Kelly Aparecida Kanunfre

Tuberculose pulmonar: aumento da eficiência diagnóstica pela associação de métodos microbiológicos e imunológicos para pesquisa de anticorpos IgG anti - *Mycobacterium tuberculosis* por *Western blotting* e interferon-gama

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira

SÃO PAULO

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Kanunfre, Kelly Aparecida
Tuberculose pulmonar : aumento da eficiência diagnóstica pela associação de métodos microbiológicos e imunológicos para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Mycobacterium tuberculosis* por *Western blotting* e interferon-gama / Kelly Aparecida Kanunfre. -- São Paulo, 2007.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Antonio Walter Ferreira.

Descritores: 1.Tuberculose pulmonar/diagnóstico 2.*Western blotting* 3.Interferon tipo II 4.Imunoglobulina G 5.Moléculas de adesão celular 6.Prognóstico

USP/FM/SBD-213/07

Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.

A vida inteira que podia ter sido e que não foi.

Tosse, tosse, tosse.

(Pneumotórax – Manuel Bandeira)

A DEUS

Aos meus pais, Homero e Lindamir

Pelo amor incondicional, por sempre estarem presente em todos os momentos, por jamais terem poupado esforços na formação dos filhos e principalmente por terem me ensinado a enfrentar os obstáculos da vida com perseverança, fé, e coragem.

A minha irmã, Carla

Pelo amor, carinho, incentivo, por me ouvir e aconselhar nos momentos difíceis, por estar presente na minha vida, apesar da distância...

Ao meu irmão, Fabio; a minha cunhada, Luciana e ao meu afilhado, Diogo

Pelo amor e carinho que nos une, por me incentivarem em todos os momentos, por estarem sempre presente na minha vida e pelo nosso anjo Diogo

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que voluntariamente participaram deste trabalho, pela colaboração imprescindível para a realização do estudo, os meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira pelo exemplo de dedicação ao trabalho, pelos ensinamentos, pela sua paciência durante todo o estudo, pela orientação segura e criteriosa, pela motivação, força e incentivo nos momentos difíceis e principalmente pela generosidade e amizade constantes.

Aos Drs. Olavo Munhoz Leite, Max Igor Lopes, Marcelo Litvoc e a Dra Ana Marli Sartori, pela oportunidade de acompanhar o atendimento no ambulatório de tuberculose do Hospital das Clínicas, pela paciência e por permitirem a minha presença na discussão dos casos clínicos, o que foi fundamental para o meu aprimoramento profissional e pessoal.

As enfermeiras Agnelice Ramalho dos Santos, Marisa do Nascimento e Eliene da Conceição por me auxiliarem e pelo carinho com que me receberam no ambulatório.

A Mirna, responsável pela vigilância epidemiológica, pelos ensinamentos, pela paciência e pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas, especialmente a Helena e Roselaine que me receberam com carinho e me auxiliaram no cultivo de *M.tuberculosis*, sem o qual não seria possível realizar este estudo.

À Dra. Sandra do Lago Moraes-Ávila, pela orientação criteriosa e segura durante o meu mestrado, por me ensinar a respeitar e amar o trabalho que realizamos, pela sua força e dedicação à ciência.

À Dra. Maria Carmem Arroyo Sanchez, pelos ensinamentos, pela amizade e carinho e pela sua paciência e ajuda na análise estatística dos dados.

À Dra. Guita Rubinsky Elefant pelo apoio, amizade, carinho, desde o primeiro dia que cheguei a São Paulo.

À Fabiana Maria de Souza Leoratti pelo carinho, paciência, pela amizade desde o primeiro dia de trabalho no Laboratório e principalmente por ser um exemplo de força e coragem para superar as adversidades da vida.

À Erika Hellena Esther Hoffmann e Roberto Hiramoto, pela amizade, alegria, pelo companheirismo, pelos conselhos e apoio em todos os momentos de minha vida em São Paulo.

À Janaína Miranda Bezerra pela amizade que cresceu, pelo carinho, pelos ensinamentos no cultivo de *M.tuberculosis*, pela troca de informações.....

À Sarita P Gobbo por ter se tornado minha amiga, por ouvir meus desabafos, por me ajudar em muitos momentos, pelo companheirismo e amizade sincera.....

Ao anjo que Deus colocou na minha vida, Elaine Antunes de Lemos, pelos ensinamentos, pela paciência, por me acolher em sua casa em muitos momentos, pelo convívio com a sua família, por me ouvir e orientar, pela amizade e carinho, por me ajudar em momentos difíceis.

À Luciana Almeida Silva pela amizade sincera, por estar presente em momentos importante da minha vida, por me aconselhar, