sensibilidade e a especificidade do QuantiFERON-TB Gold In-tube®. em um grupo de crianças. Neste estudo, este teste específico foi escolhido porque apresenta uma série de vantagens em relação ao T-SPOT.TB®: ele permite que as amostras de sangue sejam coletadas diretamente nos frascos onde ficarão incubadas, diminuindo a necessidade de manipulação do material; a amostra pode permanecer em temperatura ambiente por várias horas, permitindo a coleta de material de crianças em diferentes unidades de atendimento e posterior

encaminhamento ao laboratório para processamento; a técnica de ELISA é utilizada rotineiramente em laboratórios clínicos, não havendo necessidade de compra de equipamento específico para a realização do exame; após a leitura das absorbâncias das amostras e controles, um *software* próprio, disponível no endereço eletrônico do fabricante, realiza automaticamente a interpretação dos resultados. Estas características podem facilitar o uso do teste na rotina do serviço público no diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* em crianças.

Os poucos estudos em crianças, disponíveis até então, avaliaram o teste em crianças com alta probabilidade de infecção, e compararam o resultado obtido com o teste cutâneo da tuberculina. Tsiouris et al.⁵⁰ compararam o QuantiFERON® com o teste tuberculínico em 184 crianças e adolescentes sul-africanos com idade entre 5 e 15 anos, que tinham antecedente de contato com adulto com tuberculose, mas sem evidência clínica de doença. O QuantiFERON® foi positivo em 33,2% das crianças, e o teste tuberculínico (enduração >10mm) positivo em 43,5% ($p<0,001$), sugerindo que o QuantiFERON® poderia ser mais específico no diagnóstico de tuberculose latente neste grupo.

Um estudo indiano comparou o QuantiFERON® com o teste tuberculínico em 105 crianças com suspeita de tuberculose ou com contato com um adulto doente²⁰. Neste estudo, 11 crianças (10,5%) foram positivas para o QuantiFERON®, e 11 (10,5%) e 4 (4%) para o teste tuberculínico quando considerados os resultados >10mm e >15 mm, respectivamente. A concordância dos resultados foi alta (95%) para as crianças com teste tuberculínico >10 mm, não mostrando vantagem na utilização do novo teste

para o diagnóstico da doença neste grupo de crianças. Neste estudo, não houve nenhum resultado indeterminado, apesar de mais da metade das crianças serem desnutridas.

Ferrara et al.²¹ compararam simultaneamente o resultado de três testes distintos, QuantiFERON-TB Gold®, T-SPOT-TB® e prova tuberculínica, em 393 pacientes com suspeita clínica de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (doença ou infecção latente). Destes, 25 (6%) eram crianças com menos de cinco anos de idade. Os dois testes que utilizam a dosagem de interferon-gama por linfócitos ativados mostraram serem mais específicos que a prova tuberculínica, porém o número de resultados indeterminados para o QuantiFERON-TB Gold® foi significativamente maior quando comparado com o T-SPOT-TB®, especialmente em pacientes com alguma condição de imunossupressão. Cerca de 32% das crianças menores de cinco anos de idade apresentaram resultados indeterminados para o QuantiFERON-TB Gold®.

Diferentemente dos estudos mencionados acima, no presente trabalho decidiu-se pela determinação da sensibilidade e especificidade do QuantiFERON-TB Gold In-Tube® pela avaliação de um grupo de crianças com pouca probabilidade de estar infectada e outro grupo com alta probabilidade de infecção, com ou sem doença.

Na seleção das crianças incluídas no grupo definido como não infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis*, todas deveriam ser previamente vacinadas com o BCG. Uma vez que este imunobiológico faz parte do Programa Nacional de Imunização, com cobertura vacinal superior a 95% em todo o país nos últimos cinco anos, a amostra representaria melhor a nossa realidade. E se houvesse alguma interferência da vacinação prévia com os resultados do teste,

esta interferência poderia ser identificada. Além da verificação do registro da vacinação na carteira, utilizou-se como critério a presença da cicatriz cutânea em região de músculo deltóide direito. As crianças que não tinham cicatriz bem visível, mesmo que apresentassem o registro na carteira vacinal, foram excluídas do estudo. Com isto, crianças que receberam a vacina inadequadamente, ou que por alguma eventual disfunção imune não responderam da maneira esperada, foram excluídas, garantindo maior homogeneidade do grupo em relação a este parâmetro.

Uma vez que a capacidade do teste identificar uma resposta positiva depende da integridade do sistema imune celular envolvido nesta resposta, todas as crianças com qualquer comprometimento conhecido do sistema imune, quer seja congênito ou adquirido, incluindo as crianças com desnutrição grave, também foram excluídas.

Não há um critério definitivo para se estabelecer a presença de infecção latente pelo *Micobacterium tuberculosis*. Na criança, geralmente este diagnóstico é estabelecido levando-se em conta a exposição a um comunicante íntimo bacilífero e o resultado da prova cutânea da tuberculina ^{2, 3, 32, 43, 45}. Esta prova é utilizada na prática clínica há mais de cem anos, e ela mede a resposta imune celular por meio de uma reação tardia de hipersensibilidade ao *Purified Protein Derivative* (PPD). O PPD é uma mistura de diferentes antígenos, muitos dos quais são compartilhados pelo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, pelo *Mycobacterium bovis* cepa BCG e por micobactérias presentes no meio ambiente ^{2, 30}. Deste modo, a especificidade do teste está diminuída em populações nas quais a vacinação com o BCG é adotada na rotina, ou em regiões onde haja grande risco de infecção por micobacterias não

tuberculosas, as quais habitualmente estão presentes no ambiente ³⁰. A avaliação da resposta ao teste da tuberculina se dá pela medida do tamanho da enduração, palpável no local da aplicação do PPD, realizada 72 horas após o procedimento ^{24, 30}.

No Brasil, o teste é realizado com a aplicação de duas unidades de tuberculina (2 UT) do PPD RT23, cujo resultado é equivalente ao uso de 5 UT do PPD-S, utilizado em outros países ²⁴. Há grandes dificuldades na interpretação do resultado do teste tuberculínico: pacientes com outras patologias que levem ao comprometimento do sistema imunológico podem, mesmo doentes, não apresentar reação ao teste; indivíduos vacinados com o BCG há menos de três anos podem apresentar um resultado interpretado como reator forte sem estarem infectados; e cerca de 20% a 30% dos portadores de tuberculose pulmonar em atividade apresentam teste tuberculínico menor do que 10 mm de enduração ¹⁰. Estas dificuldades na utilização do teste tuberculínico foram consideradas na seleção das crianças participantes do estudo.

Optou-se pela não realização rotineira do teste cutâneo da tuberculina neste estudo. Como este grupo foi constituído por crianças saudáveis, haveria pouco ou nenhum benefício individual da aplicação do PPD, implicando em considerações éticas da realização do mesmo. Além disto, este grupo caracterizou-se pela presença de crianças de baixa idade (média 35 meses), ou seja, a maioria recebeu o BCG há menos de três anos, e com grande potencial para apresentar uma prova tuberculina positiva associada à vacina. Na avaliação do sistema de pontos adotado pelo Ministério da Saúde ⁹ para o diagnóstico da tuberculose pulmonar em crianças com pesquisa e culturas

negativas para a micobactéria, a melhor acurácia do sistema foi obtida utilizando-se um ponto de corte de 30 pontos, com sensibilidade de 99,9% e especificidade de 86,5% ^{41, 42}. Neste sistema de pontos, a presença de um teste tuberculínico positivo soma 15 pontos ao total. Uma vez garantido que os demais critérios não somem nenhum ponto, ou seja, com a exclusão do estudo de todas as crianças que tiveram contato com um adulto doente, das crianças com qualquer manifestação clínica relacionada à doença, das crianças com alterações do exame radiológico e daquelas com desnutrição grave, se considerada a possibilidade de um teste tuberculínico positivo, mesmo assim a soma dos pontos seria no máximo 15, o que caracteriza uma população com baixa probabilidade de doença pulmonar ^{41, 42}.

A avaliação da presença da infecção latente é mais difícil, pois não há um padrão ouro bem definido. Quando se adota o critério de um resultado maior que 15 mm de enduração para o teste cutâneo da tuberculina, considera-se que haja a possibilidade da criança estar, mesmo para crianças previamente vacinadas com o BCG ⁹. Porém, este critério vale para os teste positivos em crianças que tenham uma exposição conhecida a indivíduos doentes e bacilíferos. Ele não é adequado para o uso indiscriminado em uma população de crianças saudáveis e sem contato conhecido, pois o resultado pode ser influenciado pela vacinação prévia com o BCG, por contatos com outras micobactérias ou por alterações do sistema imunológico do indivíduo. Além disto, a interpretação do resultado depende de um observador externo, e está sujeita a erros de aferição. Considerando que, após a exclusão de todas as crianças com quadro clínico, radiológico ou epidemiológico que possam sugerir exposição à micobactéria, esta seja uma população vacinada com baixa

prevalência de infecção, a especificidade e o valor preditivo positivo da prova tuberculínica são bastante diminuídos ^{2,3}.

Como a presença de exposição e infecção não detectadas na seleção dos participantes poderia levar a alguns resultados positivos para o teste avaliado, estava prevista a avaliação mais detalhada de toda criança cujo resultado para o QuantiFERON-TB Gold In-tube® fosse positivo. Apenas para uma criança deste grupo o resultado do teste foi considerado positivo pelos critérios recomendados pelo laboratório fabricante, um menino com oito meses de idade, sem contato conhecido para a tuberculose. Este paciente continuou em seguimento no Instituto da Criança devido a sua doença de base, hipoparatireoidismo, e dez meses após a coleta do exame continuava sem sinais clínicos de infecção pelo *Micobacterium tuberculosis* e sem contato conhecido com algum adulto doente. Deste modo, este foi considerado um resultado falso positivo neste trabalho. O ideal seria obter uma nova amostra de sangue após este período e reavaliar o resultado, mas a expiração da validade do teste não permitiu esta abordagem.

Neste grupo seis (3,2%) crianças apresentaram um resultado considerado indeterminado. O teste é considerado indeterminado quando não há liberação de interferon-gama pelos linfócitos T estimulados por um mitógeno, no caso fitohemaglutinina, ou quando os valores basais de interferon-gama, medidos no frasco controle negativo, são maiores que 8 UI/mL. A incorporação de um controle positivo no QuantiFERON-TB Gold In-tube® permite avaliar se um determinado indivíduo consegue responder adequadamente ao teste, e validar um resultado negativo. O resultado indeterminado pode ser consequência de alterações na resposta imune do

paciente, ou de erros na realização do teste. Uma vez que o diagnóstico ou a exclusão da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* é especialmente importante em crianças imunocomprometidas, um resultado negativo precisa ser avaliado também quanto à capacidade desta criança responder ao estímulo com a liberação do interferon-gama. Deste modo o uso do mitógeno permite uma indicação da condição imune da criança sendo testada. Mas um resultado positivo após a estimulação com o mitógeno, mostrando a capacidade do indivíduo de responder adequadamente quando avaliado com um teste que depende de sua habilidade de resposta dos linfócitos T, não tem relevância clínica para o diagnóstico de imunodeficiências, uma vez que ele é freqüentemente positivo mesmo em pacientes gravemente imunocomprometidos. Como erros técnicos de manipulação das amostras e armazenamento podem levar a resultados indeterminados, a conduta ideal nestes pacientes, para os quais não há evidência clínica de imunossupressão, seria repetir o teste após a coleta de uma nova amostra. Pelo delineamento deste estudo, a coleta de uma nova amostra não foi possível.

Em crianças, há de se levar em conta que a imunidade celular tende a amadurecer com a idade, o que poderia levar ao aumento do número de resultados indeterminados principalmente em crianças de baixa idade. Bergamini et al.⁵ avaliaram o desempenho do teste de liberação de interferon-gama em 496 crianças de zero a 19 anos de idade, sendo que 315 fizeram o QuantiFERON-TB Gold In-Tube®. Neste estudo, 16,4% dos resultados foram indeterminados, pela baixa resposta após o estímulo com o mitógeno. A proporção de resultados indeterminados foi maior em crianças menores que quatro anos do que naquelas maiores (21,5% vs 0,4% [$p < 0,001$]). A associação

entre a frequência de resultados indeterminados e a idade, quando considerada como uma variável contínua, foi estatisticamente significativa para o QuantiFERON-TB Gold In-Tube® (OR: 0,68 [CI 95%: 0,52-0,90]).

De maneira semelhante, Connell et al.¹⁴ estudando uma população de 106 crianças com tuberculose ou com alto risco de infecção latente obtiveram 17 (17%) resultados indeterminados com a utilização do QuantiFERON-TB Gold In-Tube®. Porém, neste estudo, 12 (12%) dos resultados foram devidos a uma alta dosagem do interferon-gama nos frascos utilizados como controle negativo, e apenas cinco (5%) foram associadas a uma resposta inadequada ao estímulo com o mitógeno. Em um novo estudo, o mesmo grupo avaliou uma outra população de 100 crianças com tuberculose ou com alto risco de infecção latente¹⁵. Foram encontrados três (3%) resultados indeterminados, sendo que de 16 crianças menores de três anos, duas (12,5%) tiveram um resultado indeterminado, uma por resposta inadequada do mitógeno e outra pela alta dosagem do interferon-gama no controle negativo. Já entre as 84 crianças com mais de três anos, apenas uma (1,1%) apresentou a resposta ao mitógeno inadequada.

Os resultados não são semelhantes em todos os estudos. Lighter et al.²⁸ avaliaram 253 crianças com idade média de nove anos, 74 das quais foram previamente vacinados com o BCG. Neste estudo, apenas três (1,4%) crianças apresentaram resultado indeterminado, todas devido à resposta baixa ao mitógeno. A proporção de resultados indeterminados foi semelhante para os diferentes grupos etários. Um dado bastante interessante deste estudo é que a quantidade de interferon-gama liberada após a estimulação com o mitógeno estavam diretamente relacionada com a idade, sendo progressivamente maior

em crianças mais velhas. Em um estudo no qual se avaliaram crianças no Nepal e no Brasil, Petrucci et al.³⁹ encontraram freqüências de resultados indeterminados de 3% e 1%, respectivamente.

Um resultado indeterminado para o QuantiFERON-TB Gold In-Tube® não permite definir para aquele indivíduo a presença ou ausência de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. No presente estudo todas as seis crianças apresentaram o resultado indeterminado por resposta inadequada ao estímulo com o mitógeno, e todas tinham menos de quatro anos. Considerando no grupo avaliado apenas as crianças menores de quatro anos, no total de 130 crianças, a freqüência de resultados indeterminados foi de 4,6%. Considerou-se que esta freqüência de resultados indeterminados não compromete significativamente o desempenho do teste, mas exige um maior cuidado quando da sua aplicação em crianças de baixa idade, pois, se estas crianças fossem apenas submetidas à versão simplificada do teste, no qual não se utiliza o controle positivo com o mitógeno, estes resultados seriam falsamente interpretados como negativos. Assim, sempre que o QuantiFERON-TB Gold In-Tube® for utilizado para o diagnóstico em crianças deve ser feito em sua forma completa, com a utilização do mitógeno como controle positivo, em particular naquelas menores de quatro anos de idade.

Na seleção do grupo de crianças com infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* não foram diferenciadas aquelas com doença ativa das que tinham infecção latente. Todas as crianças tinham um contato bem estabelecido com um adulto bacilífero, e foram consideradas infectadas pelos médicos responsáveis pelo seu atendimento, sendo indicada utilização de profilaxia ou esquema tríplice para o tratamento se houvesse quadro clínico compatível.

Neste grupo, em apenas duas crianças a micobactéria foi identificada e cultivada, uma em líquido e a segunda em escarro. Para duas (18,1%) crianças o resultado do QuantiFERON-TB Gold In-Tube® foi considerado negativo, ambas com o diagnóstico de doença pulmonar. A primeira tinha 31 meses de vida, referia contato com um tio bacilífero, apresentava tosse, febre e adinamia, e ao exame radiológico a presença de imagem persistente de condensação em parênquima pulmonar. Esta criança teve baciloscopia e cultura de escarro positiva para a micobactéria. A segunda criança tinha oito meses, e contato hospitalar com um adulto bacilífero. Evoluiu com febre mantida e ao exame radiológico havia a presença de condensação persistente e progressiva de parênquima pulmonar, com a presença de adenomegalia hilar em exame tomográfico de tórax. A prova cutânea da tuberculina apresentou uma endureção de 23 mm, e a criança mostrou uma boa resposta ao tratamento com o esquema tríplice. A pesquisa microbiológica em escarro ou secreção gástrica não foi realizada para esta criança.

A pequena casuística não permite inferir que a idade menor de quatro anos destas crianças tenha sido um fator determinante para o resultado negativo do teste. E estas duas crianças apresentaram uma resposta adequada de liberação de interferon-gama quando estimuladas com a fitohemaglutinina, indicando a capacidade de seus linfócitos T de responder ao estímulo. Todas as outras nove crianças apresentaram resultado positivo para o QuantiFERON-TB Gold In-Tube®, com altas dosagens de interferon-gama. É importante salientar que oito destas crianças tinham idade superior a quatro anos.

Avaliou-se a sensibilidade e a especificidade do QuantiFERON-TB Gold In-Tube® considerando dois parâmetros diferentes. Primeiro foi utilizado o critério preconizado pelo teste, que é a diferença entre os valores do controle negativo, representando o nível basal do interferon-gama, e os valores após a estimulação específica. O laboratório fabricante estabelece como critério de positividade do teste que esta diferença seja de pelo menos 0,35 UI/mL. Depois considerou-se apenas a dosagem de interferon-gama obtida após a estimulação com os antígenos específicos do *Micobacterium tuberculosis*. Foram obtidas duas curvas ROC, uma para cada parâmetro avaliado.

Na obtenção da curva ROC para as diferenças de dosagens entre os dois frascos, o programa estatístico determinou o valor de 0,305 UI/mL como o ponto de corte mais adequado para esta população. Este valor é muito semelhante ao valor de 0,35 UI/mL utilizado como padrão pelo QuantiFERON-TB Gold In-Tube® para definir o resultado positivo. Com a utilização de valores iguais ou maiores a 0,305 UI/mL de interferon-gama, a sensibilidade do teste foi de 81,82% e a especificidade de 98,88%, o valor preditivo positivo de 81,8% e valor preditivo negativo de 98,9%. Utilizando-se este critério, o teste se mostra muito útil na avaliação de crianças com suspeita de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

Quando utilizado predominantemente em adultos, uma revisão sistemática³⁸ mostrou resultados de sensibilidade variando em 16 diferentes estudos entre 55% e 88% (sensibilidade do conjunto dos trabalhos de 78%) com a utilização da versão QuantiFERON-TB Gold®, na qual o sangue é coletado em seringa com anticoagulante e depois exposto à estimulação com antígenos específicos e mitógeno. Na versão utilizada neste estudo, o

QuantiFERON-TB Gold In-Tube®, o sangue é coletado diretamente nos frascos já revestidos com os antígenos específicos ou com o mitógeno. Para esta versão do teste, a sensibilidade em seis estudos diferentes variou entre 64% e 93% (sensibilidade do conjunto de trabalhos de 70%). Estes resultados obtidos com a utilização do teste em adultos são muito próximos dos resultados deste estudo. Do mesmo modo, esta mesma revisão sistemática ³⁸ identificou oito estudos nos quais os participantes tinham recebido anteriormente a vacina BCG, nos quais a especificidade do teste variou de 89% a 99% (especificidade do conjunto de estudos de 96%), mais uma vez resultados muito próximos aos que aqui foram obtidos.

Os estudos feitos em crianças são mais difíceis de serem comparados, porque a seleção da população estudada difere muito entre eles. Em estudo publicado recentemente, Bianchi et al. ⁶ avaliaram na Itália 336 crianças e adolescentes com menos de 16 anos utilizando o QuantiFERON-TB Gold In-Tube®. Cerca de 55% destas crianças tinham sido vacinadas com o BCG, o restante ou não era vacinado (8%) ou a informação era desconhecida (37%). Neste estudo, a sensibilidade do teste foi de 93,8% e a especificidade de 90,9%. Kampmann et al. ²⁵ avaliaram 209 crianças e adolescentes com menos de 16 anos com doença ativa ou infecção latente. A idade média dos participantes foi de 9,2 anos para aquelas com tuberculose e 6,9 anos para aquelas com infecção latente. A maioria (142[68%]) havia recebido anteriormente o BCG. Em um subgrupo de 25 deste estudo, as quais tinham doença comprovada por exame microbiológico positivo, a sensibilidade do QuantiFERON-TB Gold In-Tube® para o diagnóstico da tuberculose foi de 80%. Neste estudo, os autores concluem que o teste não é melhor do que a

prova cutânea da tuberculina para o diagnóstico da doença ou da infecção latente.

Connell et al.¹⁵ avaliaram 100 crianças na Austrália para comparar o desempenho no diagnóstico de tuberculose de dois testes de liberação de interferon-gama por linfócitos T e da prova cutânea da tuberculina. Definiu-se como infecção latente a presença de um teste cutâneo positivo e ausência de sinais radiológicos de tuberculose, e doença ativa a presença de um teste cutâneo positivo e a presença de sintomas e/ou alterações radiológicas sugestivas da doença, ou ainda a identificação da micobacteria em escarro ou secreção gástrica. Neste estudo, a sensibilidade do QuantiFERON-TB Gold In-Tube® foi de 89% quando utilizado no grupo de crianças com doença ativa e de 47% quando aplicado nas crianças diagnosticadas com infecção latente. Se restrito ao grupo de crianças com contato conhecido com adulto bacilífero, a sensibilidade do teste para infecção latente foi de 59%. Neste estudo, a especificidade foi de 90%.

Detjen et al.¹⁸ estudaram a utilização do QuantiFERON-TB Gold In-Tube® em crianças na Alemanha, onde há uma baixa incidência de tuberculose. Foram incluídas no estudo 73 crianças com idade média de 39 meses, sendo 28 crianças com infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* confirmada microbiologicamente. Neste estudo, a sensibilidade do teste foi de 93% (IC 95% 77% a 99%) e a especificidade de 100% (IC 95% 91% a 100%).

A diferença de resultados nos estudos citados deve-se principalmente aos critérios adotados para se definir a presença de infecção. Quando se considera um grupo de crianças com doença, particularmente quando há confirmação microbiológica, a variação dos resultados é menor e a

sensibilidade geralmente está na faixa entre 80% a 90%. Já na avaliação das crianças com infecção latente, onde os critérios são mais variáveis e incluem o resultado do teste cutâneo com a tuberculina, a variação encontrada na sensibilidade é muito maior. Os resultados obtidos no presente estudo são comparáveis àqueles encontrados nos estudos que contém uma casuística formada predominantemente por adultos, e com aqueles realizados com crianças nas quais a infecção é confirmada por exames microbiológicos.

Obteve-se também uma segunda curva ROC para as dosagens de interferon-gama após a estimulação com os antígenos específicos. O objetivo era avaliar se este valor poderia ser utilizado como um critério diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Para este parâmetro, o programa estatístico determinou o valor de 0,185 UI/mL como o ponto de corte mais adequado para esta população. Como os valores médios da dosagem de interferon-gama após estimulação específica são muito baixos no grupo de crianças não infectadas, de 0,13 UI/mL, e praticamente não diferem dos valores médios obtidos no controle negativo, de 0,10 UI/mL, a utilização de um ponto de corte de 0,185 UI/mL determina uma sensibilidade de 90,91% e uma especificidade de 84,83% para o teste. Porém o valor preditivo positivo do teste para este valor de corte é muito baixo, de apenas 27%, limitando a sua utilização na diferenciação das crianças infectadas daquelas sem infecção. Assim, apesar da comparação entre as duas curvas ROC não mostrar diferença significativa entre elas, a dosagem do interferon-gama após a estimulação com os antígenos específicos não é um valor adequado e não pode substituir a utilização da diferença entre o controle negativo e a dosagem após estimulação com o antígeno específico.

O desempenho do QuantiFERON-TB Gold In-Tube® em crianças é bastante favorável, porém a sensibilidade de 81,82% não faz dele o teste definitivo para o diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Ele representa uma ferramenta a mais na elucidação diagnóstica, mas não prescinde dos exames microbiológicos nem da avaliação cuidadosa clínica e epidemiológica. Por outro lado, por ter uma alta especificidade, um resultado positivo do teste pode ser utilizado para justificar a introdução do tratamento ou da profilaxia, quando indicados. A incorporação da teste na rotina diagnóstica da avaliação da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* em crianças também permitiria uma maior rapidez nas decisões, pois o resultado pode ser obtido em até 24 horas.

Mas as indicações e restrições à utilização do teste em crianças ainda precisam ser mais bem exploradas. Há a necessidade de se determinar de maneira mais precisa a frequência de resultados indeterminados, particularmente nas crianças de baixa idade. A grande variação desta frequência encontrada em diferentes trabalhos parece sugerir que possa haver outros fatores implicados, além da idade. Este conhecimento é importante para se determinar outras condições que interfiram com o teste, e eventuais restrições ao seu uso.

Um grande campo de pesquisa é a eventual utilização do teste no controle do tratamento da tuberculose. Alguns autores aventam a possibilidade de que exames seriados, realizados ao longo do tratamento de um paciente com tuberculose, poderiam mostrar uma diminuição da liberação de interferon-gama, que estaria associada com a eficácia da terapêutica. Também merece uma investigação cuidadosa a hipótese de que um teste positivo pode

negativar após um tratamento efetivo, servindo como controle de cura. Não há dados sobre a utilização do teste em pacientes com doença causada por *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente, determinando se este pode ser um fator de alteração de sua acurácia diagnóstica.

Crianças imunocomprometidas estão sob maior risco de adoecer após uma infecção pela micobacteria. Neste grupo a utilização do teste cutâneo da tuberculina pode estar muito comprometida, e se o QuantiFERON-TB Gold In-Tube® mantiver as sensibilidades e especificidades encontradas no presente estudo, sua utilidade seria enorme. Porém diferentes comprometimentos do sistema imunológico podem determinar respostas diferentes ao teste. Pacientes com comprometimento predominantemente humoral precisam ser avaliados separadamente daqueles com comprometimento predominantemente celular ou combinado. Estes grupos de crianças ainda não foram devidamente abordados pelos estudos atuais.

Há um vasto campo para a pesquisa da utilização do QuantiFERON-TB Gold In-Tube® na população pediátrica. Os resultados do presente estudo podem ser considerados promissores e devem estimular ao uso cada vez mais frequente de teste.

6 – CONCLUSÕES

6 – Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem chegar às seguintes conclusões:

1 – no grupo estudado, o teste mostrou boa acurácia, com sensibilidade de 81,8% (IC 95% - 48,2% a 97,2%) e especificidade de 98,8% (IC 95% - 96,0 a 99,8%) para o diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, concluindo-se que ele pode ser utilizado na rotina diagnóstica de crianças comunicantes de um indivíduo bacilífero;

2 – neste estudo, o valor preditivo positivo do teste foi de 81,8% (IC 95%: 46,3% a 97,4%) e o valor preditivo negativo foi de 98,9% (IC 95%: 96,0% a 99,8%), indicando que um resultado negativo do teste para uma criança sem manifestações clínicas e radiológicas compatíveis com tuberculose indica uma probabilidade muito baixa de infecção, concluindo-se que este teste pode ser utilizado com razoável segurança para descartar a infecção nestas crianças;

3 - no grupo estudado, a construção da curva ROC definiu como melhor ponto de corte para a diferença das dosagens de interferon-gama nos frascos de controle negativo das dosagens obtidas após a estimulação com os antígenos específicos, o valor de 0,305 UI/mL, semelhante ao adotado como referência pelo laboratório fabricante e utilizado no diagnóstico de adultos. Deste modo, conclui-se que este valor também é adequado como referência para crianças;

4 – a frequência de resultados indeterminados em crianças menores de quatro anos de idade de 4,6% encontrada na população estudada não invalida a utilização do teste para este grupo de crianças, mas implica que o teste deva sempre ser realizado na sua forma completa, com a utilização de um mitógeno como controle positivo.

7 – ANEXOS

Anexo A – Resumo dos achados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais no grupo de crianças com infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

Paciente	Sexo	Idade (meses)	Tipo de infecção		Sintomas Clínicos	Alterações Radiológicas	PPD	Microbiologia	Tratamento	Resultado do QuantiFERON
ID01	F	59	Infecção latente	Domiciliar	Presentes	Ausentes	18	Negativa	Quimioprofilaxia	Positivo
ID02	F	120	Infecção latente	Domiciliar	Ausentes	Ausentes	15	Negativa	Quimioprofilaxia	Positivo
ID03	F	8	Meningite	Domiciliar	Presentes	Ausentes	NR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolado em líquido	Esquema tríplice	Positivo
ID04	F	48	Infecção latente	Domiciliar	Presentes	Ausentes	15	Negativa	Quimioprofilaxia	Positivo
ID07	M	8	Doença pulmonar	Hospitalar	Presentes	Presentes	23	Negativa	Esquema tríplice	Negativo
ID09	M	31	Doença pulmonar	Domiciliar	Presentes	Presentes	21	Negativa	Esquema tríplice	Positivo
ID10	M	84	Infecção latente	Domiciliar	Ausente	Ausentes	15	Negativa	Quimioprofilaxia	Positivo
ID11	M	64	Infecção latente	Domiciliar	Ausente	Ausentes	10	Negativa	Quimioprofilaxia	Positivo
ID13	F	31	Doença pulmonar	Domiciliar	Presentes	Presentes	NR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolado em secreção pulmonar	Esquema tríplice	Negativo
ID15	F	132	Pericardite	Domiciliar	Presentes	Presentes	10	Negativa	Esquema tríplice	Positivo
ID82	F	59	Infecção latente	Domiciliar	Ausente	Ausentes	11	Negativa	Seguimento clínico	Positivo

Anexo B - Dados gerados pelo programa computacional (MedCalc versão 10.1.2) com os valores obtidos para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para diferentes possibilidades de ponto de corte dos resultados da diferença entre a dosagem de interferon-gama nos frascos controles e após a estimulação com antígeno específico.

ROC curve												
Variable		DIF										
Classification variable		TB										
Select		1										
Positive group												
TB		= 1										
Sample size		11										
Negative group												
TB		= 0										
Sample size		178										
Disease prevalence (%)		5,82										
Area under the ROC curve (AUC)		0,876										
Standard Error		0,0685										
95% Confidence Interval		0,821 to 0,920										
z statistic		5,496										
Significance level P (Area=0.5)		0,0001										
Criterion values and coordinates of the ROC curve [Hide]												
Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI	+PV	95% CI	-PV	95% CI
>=-0,185	100,00	71,3 - 100,0	0,00	0,0 - 2,1	1,00				5,8	2,9 - 10,2		
>-0,185	100,00	71,3 - 100,0	1,12	0,2 - 4,0	1,01	0,3 - 4,0	0,00		5,9	3,0 - 10,3	100,0	16,5 - 100,0
>-0,12	100,00	71,3 - 100,0	1,69	0,4 - 4,9	1,02	0,3 - 3,1	0,00		5,9	3,0 - 10,3	100,0	30,5 - 100,0
>-0,08	100,00	71,3 - 100,0	2,25	0,6 - 5,7	1,02	0,4 - 2,7	0,00		5,9	3,0 - 10,4	100,0	30,5 - 100,0
>-0,075	100,00	71,3 - 100,0	2,81	0,9 - 6,4	1,03	0,4 - 2,4	0,00		6,0	3,0 - 10,4	100,0	48,0 - 100,0
>-0,065	100,00	71,3 - 100,0	3,37	1,3 - 7,2	1,03	0,5 - 2,3	0,00		6,0	3,0 - 10,5	100,0	54,1 - 100,0
>-0,055	100,00	71,3 - 100,0	3,93	1,6 - 7,9	1,04	0,5 - 2,2	0,00		6,0	3,1 - 10,6	100,0	58,9 - 100,0
>-0,05	100,00	71,3 - 100,0	4,49	2,0 - 8,7	1,05	0,5 - 2,1	0,00		6,1	3,1 - 10,6	100,0	58,9 - 100,0
>-0,045	100,00	71,3 - 100,0	5,06	2,3 - 9,4	1,05	0,6 - 2,0	0,00		6,1	3,1 - 10,7	100,0	66,2 - 100,0
>-0,04	100,00	71,3 - 100,0	7,30	3,9 - 12,2	1,08	0,6 - 1,8	0,00		6,2	3,2 - 10,9	100,0	75,1 - 100,0
>-0,035	100,00	71,3 - 100,0	9,55	5,7 - 14,9	1,11	0,7 - 1,7	0,00		6,4	3,2 - 11,2	100,0	80,3 - 100,0
>-0,03	100,00	71,3 - 100,0	11,80	7,5 - 17,5	1,13	0,8 - 1,7	0,00		6,5	3,3 - 11,4	100,0	83,7 - 100,0
>-0,025	100,00	71,3 - 100,0	13,48	8,8 - 19,4	1,16	0,8 - 1,7	0,00		6,7	3,4 - 11,6	100,0	85,6 - 100,0
>-0,02	100,00	71,3 - 100,0	17,42	12,2 - 23,8	1,21	0,9 - 1,7	0,00		7,0	3,5 - 12,1	100,0	88,7 - 100,0
>-0,015	100,00	71,3 - 100,0	21,91	16,1 - 28,7	1,28	1,0 - 1,7	0,00		7,3	3,7 - 12,7	100,0	90,9 - 100,0
>-0,01	90,91	58,7 - 98,5	28,09	21,6 - 35,3	1,26	0,9 - 1,7	0,32	0,05 - 2,1	7,2	3,5 - 13,0	98,0	89,4 - 99,7
>-0,005	90,91	58,7 - 98,5	36,52	29,4 - 44,0	1,43	1,1 - 1,9	0,25	0,04 - 1,6	8,1	4,0 - 14,4	98,5	91,7 - 99,7
>0	81,82	48,2 - 97,2	46,07	38,6 - 53,7	1,52	1,1 - 2,1	0,39	0,1 - 1,4	8,6	4,0 - 15,7	97,6	91,6 - 99,6
>-0,005	81,82	48,2 - 97,2	58,43	50,8 - 65,8	1,97	1,5 - 2,7	0,31	0,09 - 1,1	10,8	5,1 - 19,6	98,1	93,3 - 99,7
>-0,01	81,82	48,2 - 97,2	62,92	55,4 - 70,0	2,21	1,6 - 3,0	0,29	0,08 - 1,0	12,0	5,6 - 21,6	98,2	93,8 - 99,7
>-0,015	81,82	48,2 - 97,2	66,29	58,8 - 73,2	2,43	1,8 - 3,3	0,27	0,07 - 0,9	14,8	7,0 - 28,2	98,4	94,4 - 99,8
>-0,02	81,82	48,2 - 97,2	70,79	63,5 - 77,3	2,80	2,1 - 3,8	0,26	0,07 - 0,8	18,4	8,8 - 32,0	98,6	94,9 - 99,8
>-0,025	81,82	48,2 - 97,2	77,53	70,7 - 83,4	3,64	3,1 - 5,5	0,23	0,06 - 0,8	20,5	9,8 - 35,3	98,6	95,1 - 99,8
>-0,03	81,82	48,2 - 97,2	80,34	73,7 - 85,9	4,16	3,6 - 6,5	0,22	0,06 - 0,8	23,1	11,2 - 39,3	98,7	95,2 - 99,8
>-0,035	81,82	48,2 - 97,2	83,15	76,8 - 88,3	4,85	4,2 - 7,4	0,21	0,06 - 0,8	25,7	12,5 - 43,3	98,7	95,4 - 99,8
>-0,04	81,82	48,2 - 97,2	85,39	79,3 - 90,2	5,60	4,8 - 8,4	0,21	0,06 - 0,8	28,1	13,8 - 46,7	98,7	95,4 - 99,8
>-0,045	81,82	48,2 - 97,2	87,08	81,2 - 91,6	6,33	5,2 - 9,2	0,21	0,06 - 0,8	30,0	14,8 - 49,4	98,7	95,5 - 99,8
>-0,05	81,82	48,2 - 97,2	88,20	82,5 - 92,5	6,94	5,8 - 10,2	0,20	0,05 - 0,8	32,1	15,9 - 52,3	98,8	95,6 - 99,8
>-0,055	81,82	48,2 - 97,2	89,33	83,8 - 93,4	7,67	7,3 - 12,9	0,20	0,05 - 0,8	37,5	18,8 - 59,4	98,8	95,7 - 99,8
>-0,06	81,82	48,2 - 97,2	91,57	86,5 - 95,2	9,71	7,8 - 13,8	0,20	0,05 - 0,8	39,1	19,7 - 61,4	98,8	95,7 - 99,8
>-0,065	81,82	48,2 - 97,2	92,13	87,2 - 95,6	10,40	8,5 - 14,8	0,20	0,05 - 0,8	40,9	20,7 - 63,6	98,8	95,7 - 99,8
>-0,07	81,82	48,2 - 97,2	92,70	87,8 - 96,1	11,20	10,0 - 17,5	0,19	0,05 - 0,8	45,0	23,1 - 68,4	98,8	95,8 - 99,8
>-0,075	81,82	48,2 - 97,2	93,82	89,2 - 98,9	13,24	11,0 - 19,3	0,19	0,05 - 0,8	47,4	24,5 - 71,1	98,8	95,8 - 99,8
>-0,085	81,82	48,2 - 97,2	94,38	89,9 - 97,3	14,56	12,2 - 21,4	0,19	0,05 - 0,8	50,0	26,1 - 73,9	98,8	95,8 - 99,8
>-0,09	81,82	48,2 - 97,2	94,94	90,6 - 97,7	16,18	13,8 - 24,1	0,19	0,05 - 0,8	52,9	27,1 - 77,6	98,8	95,8 - 99,8
>-0,11	81,82	48,2 - 97,2	95,51	91,3 - 98,0	18,20	15,7 - 27,5	0,19	0,05 - 0,8	56,2	29,9 - 80,2	98,8	95,9 - 99,8
>-0,13	81,82	48,2 - 97,2	96,07	92,1 - 98,4	20,81	18,3 - 32,1	0,19	0,04 - 0,8	60,0	32,3 - 83,6	98,9	95,9 - 99,8
>-0,155	81,82	48,2 - 97,2	96,63	92,8 - 98,7	24,27	22,0 - 38,5	0,19	0,04 - 0,9	64,3	35,2 - 87,1	98,9	95,9 - 99,8
>-0,21	81,82	48,2 - 97,2	97,19	93,6 - 99,1	29,13	27,5 - 48,1	0,19	0,04 - 0,9	69,2	37,3 - 91,3	98,9	95,9 - 99,8
>-0,2285	81,82	48,2 - 97,2	97,75	94,3 - 99,4	36,41	36,7 - 64,2	0,18	0,03 - 1,0	75,0	42,8 - 94,2	98,9	96,0 - 99,8
>-0,26	81,82	48,2 - 97,2	98,31	95,1 - 99,6	48,55	45,1 - 96,3	0,18	0,03 - 1,2	81,8	46,3 - 97,4	98,9	96,0 - 99,8
>-0,305	81,82	48,2 - 97,2	98,88	96,0 - 99,8	72,82	55,1 - 93,0	0,28	0,05 - 1,5	80,0	42,2 - 97,1	98,3	95,2 - 99,6
>-0,43	72,73	39,1 - 93,7	98,88	96,0 - 99,8	64,73	45,1 - 93,0	0,28	0,05 - 1,5	88,9	48,9 - 97,8	98,3	95,2 - 99,6
>-0,62	72,73	39,1 - 93,7	99,44	96,9 - 99,9	129,45	90,1 - 185,9	0,27	0,03 - 2,4	87,5	44,1 - 97,4	97,8	94,4 - 99,4
>-0,89	63,64	30,9 - 88,8	99,44	96,9 - 99,9	113,27	72,5 - 177,1	0,37	0,04 - 3,0	85,7	42,2 - 97,6	97,3	93,7 - 99,1
>-1,38	54,55	23,5 - 83,1	99,44	96,9 - 99,9	97,09	56,6 - 166,5	0,46	0,06 - 3,6	100,0	54,1 - 100,0	97,3	93,7 - 99,1
>-2,655	54,55	23,5 - 83,1	100,00	97,9 - 100,0					100,0	48,0 - 100,0	96,7	93,0 - 98,8
>-4,29	45,45	16,9 - 76,5	100,00	97,9 - 100,0					100,0	30,5 - 100,0	96,2	92,4 - 98,5
>-6,61	36,36	11,2 - 69,1	100,00	97,9 - 100,0					100,0	30,5 - 100,0	95,7	91,7 - 98,1
>-7,63	27,27	6,3 - 60,9	100,00	97,9 - 100,0					100,0	16,5 - 100,0	95,2	91,1 - 97,8
>-8,92	18,18	2,8 - 51,8	100,00	97,9 - 100,0					100,0	80,1 - 100,0	94,7	90,4 - 97,4
>-9,95	9,09	1,5 - 41,3	100,00	97,9 - 100,0					1,00			
>-11,61	0,00	0,0 - 28,7	100,00	97,9 - 100,0								

Anexo C - Dados gerados pelo programa computacional (MEdCalc v. 10.1.2) com os valores obtidos para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os diferentes valores da dosagem de interferon-gama após a estimulação com antígeno específico.

ROC curve													
Variable		Media_TbAg Media TbAg											
Classification variable		TB											
Select		1											
Positive group													
TB		= 1											
Sample size		11											
Negative group													
TB		= 0											
Sample size		178											
Disease prevalence (%)												5,82	
Area under the ROC curve (AUC)												0,910	
Standard Error												0,0601	
95% Confidence Interval												0,860 to 0,947	
z statistic												6,823	
Significance level P (Area=0.5)												0,0001	
Criterion values and coordinates of the ROC curve [Hide]													
Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI	+PV	95% CI	-PV	95% CI	
>=0	100,00	71,3 - 100,0	0,00	0,0 - 2,1	1,00				5,8	2,9 - 10,2			
>0	100,00	71,3 - 100,0	3,93	1,6 - 7,9	1,04	0,5 - 2,2	0,00		6,0	3,1 - 10,6	100,0	58,9 - 100,0	
>0,005	100,00	71,3 - 100,0	6,18	3,1 - 10,8	1,07	0,6 - 1,9	0,00		6,2	3,1 - 10,8	100,0	71,3 - 100,0	
>0,01	100,00	71,3 - 100,0	10,11	6,1 - 15,5	1,11	0,7 - 1,7	0,00		6,4	3,3 - 11,2	100,0	81,3 - 100,0	
>0,015	100,00	71,3 - 100,0	11,24	7,0 - 16,8	1,13	0,7 - 1,7	0,00		6,5	3,3 - 11,4	100,0	83,0 - 100,0	
>0,02	100,00	71,3 - 100,0	16,85	11,7 - 23,2	1,20	0,9 - 1,7	0,00		6,9	3,5 - 12,0	100,0	88,3 - 100,0	
>0,025	100,00	71,3 - 100,0	21,35	15,6 - 28,1	1,27	1,0 - 1,7	0,00		7,3	3,7 - 12,7	100,0	90,7 - 100,0	
>0,03	90,91	58,7 - 98,5	26,97	20,6 - 34,1	1,24	0,9 - 1,7	0,34	0,05 - 2,2	7,1	3,5 - 12,7	98,0	89,1 - 99,7	
>0,035	90,91	58,7 - 98,5	30,90	24,2 - 38,2	1,32	1,0 - 1,8	0,29	0,05 - 1,9	7,5	3,7 - 13,4	98,2	90,3 - 99,7	
>0,04	90,91	58,7 - 98,5	35,39	28,4 - 42,9	1,41	1,1 - 1,8	0,26	0,04 - 1,7	8,0	3,9 - 14,2	98,4	91,5 - 99,7	
>0,045	90,91	58,7 - 98,5	38,76	31,6 - 46,3	1,48	1,1 - 1,9	0,23	0,04 - 1,5	8,4	4,1 - 14,9	98,6	92,2 - 99,8	
>0,05	90,91	58,7 - 98,5	42,70	35,3 - 50,3	1,59	1,2 - 2,0	0,21	0,03 - 1,4	8,9	4,4 - 15,8	98,7	92,9 - 99,8	
>0,055	90,91	58,7 - 98,5	45,51	38,0 - 53,1	1,67	1,3 - 2,1	0,20	0,03 - 1,3	9,3	4,6 - 16,5	98,8	93,3 - 99,8	
>0,06	90,91	58,7 - 98,5	50,56	43,0 - 58,1	1,84	1,5 - 2,3	0,18	0,03 - 1,2	10,2	5,0 - 18,0	98,9	94,0 - 99,8	
>0,065	90,91	58,7 - 98,5	52,25	44,6 - 59,8	1,90	1,5 - 2,4	0,17	0,03 - 1,1	10,5	5,2 - 18,5	98,9	94,2 - 99,8	
>0,07	90,91	58,7 - 98,5	55,06	47,4 - 62,5	2,02	1,6 - 2,5	0,17	0,03 - 1,1	11,1	5,5 - 19,5	99,0	94,4 - 99,8	
>0,075	90,91	58,7 - 98,5	58,43	50,8 - 65,8	2,19	1,7 - 2,7	0,16	0,02 - 1,0	11,9	5,9 - 20,8	99,0	94,8 - 99,8	
>0,08	90,91	58,7 - 98,5	59,55	52,0 - 66,8	2,25	1,8 - 2,8	0,15	0,02 - 1,0	12,2	6,0 - 21,3	99,1	94,8 - 99,8	
>0,085	90,91	58,7 - 98,5	62,36	54,8 - 69,5	2,42	1,9 - 3,0	0,15	0,02 - 1,0	13,0	6,4 - 22,6	99,1	95,1 - 99,9	
>0,09	90,91	58,7 - 98,5	64,61	57,1 - 71,6	2,57	2,1 - 3,2	0,14	0,02 - 0,9	13,7	6,8 - 23,8	99,1	95,2 - 99,9	
>0,095	90,91	58,7 - 98,5	65,17	57,7 - 72,1	2,61	2,1 - 3,2	0,14	0,02 - 0,9	13,9	6,9 - 24,1	99,1	95,3 - 99,9	
>0,1	90,91	58,7 - 98,5	66,85	59,4 - 73,7	2,74	2,2 - 3,4	0,14	0,02 - 0,9	14,5	7,2 - 25,0	99,2	95,4 - 99,9	
>0,105	90,91	58,7 - 98,5	69,66	62,3 - 76,3	3,00	2,4 - 3,7	0,13	0,02 - 0,9	15,6	7,8 - 26,9	99,2	95,6 - 99,9	
>0,11	90,91	58,7 - 98,5	71,91	64,7 - 78,4	3,24	2,6 - 4,0	0,13	0,02 - 0,8	16,7	8,3 - 28,5	99,2	95,7 - 99,9	
>0,115	90,91	58,7 - 98,5	73,03	65,9 - 79,4	3,37	2,7 - 4,1	0,12	0,02 - 0,8	17,2	8,6 - 29,4	99,2	95,8 - 99,9	
>0,12	90,91	58,7 - 98,5	73,60	66,5 - 79,9	3,44	2,8 - 4,2	0,12	0,02 - 0,8	17,5	8,8 - 29,9	99,2	95,8 - 99,9	
>0,125	90,91	58,7 - 98,5	75,84	68,9 - 81,9	3,76	3,1 - 4,6	0,12	0,02 - 0,8	18,9	9,5 - 32,0	99,3	95,9 - 99,9	
>0,145	90,91	58,7 - 98,5	76,97	70,1 - 82,9	3,95	3,2 - 4,8	0,12	0,02 - 0,8	19,6	9,8 - 33,1	99,3	96,0 - 99,9	
>0,15	90,91	58,7 - 98,5	79,21	72,5 - 84,9	4,37	3,6 - 5,3	0,11	0,02 - 0,8	21,3	10,7 - 35,7	99,3	96,1 - 99,9	
>0,155	90,91	58,7 - 98,5	80,34	73,7 - 85,9	4,62	3,8 - 5,6	0,11	0,02 - 0,8	22,2	11,2 - 37,1	99,3	96,2 - 99,9	
>0,16	90,91	58,7 - 98,5	81,46	75,0 - 86,9	4,90	4,0 - 6,0	0,11	0,02 - 0,7	23,3	11,8 - 38,6	99,3	96,2 - 99,9	
>0,165	90,91	58,7 - 98,5	82,02	75,6 - 87,4	5,06	4,1 - 6,2	0,11	0,02 - 0,7	23,8	11,9 - 39,7	99,3	96,2 - 99,9	
>0,17	90,91	58,7 - 98,5	82,58	76,2 - 87,8	5,22	4,3 - 6,4	0,11	0,02 - 0,7	24,4	12,4 - 40,3	99,3	96,3 - 99,9	
>0,175	90,91	58,7 - 98,5	83,15	76,8 - 88,3	5,39	4,4 - 6,6	0,11	0,02 - 0,7	25,0	12,7 - 41,2	99,3	96,3 - 99,9	
>0,185	90,91	58,7 - 98,5	84,83	78,7 - 89,8	5,99	4,9 - 7,3	0,11	0,02 - 0,7	27,0	13,8 - 44,1	99,3	96,4 - 99,9	
>0,19	81,82	48,2 - 97,2	85,39	79,3 - 90,2	5,60	4,2 - 7,4	0,21	0,06 - 0,8	25,7	12,5 - 43,3	98,7	95,4 - 99,8	
>0,195	81,82	48,2 - 97,2	86,52	80,6 - 91,2	6,07	4,6 - 8,1	0,21	0,06 - 0,8	27,3	13,3 - 45,5	98,7	95,4 - 99,8	
>0,2	81,82	48,2 - 97,2	87,08	81,2 - 91,6	6,33	4,8 - 8,4	0,21	0,06 - 0,8	28,1	13,8 - 46,7	98,7	95,4 - 99,8	
>0,205	81,82	48,2 - 97,2	88,20	82,5 - 92,5	6,94	5,2 - 9,2	0,21	0,06 - 0,8	30,0	14,8 - 49,4	98,7	95,5 - 99,8	
>0,22	81,82	48,2 - 97,2	88,76	83,2 - 93,0	7,28	5,5 - 9,7	0,20	0,05 - 0,8	31,0	15,3 - 50,8	98,8	95,5 - 99,8	
>0,225	81,82	48,2 - 97,2	89,89	84,5 - 93,9	8,09	6,1 - 10,7	0,20	0,05 - 0,8	33,3	16,6 - 54,0	98,8	95,6 - 99,8	
>0,245	81,82	48,2 - 97,2	90,45	85,1 - 94,3	8,57	6,5 - 11,4	0,20	0,05 - 0,8	34,6	17,2 - 55,7	98,8	95,6 - 99,8	
>0,25	81,82	48,2 - 97,2	91,01	85,8 - 94,8	9,10	6,9 - 12,1	0,20	0,05 - 0,8	36,0	17,7 - 57,9	98,8	95,6 - 99,8	
>0,255	81,82	48,2 - 97,2	91,57	86,5 - 95,2	9,71	7,3 - 12,9	0,20	0,05 - 0,8	37,5	18,8 - 59,4	98,8	95,7 - 99,8	
>0,265	81,82	48,2 - 97,2	92,13	87,2 - 95,6	10,40	7,8 - 13,8	0,20	0,05 - 0,8	39,1	19,7 - 61,4	98,8	95,7 - 99,8	
>0,27	81,82	48,2 - 97,2	92,70	87,8 - 96,1	11,20	8,5 - 14,8	0,19	0,05 - 0,8	40,9	20,7 - 63,6	98,8	95,7 - 99,8	
>0,405	81,82	48,2 - 97,2	93,82	89,2 - 96,9	13,24	10,0 - 17,5	0,19	0,05 - 0,8	45,0	23,1 - 68,4	98,8	95,8 - 99,8	
>0,43	72,73	39,1 - 93,7	93,82	89,2 - 96,9	11,77	8,2 - 16,9	0,29	0,09 - 0,9	42,1	19,8 - 67,1	98,2	94,9 - 99,6	
>0,485	72,73	39,1 - 93,7	94,38	89,9 - 97,3	12,95	9,0 - 18,6	0,29	0,09 - 0,9	44,4	21,0 - 69,9	98,2	95,0 - 99,6	
>0,5	72,73	39,1 - 93,7	94,94	90,6 - 97,7	14,38	10,0 - 20,7	0,29	0,09 - 0,9	47,1	22,4 - 72,9	98,3	95,0 - 99,6	
>0,515	72,73	39,1 - 93,7	95,51	91,3 - 98,0	16,18	11,3 - 23,3	0,29	0,09 - 0,9	50,0	23,9 - 76,1	98,3	95,0 - 99,6	
>0,56	72,73	39,1 - 93,7	96,07	92,1 - 98,4	18,49	12,9 - 26,6	0,28	0,08 - 0,9	53,3	25,8 - 79,4	98,3	95,1 - 99,6	
>0,595	72,73	39,1 - 93,7	96,63	92,8 - 98,7	21,58	15,0 - 31,0	0,28	0,08 - 1,0	57,1	28,9 - 82,2	98,3	95,1 - 99,6	
>0,61	72,73	39,1 - 93,7	97,19	93,6 - 99,1	25,89	18,0 - 37,2	0,28	0,08 - 1,0	61,5	30,4 - 86,8	98,3	95,1 - 99,6	
>0,705	72,73	39,1 - 93,7	97,75	94,3 - 99,4	32,36	22,5 - 46,5	0,28	0,07 - 1,1	66,7	33,5 - 90,6	98,3	95,1 - 99,6	
>0,75	72,73	39,1 - 93,7	98,31	95,1 - 99,6	43,15	30,0 - 62,0	0,28	0,06 - 1,2	72,7	37,3 - 94,2	98,3	95,1 - 99,6	
>0,9	72,73	39,1 - 93,7	98,88	96,0 - 99,8	64,73	45,1 - 93,0	0,28	0,05 - 1,5	80,0	42,2 - 97,1	98,3	95,2 - 99,6	
>1,06	63,64	30,9 - 88,8	98,88	96,0 - 99,8	56,64	36,2 - 88,6	0,37	0,08 - 1,8	77,8	37,6 - 96,8	97,8	94,4 - 99,4	
>1,41	54,55	23,5 - 83,1	98,88	96,0 - 99,8	48,55	28,3 - 83,3	0,46	0,1 - 2,1	75,0	35,0 - 96,1	97,2	93,7 - 99,1	
>1,885	54,55	23,5 - 83,1	99,44	96,9 - 99,9	97,09	56,6 - 166,5	0,46	0,06 - 3,6	85,7	42,2 - 97,6	97,3	93,7 - 99,1	

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - -Abadco DL, Steiner P.; Gastric lavage is better than bronchoalveolar lavage for isolation of Mycobacterium tuberculosis in childhood pulmonary tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J*. 1992 Sep;11(9):735-8.

2 - American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention: Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 16: s221-47.

3 - American Thoracic Society: Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1376-95.

4 - Andresen D. Microbiological diagnostic procedures in respiratory infections: mycobacterial infections. *Paediatr Respir Rev*. 2007 Sep;8(3):221-30.

5 - Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, D'Amico R, Meccugni B, Meacci M, De Giovanni D, Rumpianesi F, Fabbri LM, Balli F, Richeldi L. Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics*. 2009 Mar;123(3):e419-24.

6 - Bianchi L, Galli L, Moriondo M, Veneruso G, Becciolini L, Azzari C, Chiappini E, de Martino M. Interferon-gamma release assay improves the

diagnosis of tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Jun;28(6):510-4.

7 - Bierrenbach AL, Cunha SS, Barreto ML, Pereira SM, Dourado I, Ichihara MY, Brito SC, Rodrigues LC. Tuberculin reactivity in a population of schoolchildren with high BCG vaccination coverage. *Rev Panam Salud Publica*. 2003 May;13(5):285-93.

8 - Blanc P, Dubus JC, Garnier JM, Bosdure E, Minodier P. Que faut-il penser des tests sanguins in vitro pour le diagnostic de la tuberculose en pédiatrie? *Arch Pediatr*. 2008 Jan;15(1):75-82.

9 - Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose: Guia de vigilância Epidemiológica. 1ª edição. Brasília. 2002.

10 - Castelo Filho A, Kritiski AL, Barreto AW et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J. bras. pneumol.*, June 2004, vol.30 suppl.1, p.S57-S86. ISSN 1806-3713.

11 - Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo – CVE. Casos notificados de tuberculose no Estado de São Paulo por forma clínica e faixa etária, ano 2007. Disponível no endereço eletrônico : http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/tb_num/tb_cn07.htm (Consultado em 25/05/2009).

12 - Cho SN, Brennan PJ. Tuberculosis: diagnostics. *Tuberculosis* (Edinb). 2007 Aug;87 Suppl 1:S14-7.

13 - Cho SN. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. *Yonsei Med J*. 2007 Jun 30;48(3):347-59.

14 - Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC, Buttery JP. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax*. 2006 Jul;61(7):616-20.

15 - Connell TG, Ritz N, Paxton GA, Buttery JP, Curtis N, Ranganathan SC. A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE*. 2008 Jul 9;3(7):e2624.

16 - Coulter JB. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in young children. *Ann Trop Paediatr*. 2008 Mar;28(1):3-12.

17 - Delacourt C, Poveda JD, Chureau C, Bevdon N, Mahut B et al; Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J Pediatr* 1995; 126:703-709.

18 - Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, Magdorf K. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007 Aug 1;45(3):322-8.

19 - Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, Drobniewski F, Lalvani A. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess*. 2007 Jan;11(3):1-196.

20 - Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, Chaturvedi P, Reingold AL, Colford JM Jr, Riley LW, Pai M. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect*. 2007 Mar;54(3):267-76.

21 - Ferrara G, Losi M, Meacci M, Meccugni B, Piro R, Roversi P, Bergamini BM, D'Amico R, Marchegiano P, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Sep 1;172(5):631-5.

22 - Gómez-Pastrana D, Torronteiras R, Caro P, Anguita ML, Barrio AML, Andrés A, et al. Diagnosis of tuberculosis in children using polymerase chain reaction. *Pediatric Pulmonol* 1999;28:344-51.

23 - Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*. 1993 Dec;17(6):968-75.

24 - Silva JR., Jarbas Barbosa da. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. J. bras. pneumol., June 2004, vol.30 suppl.1, p.S57-S86.

25 - Kampmann B, Whittaker E, Williams A, Walters S, Gordon A, Martinez-Alier N, Williams B, Crook AM, Hutton AM, Anderson ST. Interferon-gamma release assays do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. Eur Respir J. 2009 Jun;33(6):1374-82.

26 - Lalvani A, Millington KA. T cell-based diagnosis of childhood tuberculosis infection. Curr Opin Infect Dis. 2007 Jun;20(3):264-71.

27 - Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. Chest. 2007 Jun;131(6):1898-906.

28 - Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, Peng CH, Pollack H. Latent tuberculosis diagnosis in children by using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test. Pediatrics. 2009 Jan;123(1):30-7.

29 - Lighter J, Rigaud M. Diagnosing childhood tuberculosis: traditional and innovative modalities. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2009 Mar;39(3):61-88.

30 - Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, Bossink A, Magdorf K, Hölscher C, Kampmann B, Arend SM, Detjen A, Bothamley G, Zellweger JP, Milburn H, Diel R, Ravn P, Cobelens F, Cardona PJ, Kan

B, Solovic I, Duarte R, Cirillo DM; C. Lange; TBNET. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. Eur Respir J. 2009 May;33(5):956-73.

31 - Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, et al. the natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8 (3): 286-98.

32 - Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Beyers N, Donald PR, Starke JR. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. Am J Respir Crit Care Med. 2006 May 15;173(10):1078-90.

33 - Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A; Division of Tuberculosis Elimination, National Center for HIV, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. MMWR Recomm Rep. 2005 Dec 16;54(RR-15):49-55.

34 - Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. Ann Intern Med. 2007 Mar 6;146(5):340-54.

35 - Newton SM, Brent AJ, Anderson S, Whittaker E, Kampmann B. Paediatric tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2008 Aug;8(8):498-510.

36 - Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 Apr;22(2):174-82.

37 - Pai M, Riley LW, Colford J; Interfero-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Inf Dis* 2004 (4): 761-776.

38 - Pai M, Zwerling A, Menzies D; Systematic review: T-Cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Ann Intern Med*. 2008;149:177-184.

39 - Petrucci R, Abu Amer N, Gurgel RQ, Sherchand JB, Doria L, Lama C, Ravn P, Ruhwald M, Yassin M, Harper G, Cuevas LE. Interferon gamma, interferon-gamma-induced-protein 10, and tuberculin responses of children at high risk of tuberculosis infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Dec;27(12):1073-7.

40 - Sant'Anna, CC, Mourgues LV, Ferrero F, Balançar AM; Diagnóstico e terapêutica da tuberculose infantil – uma visão atualizada de um antigo problema. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78 (Supl. 2): S205-S214.

41 - Sant'Anna CC, Orfaliais CT, March Mde F, Conde MB. Evaluation of a proposed diagnostic scoring system for pulmonary tuberculosis in Brazilian children. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Apr;10(4):463-5.

42 - Sant'Anna CC, Orfalais CTS, March MFBP. A retrospective evaluation of a score system adopted by the Ministry of Health, Brazil, in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in childhood: a case control study. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2003; 45: 103-105.

43 - Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis.* 2003 Oct;3(10):624-32.

44 - Singh M, Moosa NV, Kumar L, Sharma M.; Role of gastric lavage and broncho-alveolar lavage in the bacteriological diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis. *Indian Pediatr.* 2000 Sep;37(9):947-51.

45 - Singh V. TB in developing countries: diagnosis and treatment. *Paediatr Respir Rev.* 2006;7 Suppl 1:S132-5.

46 - Smith KC, Starke JR, Eisenach K, Ong LD, Denby M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. *Pediatrics* 1996;97:155-60.

47 - Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med.* 2007 Jun;4(6):e202.

48 - Thwaites GE, Tran TH. Tuberculous meningitis: many questions, too few answers. *Lancet Neurol*. 2005 Mar;4(3):160-70.

49 - Trajman A, Pai M, Dheda K, van Zyl Smit R, Zwerling AA, Joshi R, Kalantri S, Daley P, Menzies D. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *Eur Respir J*. 2008 May;31(5):1098-106.

50 - Tsiouris SJ, Austin J, Toro P, Coetzee D, Weyer K, Stein Z, El-Sadr WM. Results of a tuberculosis-specific IFN-gamma assay in children at high risk for tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Aug;10(8):939-41.

51 - Van Dyck P, Vanhoenacker FM, Van den Brande P, De Schepper AM. Imaging of pulmonary tuberculosis. *Eur Radiol*. 2003 Aug;13(8):1771-85.

52 - WHO Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing. WHO Report 2009. Disponível no endereço eletrônico : http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf (Consultado em 25/05/2009).

53 - Woods CR. Advances in diagnosis and therapy of childhood tuberculosis. *Paediatr Respir Rev*. 2006;7 Suppl 1:S130-1.

54 - Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swinger G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary

tuberculosis in infants and young children: a prospective study. Lancet. 2005 Jan 8-14;365(9454):130-4.

55 - Zar HJ, Tannenbaum E, Apolles P, Roux P, Hanslo D, Hussey G.; Sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in infants and young children in an urban setting in South Africa. Arch Dis Child. 2000 Apr;82(4):305-8.

APÊNDICES

QuantiFERON®-TB Gold (In-Tube Method)

The Whole Blood IFN-gamma Test
Measuring Responses to
ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p.4) Peptide Antigens

PACKAGE INSERT

For *In Vitro* Diagnostic Use

INDEX

1. INTENDED USE	2
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	2
Principles of the Assay	4
Time Required for Performing Assay	4
3. REAGENTS AND STORAGE	5
Materials Required (but not provided)	5
Storage Instructions	6
Blood Collection Tubes	6
Kit Reagents	6
Reconstituted and Unused Reagents	6
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	7
Warnings	7
Precautions	8
5. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	9
6. DIRECTIONS FOR USE	10
STAGE ONE - Incubation of Blood and Harvesting of Plasma	10
STAGE TWO - Human IFN-γ ELISA	11
7. CALCULATIONS AND TEST INTERPRETATION	16
Generation of Standard Curve	16
Quality Control of Test	17
Interpretation of Results	18
8. LIMITATIONS	22
9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
10. TECHNICAL INFORMATION	25
Indeterminate Results	25
Clotted Plasma Samples	26
ELISA Trouble Shooting	26
Non-specific Colour Development	26
Low Optical Density Readings for Standards	27
High Background	28
Non-linear Standard Curve and Duplicate Variability	28
11. BIBLIOGRAPHY	29
12. TECHNICAL SERVICE	31
13. ABBREVIATED TEST PROCEDURE	32

1. INTENDED USE

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) is an *in vitro* diagnostic test using a peptide cocktail simulating ESAT-6, CFP-10 and TB7.7(p4) proteins to stimulate cells in heparinised whole blood. Detection of interferon- γ (IFN- γ) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is used to identify *in vitro* responses to these peptide antigens that are associated with *Mycobacterium tuberculosis* infection.

QuantiFERON®-TB Gold IT is an indirect test for *M. tuberculosis* infection (including disease) and is intended for use in conjunction with risk assessment, radiography and other medical and diagnostic evaluations.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Tuberculosis is a communicable disease caused by infection with *M. tuberculosis* complex organisms (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), which typically spreads to new hosts via airborne droplet nuclei from patients with respiratory tuberculosis disease. A newly infected individual can become ill from tuberculosis within weeks to months, but most infected individuals remain well. Latent tuberculosis infection (LTBI), a non-communicable asymptomatic condition, persists in some, who might develop tuberculosis disease months or years later. The main purpose of diagnosing LTBI is to consider medical treatment for preventing tuberculosis disease. Until recently the tuberculin skin test (TST) was the only available method for diagnosing LTBI. Cutaneous sensitivity to tuberculin develops from 2 to 10 weeks after infection. However, some infected individuals, including those with a wide range of conditions hindering immune functions, but also others without these conditions, do not respond to tuberculin. Conversely, some individuals who are unlikely to have *M. tuberculosis* infection exhibit sensitivity to tuberculin and have positive TST results after vaccination with bacille Calmette-Guérin (BCG), infection with mycobacteria other than *M. tuberculosis* complex, or undetermined other factors.

LTBI must be distinguished from tuberculosis disease, a reportable condition which usually involves the lungs and lower respiratory tract, although other organ systems may also be affected. Tuberculosis disease is diagnosed from historical, physical, radiological, histological, and mycobacteriological findings.

The QuantiFERON®-TB Gold IT test is a test for Cell Mediated Immune (CMI) responses to peptide antigens that simulate mycobacterial proteins. These proteins, ESAT-6, CFP-10 and TB7.7(p4), are absent from all BCG strains and from most non-tuberculosis mycobacteria with the exception of *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*.¹ Individuals infected with *M. tuberculosis* complex organisms usually have lymphocytes in their blood that recognise these and other mycobacterial antigens. This recognition process involves the generation and secretion of the cytokine, IFN- γ . The detection and subsequent quantification of IFN- γ forms the basis of this test.

The antigens used in QuantiFERON®-TB Gold IT are a peptide cocktail simulating the proteins ESAT-6, CFP-10 and TB7.7(p4). Numerous studies have demonstrated that these peptides antigens stimulate IFN- γ responses in T-cells from individuals infected with *M. tuberculosis* but generally not from uninfected or BCG vaccinated persons without disease or risk for LTBI.¹⁻³ However, medical treatments or conditions that impair immune functionality can potentially reduce IFN- γ responses. Patients with certain other mycobacterial infections might also be responsive to ESAT-6, CFP-10 and TB7.7(p4) as the genes encoding these proteins are present in *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*.^{1,2} The QuantiFERON®-TB Gold IT test is both a test for LTBI and a helpful aid for diagnosing *M. tuberculosis* complex infection in sick patients. A positive result supports the diagnosis of tuberculosis disease; however, infections by other mycobacteria (e.g., *M. kansasii*) could also lead to positive results. Other medical and diagnostic evaluations are necessary to confirm or exclude tuberculosis disease.

Principles of the Assay

The QuantiFERON®-TB Gold IT system uses specialised blood collection tubes, which are used to collect whole blood. Incubation of the blood occurs in the tubes for 16 to 24 hours, after which, plasma is harvested and tested for the presence of IFN- γ produced in response to the peptide antigens.

The QuantiFERON®-TB Gold IT test is performed in two stages. First, whole blood is collected into each of the QuantiFERON®-TB Gold blood collection tubes, which include a Nil Control tube, TB Antigen tube, and an optional Mitogen tube.

The Mitogen tube can be used with the QuantiFERON®-TB Gold IT test as a positive control. This may be especially warranted where there is doubt as to the individual's immune status. The Mitogen tube also serves as a control for correct blood handling and incubation.

The tubes should be incubated at 37°C as soon as possible, and within 16 hours of collection. Following a 16 to 24 hour incubation period, the tubes are centrifuged, the plasma is removed and the amount of IFN- γ (IU/mL) measured by ELISA.

A test is considered positive for an IFN- γ response to the TB Antigen tube that is significantly above the Nil IFN- γ IU/mL value. If used, the Mitogen-stimulated plasma sample serves as an IFN- γ positive control for each specimen tested. A low response to Mitogen (<0.5 IU/mL) indicates an indeterminate result when a blood sample also has a negative response to the TB antigens. This pattern may occur with insufficient lymphocytes, reduced lymphocyte activity due to improper specimen handling, incorrect filling/mixing of the Mitogen tube, or inability of the patient's lymphocytes to generate IFN- γ . The Nil sample adjusts for background, heterophile antibody effects, or non-specific IFN- γ in blood samples. The IFN- γ level of the Nil tube is subtracted from the IFN- γ level for the TB Antigen tube and Mitogen tube (if used).

Time Required for Performing Assay

The time required to perform the QuantiFERON®-TB Gold IT assay is estimated below; the time of testing multiple samples when batched is also indicated:

37°C Incubation of blood tubes: 16-24 hours

ELISA: Approx. 3 hours for one ELISA plate
(28 to 44 individuals)
• <1 hour labor
• Add 10-15 minutes for each extra plate

3. REAGENTS AND STORAGE

Tuberculosis and Control Antigen Blood Collection Tubes Catalogue Number: 0590 0301

1. Nil Control (Grey cap)	100 x tubes
2. TB Antigen (Red cap)	100 x tubes
3. Mitogen Control (Purple cap)	100 x tubes

NOTE: Tubes are also available in other configurations:

*100 x Nil Control, 100 x TB Antigen tubes (Cat. No. 0590 0201)
100 x Mitogen Control tubes (Cat. No. 0593 0201)*

ELISA Components – Catalogue Number: 0594 0201

1. Microplate strips	24 x 8 well
2. Human IFN- γ Standard, lyophilised	1 x vial
3. Green Diluent	1 x 30mL
4. Conjugate 100X Concentrate, lyophilised	1 x 0.3mL
5. Wash Buffer 20X Concentrate	1 x 100mL
6. Enzyme Substrate Solution	1 x 30mL
7. Enzyme Stopping Solution	1 x 15mL

Materials Required (but not provided)

- 37°C incubator. CO₂ not required.
- Calibrated variable-volume pipettes for delivery of 10 μ L to 1000 μ L with disposable tips.
- Calibrated multichannel pipette capable of delivering 50 μ L and 100 μ L with disposable tips.
- Microplate shaker.
- Deionised or distilled water - 2L.
- Microplate washer (automated washer recommended).
- Microplate reader fitted with 450nm filter and 620nm to 650nm reference filter.

Storage Instructions

Blood Collection Tubes

- Store blood collection tubes at 4°C to 25°C.
- The shelf life of the QuantiFERON®-TB Gold blood collection tubes is 15 months from the date of manufacture when stored at 4°C to 25°C.

Kit Reagents

- Store kit refrigerated at 2°C to 8°C.
- Always protect Enzyme Substrate Solution from direct sunlight.
- The shelf life of the QuantiFERON®-TB Gold ELISA kit is 3 years from the date of manufacture when stored at 2°C to 8°C.

Reconstituted and Unused Reagents

For instructions on how to reconstitute the reagents, please see Section 6 (page 11).

- The reconstituted Kit Standard may be kept for up to 3 months if stored at 2°C to 8°C.
 - *Note the date the Kit Standard was reconstituted.*
- Once reconstituted, unused Conjugate 100X concentrate must be returned to storage at 2°C to 8°C and must also be used within 3 months.
 - *Note the date the Conjugate was reconstituted.*
- Working strength Conjugate must be used within 6 hours of preparation.
- Working strength Wash Buffer may be stored at room temperature for up to 2 weeks.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Warnings

- A negative QuantiFERON®-TB Gold IT result does not preclude the possibility of *M. tuberculosis* infection or tuberculosis disease: false-negative results can be due to stage of infection (e.g., specimen obtained prior to the development of cellular immune response), co-morbid conditions which affect immune functions, incorrect handling of the blood collection tubes following venepuncture, incorrect performance of the assay, or other immunological variables.
- A positive QuantiFERON®-TB Gold IT result should not be the sole or definitive basis for determining infection with *M. tuberculosis*. Incorrect performance of the assay may cause false positive responses.
- A positive QuantiFERON®-TB Gold IT result should be followed by further medical evaluation and diagnostic evaluation for active tuberculosis disease (e.g., AFB smear and culture, chest x-ray).
- While ESAT-6, CFP-10 and TB7.7(p4) are absent from all BCG strains and from most known non-tuberculous mycobacteria, it is possible that a positive QuantiFERON®-TB Gold IT result may be due to infection by *M. kansasii*, *M. szulgai* or *M. marinum*. If such infections are suspected, alternative tests should be investigated.

Precautions

- For in vitro diagnostic use.
- **Harmful: Enzyme Substrate Solution** contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine that is harmful by ingestion, inhalation and skin contact. Skin and eye irritant. Mutagen. Use eye protection, wear gloves and handle as a potential carcinogen.
- **Harmful: Enzyme Stopping Solution** contains H₂SO₄ that is harmful by ingestion, eye contact, skin contact, and inhalation. Use eye protection, wear gloves and normal laboratory protective clothing. If the stopping solution contacts the skin or eyes, flush with copious quantities of water and seek medical attention.
- **Harmful: IFN-γ Standard and Conjugate 100X Concentrate** may be discomforting if ingested and may cause skin irritation. Wear gloves and normal laboratory protective clothing.
- **Handle human blood as if potentially infectious.** Observe relevant blood handling guidelines.
- **Thimerosal** is used as a preservative in some reagents. It may be toxic upon ingestion, inhalation or skin contact.
- **Green Diluent** contains normal mouse serum and casein, which may trigger allergic responses; avoid contact with skin.
- Deviations from the directions for use in the Package Insert may yield erroneous results. Please read the instructions carefully before use.
- Do not use kit if any reagent bottle shows signs of damage or leakage prior to use.
- Do not mix or use ELISA reagents from other QuantiFERON®-TB Gold kit batches.
- Discard unused reagents and biological samples in accordance with Local, State, and Federal regulations.
- Do not use the blood collection tubes or ELISA kit after the expiry date.

5. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

QuantiFERON®-TB Gold IT uses the following collection tubes:

1. Nil Control (Grey cap).
2. TB Antigen (Red cap).
3. Mitogen Control (Purple cap) (optional).

Antigens have been dried onto the inner wall of the blood collection tubes so it is essential that the contents of the tubes be thoroughly mixed with the blood. The tubes must be transferred to a 37°C incubator as soon as possible and within 16 hours of collection.

The following procedures should be followed for optimal results:

1. For each subject collect 1mL of blood by venepuncture directly into each of the QuantiFERON®-TB Gold IT blood collection tubes.
 - As 1mL tubes draw blood relatively slowly, keep the tube on the needle for 2-3 seconds once the tube appears to have completed filling, to ensure that the correct volume is drawn.

The black mark on the side of the tubes indicates the 1mL fill volume. QuantiFERON®-TB Gold blood collection tubes have been validated for volumes ranging from 0.8 to 1.2mL. If the level of blood in any tube is not close to the indicator line, it is recommended to obtain another blood sample.
 - If a "butterfly needle" is being used to collect blood, a "purge" tube should be used to ensure that the tubing is filled with blood prior to the QuantiFERON®-TB Gold tubes being used.
2. Mix by vigorously shaking the tubes up and down 10 times to ensure that the entire inner surface of the tube has been coated with blood.
 - Thorough mixing is required to ensure complete mixing of the blood with the tube's contents.
3. Label tubes appropriately.
4. The tubes must be transferred to a 37°C incubator as soon as possible, and within 16 hours of collection. Do not refrigerate or freeze the blood samples.
 - If the blood is not incubated immediately after collection, mixing of the tubes must be repeated immediately prior to incubation.

6. DIRECTIONS FOR USE

Stage One – Incubation of Blood and Harvesting of Plasma

Materials Provided

QuantiFERON®-TB Gold IT blood collection tubes (Refer to Section 3).

Materials Required (but not provided)

Refer to Section 3.

Procedure

1. If the blood is not incubated immediately after collection, **mixing of the tubes must be repeated immediately prior to incubation**, as described in Section 5.
2. Incubate the tubes **UPRIGHT** at 37°C for 16 to 24 hours. The incubator does not require CO₂ or humidification.
3. After incubation at 37°C, blood collection tubes may be held between 2°C and 27°C for up to 3 days prior to centrifugation.
4. After incubation of the tubes at 37°C, harvesting of plasma is facilitated by centrifuging tubes for 15 minutes at 2000 to 3000 RCF (g). The gel plug will separate the cells from the plasma. If this does not occur, the tubes should be re-centrifuged at a higher speed.
 - It is possible to harvest the plasma without centrifugation, however, additional care is required to remove the plasma without disturbing the cells.
5. Plasma samples can be loaded directly from blood collection tubes into the QuantiFERON®-TB Gold ELISA plate, especially when automated ELISA workstations are being used.
6. Alternatively, plasma samples can be stored prior to ELISA, either in the centrifuged tubes or collected into plasma storage containers. For example, harvest >150µL into microplate wells or racked microtubes in 96 well format and sealed to prevent spills and evaporation if samples are to be stored.
 - Plasma samples can be stored for up to 4 weeks at 2°C to 8°C or below –20°C (preferably less than –70°C) for extended periods.

Stage Two - Human IFN-γ ELISA

Materials Provided

QuantiFERON®-TB Gold ELISA kit (Refer to Section 3).

Materials Required (but not provided)

Refer to Section 3.

Procedure

1. All plasma samples and reagents, except for Conjugate 100X Concentrate, must be brought to room temperature (22°C ± 5°C) before use. Allow at least 60 minutes for equilibration.
2. Remove strips that are not required from the frame, reseal in the foil pouch, and return to the refrigerator for storage until required.

Allow at least one strip for the QuantiFERON®-TB Gold Standards and sufficient strips for the number of subjects being tested (refer to Figures 2A & 2B for 2-tube and 3-tube formats, respectively). After use, retain frame and lid for use with remaining strips.

3. Reconstitute the freeze dried Kit Standard with the volume of deionised or distilled water indicated on the label of the Standard vial. Mix gently to minimise frothing and ensure complete solubilisation. Reconstitution of the Standard to the stated volume will produce a solution with a concentration of 8.0 IU/mL.

Note: The reconstitution volume of the Kit Standard will differ between batches.

Use the reconstituted Kit Standard to produce a 1 in 4 dilution series of IFN-γ in Green Diluent (GD) – refer to Figure 1. S1 (Standard 1) contains 4 IU/mL, S2 (Standard 2) contains 1 IU/mL, S3 (Standard 3) contains 0.25 IU/mL, and S4 (Standard 4) contains 0 IU/mL (GD alone). The standards should be assayed at least in duplicate.

RECOMMENDED PROCEDURE FOR DUPLICATE STANDARDS	RECOMMENDED PROCEDURE FOR TRIPLICATE STANDARDS
a. Label 4 tubes "S1", "S2", "S3", "S4". b. Add 150µL of GD to S1, S2, S3, S4. c. Add 150µL of the Kit Standard to S1 and mix thoroughly. d. Transfer 50µL from S1 to S2 and mix thoroughly. e. Transfer 50µL from S2 to S3 and mix thoroughly. f. GD alone serves as the zero standard (S4).	a. Label 4 tubes "S1", "S2", "S3", "S4". b. Add 150µL of GD to S1. c. Add 210µL of GD to S2, S3, S4. d. Add 150µL of the Kit Standard to S1 and mix thoroughly. e. Transfer 70µL from S1 to S2 and mix thoroughly. f. Transfer 70µL from S2 to S3 and mix thoroughly. g. GD alone serves as the zero standard (S4).

FIGURE 1. Preparation of Standard Curve

- Prepare fresh dilutions of the Kit Standard for each ELISA session.
4. Reconstitute freeze dried Conjugate 100X Concentrate with 0.3mL of deionised or distilled water. Mix gently to minimize frothing and ensure complete solubilisation of the Conjugate.
- Working Strength conjugate is prepared by diluting the required amount of reconstituted Conjugate 100X Concentrate in Green Diluent as set out in Table 1 - Conjugate Preparation.

TABLE 1. Conjugate Preparation

NUMBER OF STRIPS	VOLUME OF CONJUGATE 100X CONCENTRATE	VOLUME OF GREEN DILUENT
2	10µL	1.0mL
3	15µL	1.5mL
4	20µL	2.0mL
5	25µL	2.5mL
6	30µL	3.0mL
7	35µL	3.5mL
8	40µL	4.0mL
9	45µL	4.5mL
10	50µL	5.0mL
11	55µL	5.5mL
12	60µL	6.0mL

- Mix thoroughly but gently to avoid frothing.
 - Return any unused Conjugate 100X Concentrate to 2°C to 8°C immediately after use.
 - Use only Green Diluent.
5. Prior to assay, plasmas should be mixed to ensure that IFN-γ is evenly distributed throughout the sample.
6. Add 50µL of freshly prepared Working Strength conjugate to the required ELISA wells using a multichannel pipette.
7. Add 50µL of test plasma samples to appropriate wells using a multichannel pipette (Refer to recommended plate layout below – Figures 2A & 2B). Finally, add 50µL each of the Standards 1 to 4.

FIGURE 2A. Recommended Sample Layout for Nil & TB Antigen Tubes
(44 tests per plate)

Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	5N	9N	13N	17N	S1	S1	25N	29N	33N	37N	41N
B	1A	5A	9A	13A	17A	S2	S2	25A	29A	33A	37A	41A
C	2N	6N	10N	14N	18N	S3	S3	26N	30N	34N	38N	42N
D	2A	6A	10A	14A	18A	S4	S4	26A	31A	34A	38A	42A
E	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	32N	35N	39N	43N
F	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	32A	35A	39A	43A
G	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	33N	36N	40N	44N
H	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	33A	36A	40A	44A

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Sample 1. Nil Control plasma); 1A (Sample 1. TB Antigen plasma).

FIGURE 2B. Recommended Sample Layout for Nil, TB Antigen & Mitogen Tubes
(28 tests per plate)

Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Sample 1. Nil Control plasma); 1A (Sample 1. TB Antigen plasma); 1M (Sample 1. Mitogen Control plasma).

- Mix the conjugate and plasma samples/standards thoroughly using a microplate shaker for 1 minute.
- Cover each plate with a lid and incubate at room temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) for 120 ± 5 minutes.
 - Plates should not be exposed to direct sunlight during incubation.
- During the incubation, dilute one part Wash Buffer 20X Concentrate with 19 parts deionised or distilled water and mix thoroughly. Sufficient Wash Buffer 20X Concentrate has been provided to prepare 2L of Working Strength wash buffer.

Wash wells with 400 μL of Working Strength wash buffer for at least 6 cycles. An automated plate washer is recommended.

 - Thorough washing is very important to the performance of the assay. Ensure each well is **completely filled** with wash buffer to the top of the well for each wash cycle. A soak period of at least 5 seconds between each cycle is recommended.
 - Standard laboratory disinfectant should be added to the effluent reservoir, and established procedures followed for the decontamination of potentially infectious material.
- Tap plates face down on absorbent towel to remove residual wash buffer. Add 100 μL of Enzyme Substrate Solution to each well and mix thoroughly using a microplate shaker.
- Cover each plate with a lid and incubate at room temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) for 30 minutes.
 - Plates should not be exposed to direct sunlight during incubation.
- Following the 30 minute incubation, add 50 μL of Enzyme Stopping Solution to each well and mix.
 - Enzyme Stopping Solution should be added to wells in the same order and at approximately the same speed as the substrate in step 11.
- Measure the Optical Density (OD) of each well within 5 minutes of stopping the reaction using a microplate reader fitted with a 450nm filter and with a 620nm to 650nm reference filter. OD values are used to calculate results.

7. CALCULATIONS AND TEST INTERPRETATION

QuantiFERON®-TB Gold IT Analysis Software, used to analyse raw data and calculate results, is available from Cellestis.

The software performs a Quality Control assessment of the assay, generates a standard curve and provides a test result for each subject, as detailed in the Interpretation of Results section.

As an alternative to using the QuantiFERON®-TB Gold IT Analysis Software, results can be determined according to the following method:

Generation of Standard Curve

(if QuantiFERON®-TB Gold Analysis Software is not used)

Determine the mean OD values of the Kit Standard replicates on each plate.

Construct a $\log_{10}$ - $\log_{10}$ standard curve by plotting the $\log_{10}$ of the mean OD (y-axis) against the $\log_{10}$ of the IFN- γ concentration of the standards in IU/mL (x-axis), omitting the zero standard from these calculations. Calculate the line of best fit for the standard curve by regression analysis.

Use the standard curve to determine the IFN- γ concentration (IU/mL) for each of the test plasma samples, using the OD value of each sample.

These calculations can be performed using software packages available with microplate readers, and standard spreadsheet or statistical software (such as Microsoft Excel). It is recommended that these packages be used to calculate the regression analysis, the coefficient of variation (%CV) for the standards, and the correlation coefficient (r) of the standard curve.

Quality Control of Test

The accuracy of test results is dependent on the generation of an accurate standard curve. Therefore, results derived from the standards must be examined before test sample results can be interpreted.

For the ELISA to be valid:

- The mean OD value for Standard 1 must be ≥ 0.600 .
- The %CV for Standard 1 and Standard 2 replicate OD values must be $\leq 15\%$.
- Replicate OD values for Standard 3 and Standard 4 must not vary by more than 0.040 optical density units from their mean.
- The correlation coefficient (r) calculated from the mean absorbance values of the standards must be ≥ 0.98 .

The QuantiFERON®-TB Gold Analysis Software calculates and reports these quality control parameters.

If the above criteria are not met the run is invalid and must be repeated.

- The mean OD value for the Zero Standard (Green Diluent) should be ≤ 0.150 . If the mean OD value is > 0.150 the plate washing procedure should be investigated.

Interpretation of Results

QuantIFERON®-TB Gold IT results are interpreted using the following criteria:

NOTE: Diagnosing or excluding tuberculosis disease, and assessing the probability of LTBI, requires a combination of epidemiological, historical, medical, and diagnostic findings that should be taken into account when interpreting QuantIFERON®-TB Gold IT results.

WHEN ONLY NIL & TB ANTIGEN TUBES USED

Nil [IU/mL]	TB Antigen minus Nil [IU/mL]	QuantIFERON®-TB [IU/mL]	Report/Interpretation
≤ 8.0	< 0.35	Negative	<i>M. tuberculosis</i> infection NOT likely
	≥ 0.35 and < 25% of Nil value		
	≥ 0.35 and ≥ 25% of Nil value	Positive ¹	<i>M. tuberculosis</i> infection likely
> 8.0 ²	Any	Indeterminate ³	Results are indeterminate for TB Antigen responsiveness

¹ Where *M. tuberculosis* infection is not suspected, initially positive results can be confirmed by retesting the original plasma samples in duplicate in the QuantIFERON®-TB Gold ELISA. If repeat testing of one or both replicates is positive, the individual should be considered test positive.

² In clinical studies, less than 0.25% of subjects had IFN-γ levels of > 8.0 IU/mL for the Nil Control.

³ Refer to Trouble Shooting section for possible causes.

The magnitude of the measured IFN-γ level cannot be correlated to stage or degree of infection, level of immune responsiveness, or likelihood for progression to active disease.

FIGURE 3. Interpretation Flow Diagram when NIL & TB ANTIGEN tubes used

WHEN NIL, TB ANTIGEN AND MITOGEN TUBES USED

Nil [IU/mL]	TB Antigen minus Nil [IU/mL]	Mitogen minus Nil [IU/mL] ¹	QuantIFERON®-TB [IU/mL]	Report/Interpretation
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	Negative	<i>M. tuberculosis</i> infection NOT likely
	≥ 0.35 and < 25% of Nil value	≥ 0.5		
	≥ 0.35 and ≥ 25% of Nil value	Any	Positive ²	<i>M. tuberculosis</i> infection likely
	< 0.35	< 0.5	Indeterminate ³	Results are indeterminate for TB-Antigen responsiveness
	≥ 0.35 and < 25% of Nil value	< 0.5		
> 8.0 ⁴	Any	Any		

¹ Responses to the Mitogen positive control (and occasionally TB Antigen) can be commonly outside the range of the microplate reader. This has no impact on test results.

² Where *M. tuberculosis* infection is not suspected, initially positive results can be confirmed by retesting the original plasma samples in duplicate in the QuantiFERON®-TB Gold ELISA. If repeat testing of one or both replicates is positive, the individual should be considered test positive.

³ Refer to Trouble Shooting section for possible causes.

⁴ In clinical studies, less than 0.25% of subjects had IFN-γ levels of > 8.0 IU/mL for the Nil Control.

The magnitude of the measured IFN-γ level cannot be correlated to stage or degree of infection, level of immune responsiveness, or likelihood for progression to active disease.

FIGURE 4. Interpretation Flow Diagram when NIL, TB ANTIGEN & MITOGEN tubes used

8. LIMITATIONS

Results from QuantiFERON®-TB Gold IT testing must be used in conjunction with each individual's epidemiological history, current medical status, and other diagnostic evaluations.

Individuals with Nil values greater than 8 IU/mL are classed as "indeterminate" because a 25% higher response to the TB Antigens may be outside the assay measurement range.

Unreliable or indeterminate results may occur due to:

- Deviations from the procedure described in the Package Insert,
- Excessive levels of circulating IFN- γ or presence of heterophile antibodies,
- Longer than 16 hours from blood specimen drawing to incubation at 37°C.

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical Studies

As there is no definitive standard for latent tuberculosis infection (LTBI), an estimate of sensitivity and specificity for QuantiFERON®-TB Gold IT cannot be practically evaluated. Specificity of QuantiFERON®-TB Gold IT was approximated by evaluating false positive rates in the persons with low risk (no known risk factors) of tuberculosis infection. Sensitivity was approximated by evaluating groups of patients with culture-confirmed active TB disease.

Specificity

In a U.S. study involving 866 volunteers, blood was drawn for QuantiFERON®-TB Gold IT when a TST was placed. Demographic information and risk factors for TB were determined using a standard survey at the time of testing. Of 432 volunteers with no known risk factors for *M. tuberculosis* infection, QuantiFERON®-TB Gold IT and TST results were available for 391. None were BCG vaccinated. A second specificity study was performed with QuantiFERON®-TB Gold IT in low risk individuals in Japan, approximately 90% who had received BCG vaccination. Results from both the specificity studies are shown in Table 2.

TABLE 2. QuantiFERON®-TB Gold IT specificity: Results for persons with no reported risk for *M. tuberculosis* infection.

STUDY	BCG Status % Vaccinated	Total tested	No. QFT-G Indeterminate	No. QFT-G Positive / No. Valid Tests	QFT-G Specificity (95% CI)	No. TST Positive / No. Tested	TST* Specificity (95% CI)
USA (unpublished)	0%	391	1	3 / 390	99.2% (97.6-99.8)	6 / 391	98.5% (96.5-99.4)
Japan (unpublished)	~90%	190	4	3 / 186	98.4% (95-99.6)	—	—
TOTAL		581	5 / 584 (0.9%)	6 / 576	99.0%	—	—

*Using a 10mm TST cut off. TST specificity estimate is 99.1% if using a 15mm cut off.

Sensitivity for active TB

TB-suspects from Australia and Japan who were subsequently confirmed to have *M. tuberculosis* infection by culture were tested to evaluate sensitivity of QuantiFERON®-TB Gold IT. While there is no definitive standard test for latent tuberculosis infection (LTBI), a suitable surrogate is microbiological culture of *M. tuberculosis* since patients with disease are by definition infected. The patients had received less than 8 days of treatment prior to collecting blood for QuantiFERON®-TB Gold IT testing.

Table 3 summarizes findings from the two groups of *M. tuberculosis* culture positive patients. Overall sensitivity of QuantiFERON®-TB Gold IT for active TB disease was 89% (48/54).

TABLE 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Subjects with culture-confirmed *M. tuberculosis* infection.

STUDY		Disease Confirmed By	No. QFT-Gold Positive / No. Valid Tests	QFT-Gold Sensitivity (95% CI)
Japan TB Patients Validation study		Culture	24 / 27	89% (72-96%)
Australian TB Patients Validation Study	Pulmonary	Culture	7 / 10	70% (40-89%)
	Extra-Pulmonary		17 / 17	100% (82-100%)
TOTAL			48 / 54	89% (78-95%)

Diagnosis of LTBI

A number of studies have been published which demonstrate the performance of QuantiFERON®-TB Gold IT in various populations at risk of LTBI. The principle findings of some selected studies are shown in Table 4.

TABLE 4. Selected published studies on QuantiFERON®-TB Gold IT in populations at risk of LTBI.

STUDY	Total tested	Outcomes and Findings
Indian HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁷	726	Setting of very high TB rates. 40% QFT-Gold IT positive of 41% TST positive at 10mm. High concordance with TST, no effect of BCG on either test. Both tests related to risk factors of age and period of work in healthcare.
Danish HIV (Brook <i>et al</i> 2006) ²⁸	590	Overall prevalence of LTBI by QFT-Gold IT was 4.6% (27/590) in HIV+ persons. Positive results were associated with TB risks. Two QFT-Gold IT positive subjects progressed to active TB within one year. Indeterminate responses (n=20, 3.4%) were significantly associated with a CD4 count <100 / μ L.
Hospitalized Children (Dogra <i>et al</i> 2006) ²⁹	105	Children in whom TB was suspected or had a history of TB contact were tested with QFT-Gold IT and TST. 10.5% QFT-Gold IT positive of 9.5% TST positive at 10mm. Agreement between tests was 95.2% overall and 100% in non-BOG vaccinated.
German Contacts (Diel <i>et al</i> 2006) ³⁰	309	Close contacts of 15 different index cases were tested. 51% were BOG vaccinated, 27% foreign born. 70% of BOG-vaccinates and 18% of non-vaccinated were TST positive (5mm), whereas 9% and 11% were QFT-Gold IT positive, respectively. QFT-Gold IT was associated with TB risk. TST was only associated with BOG-vaccination.

Many more publications describe the performance of the less-sensitive liquid antigen version of QuantiFERON®-TB Gold (the precursor to QuantiFERON®-TB Gold IT) and the QuantiFERON®-TB Gold IT test. These studies include use of the test(s) in contacts of active TB cases^{7,8,10,12,14,17,20,22}, children^{10,21,22}, HIV positive^{4,28}, healthcare workers^{26,27,28}, incarcerated²⁹, as well as TB suspects^{1,22,21} and low risk individuals^{17,22}.

Repeatability and effect of TST on subsequent QuantiFERON®-TB Gold IT testing
As part of the U.S. specificity study, a subset of the volunteers were retested between 4 and 5 weeks after the original QuantiFERON®-TB Gold IT test and TST. QuantiFERON®-TB Gold IT results for 260 recruits were available at both time points and the level of agreement was 99.6% (259/260). A prior TST did not induce positive QuantiFERON®-TB Gold IT responses.

10. TECHNICAL INFORMATION

Indeterminate Results

Indeterminate results should be uncommon and may be related to the immune status of the individual being tested, but may also be related to a number of technical factors:

- Longer than 16 hours from blood draw to incubation at 37°C,
- Storage of blood outside the recommended temperature range (22°C $\pm$ 5°C),
- Insufficient mixing of blood collection tubes,
- Incomplete washing of the ELISA plate.

If technical issues are suspected with the collection or handling of blood samples, repeat the entire QuantiFERON®-TB Gold IT test with a new blood specimen. Repeating the ELISA testing of stimulated plasmas can be performed if inadequate washing or other procedural deviation with the ELISA test is suspected. Indeterminate tests that result from low Mitogen or high Nil values would not be expected to change on repeat unless there was an error with the ELISA testing. Indeterminate results should be reported as such. Physicians may choose to redraw a specimen or perform other procedures as appropriate.

Clotted Plasma Samples

Should fibrin clots occur with long term storage of plasma samples, centrifuge samples to sediment clotted material and facilitate pipetting of plasma.

ELISA Trouble Shooting

Non-specific Colour Development

POSSIBLE CAUSE	SOLUTION
Incomplete washing of the plate.	Wash the plate at least 6 times with 400 μ L/well of wash buffer. More than 6 washing cycles may be required depending on the washer being used. A soak time of at least 5 seconds between cycles should be used.
Cross-contamination of ELISA wells.	Take care pipetting and mixing sample to minimise risk.
Kit / Components have expired.	Ensure kit is used within the expiry date. Ensure reconstituted Standard and Conjugate 100X Concentrate are used within three months of the reconstitution date.
Enzyme Substrate Solution is contaminated.	Discard substrate if blue colouration exists. Ensure clean reagent reservoirs are used.

Low Optical Density Readings for Standards

POSSIBLE CAUSE	SOLUTION
Standard dilution error.	Ensure dilutions of the Kit Standard are prepared correctly as per the Package Insert.
Pipetting error.	Ensure pipettes are calibrated and used according to manufacturer's instructions.
Incubation temperature too low.	Incubation of the ELISA should be performed at Room Temperature, 17°C to 27°C.
Incubation time too short.	Incubation of the plate with the conjugate, standards and samples should be for 120 $\pm$ 5 minutes. The Enzyme Substrate Solution is incubated on the plate for 30 minutes.
Incorrect plate reader filter used.	Plate should be read at 450nm with a reference filter of between 620 and 650nm.
Reagents are too cold.	All reagents, with the exception of the Conjugate 100X Concentrate, must be brought to room temperature prior to commencing the assay. This takes approximately one hour.
Kit / Components have expired.	Ensure kit is used within the expiry date. Ensure reconstituted Standard and Conjugate 100X Concentrate are used within three months of the reconstitution date.

High Background

POSSIBLE CAUSE	SOLUTION
Incomplete washing of the plate.	Wash the plate at least 6 times with 400µL/well of wash buffer. More than 6 washing cycles may be required depending on the washer being used. A soak time of at least 5 seconds between cycles should be used.
Incubation temperature too high.	Incubation of the ELISA should be performed at Room Temperature, 17°C to 27°C.
Kit / Components have expired.	Ensure kit is used within the expiry date. Ensure reconstituted Standard and Conjugate 100X Concentrate are used within three months of the reconstitution date.
Enzyme Substrate Solution is contaminated.	Discard substrate if blue colouration exists. Ensure clean reagent reservoirs are used.

Non-linear Standard Curve and Duplicate Variability

POSSIBLE CAUSE	SOLUTION
Incomplete washing of the plate.	Wash the plate at least 6 times with 400µL/well of wash buffer. More than 6 washing cycles may be required depending on the washer being used. A soak time of at least 5 seconds between cycles should be used.
Standard dilution error.	Ensure dilutions of the Standard are prepared correctly as per the Package Insert.
Poor mixing.	Mix reagents thoroughly by inversion or gentle vortexing prior to their addition to the plate.
Inconsistent pipetting technique or interruption during assay set-up.	Sample and standard addition should be performed in a continuous manner. All reagents should be prepared prior to commencing the assay.

Assay procedure video and solution to most technical problems can be found on the Product Information and Technical Guide CD-ROM available free of charge from Cellestis or via your distributor.

II. BIBLIOGRAPHY

- Andersen, P., *et al.* Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 2000. 356: 1099-104.
- Arend, S.M., *et al.* Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun*, 2000. 68: 3314-21.
- Arend, S.M., *et al.* Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J Infect Dis*, 2000. 181: 1850-4.
- Barnes, P.F. Diagnosing latent tuberculosis infection: turning glitter to gold. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. 170: 5-6.
- Brock, I., *et al.* Latent Tuberculosis in HIV positive, diagnosed by *M. Tuberculosis* Specific Interferon Gamma test. *Resp Res*, 2006. 7: 56.
- Brock, I., *et al.* Performance of whole blood IFN-γ test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2001. 5: 462-7.
- Brock, I., *et al.* Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. 170: 65-9.
- Dheda, K., *et al.* Utility of the antigen-specific interferon-γ assay for the management of tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med*, 2005. 11: 195-202.
- Diel, R., *et al.* Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Resp Res*, 2006. 7: 77 doi:10.1186/1465-9921-7-77.
- Dogra, S., *et al.* Comparison of a whole blood interferon-γ assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *Journal of Infection*, 2006. In Press.
- Doherty, T.M., *et al.* Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol*, 2002. 40: 704-6.
- Ferrara, G., *et al.* Routine hospital use of a commercial whole blood interferon-γ assay for tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 172: 631-5.
- Funayama, K., *et al.* Usefulness of QuantiFERON TB-2G in contact investigation of a tuberculosis outbreak in a university. *Kekkaku*, 2005. 80: 527-34.

14. Harada, N., *et al.* Usefulness of a novel diagnostic method of tuberculosis infection, QuantiFERON TB-2G, in an outbreak of tuberculosis. *Kekkaku*, 2004. 79: 637-43.
15. Harada, N. Basic characteristics of a novel diagnostic method (QuantiFERON TB-2G) for latent tuberculosis infection with the use of *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens, ESAT-6 and CFP-10. *Kekkaku*, 2004. 79: 725-35.
16. Harada, N., *et al.* Screening for Tuberculosis Infection Using Whole-Blood Interferon- γ and Mantoux Testing Among Japanese Healthcare Workers. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006, 27: 442-8. Epub Apr 26, 2006.
17. Kang, Y.A., *et al.* Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon γ assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA*, 2005. 293: 2756-61.
18. Kumimoto, D., *et al.* QuantiFERON®-TB Gold testing of HIV patients for latent TB infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol Vol 17 No 1 January/February* 2006.
19. Lein, A.D., *et al.* Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999. 6: 606-9.
20. Matulis, G., *et al.* Validation of an ESAT-6/CFP-10 specific diagnostic test for latent tuberculosis in patients under treatment with anti-TNF- α -antibodies and Methotrexate. 2006. Submitted for publication.
21. Mitashita, H., *et al.* Detection of tuberculosis infection using a whole blood interferon gamma assay in a contact investigation – evaluation using QuantiFERON TB-2G. *Kekkaku*, 2005. 80: 557-64.
22. Mori, T., *et al.* Specific detection of tuberculosis infection: An interferon- γ -based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. 170: 59-64.
23. Mori, M., *et al.* Usefulness of interferon-gamma-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in childhood tuberculosis. *Kansenshogaku Zasshi*, 2005. 79: 937-44.
24. Munk, M.E., *et al.* Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, 2001. 183: 175-6.
25. Nakaoka, H., *et al.* Tuberculosis infection in children in contact with adults with TB. Are we underestimating the risk of infection? 2006. Submitted for publication.
26. Nakaoka, H., *et al.* Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis*, 2006. 12: 1383-1388.
27. Pai, M., *et al.* Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 2004. 4: 761-76.

28. Pai, M., *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA*, 2005. 293: 2746-55.
29. Ravn, P., *et al.* Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 1999. 179: 637-45.
30. Ravn, P., *et al.* Reactivation of tuberculosis during immunosuppressive treatment in a patient with a positive QuantiFERON®-RD1 test. *Scand J Infect Dis*, 2004. 36: 499-501.
31. Ravn, P., *et al.* Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005. 12: 491-6.
32. Rothel, J.S., Anderson, P. Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: Is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2005. 3: 981-93.
33. Silverman, M., *et al.* Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients exposed to tuberculosis. 2006. Submitted for publication.
34. Whalen, C.C. Diagnosis of latent tuberculosis infection: measure for measure. *JAMA*, 2005. 293: 2785-7.

12. TECHNICAL SERVICE

For technical service please contact:

Cellestis International Pty Ltd:	Phone:	+61 3 9571 3500
	Fax:	+61 3 9571 3544
	E-mail:	quantiferon@cellestis.com
	Website:	www.cellestis.com
Cellestis Inc.: (USA)	Phone:	+1 661 775 7480
	Fax:	+1 661 775 7479
	Toll free:	800 519 4627
	Email:	customer.service@cellestis.com
Cellestis GmbH: (Europe)	Phone:	+49 6151 428 59-0
	Fax:	+49 6151 428 59-110
	Email:	europe@cellestis.com

13. ABBREVIATED TEST PROCEDURE

STAGE 1 – BLOOD INCUBATION

1. Collect patient blood into blood collection tubes and mix by **vigorous shaking the tubes up and down 10 times** to ensure that **the entire inner surface of the tube** has been coated with blood.

2. Incubate tubes **upright** at 37°C for 16 to 24 hours.

3. Following incubation, centrifuge tubes for 15 minutes at 2000 to 3000 RCF (g) to separate the plasma and the red cells.

4. Following centrifugation, harvest plasma sample from each tube for IFN- γ quantification.

STAGE 2 – IFN- γ ELISA

1. Equilibrate ELISA components, with the exception of the Conjugate 100X Concentrate, to room temperature for at least 60 minutes.

2. Reconstitute the Kit Standard to 8.0 IU/mL with distilled or deionised water. Prepare four (4) standard dilutions.

3. Reconstitute freeze-dried Conjugate 100X Concentrate with distilled or deionised water.

4. Prepare working strength conjugate in Green Diluent and add 50 μ L to all wells.

5. Add 50 μ L of test plasma samples and 50 μ L of standards to appropriate wells. Mix using shaker.

6. Incubate for 120 minutes at room temperature.

STAGE 2 – IFN- γ ELISA (Continued)

7. Wash wells at least 6 times with 400 μ L/well of wash buffer.

8. Add 100 μ L Enzyme Substrate Solution to wells. Mix using shaker.

9. Incubate for 30 minutes at room temperature.

10. Add 50 μ L Stop Solution to all wells. Mix using shaker.

11. Read results at 450nm with a 620 to 650nm reference filter.

12. Analyse Results.

Manufactured for:
Cellestis Limited (Australia), Cellestis Inc. (USA) and Cellestis GmbH (Europe)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia
Phone: (Australia) +61 3 9571 3500; (USA) 800 519 4627; (Europe) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Website: www.cellestis.com

Doc. No. 05990301B
January 2007

EC	REP
----	-----

Priory Analysts Ltd
PO Box 4030
Milton Keynes
MK 13 0ZG
United Kingdom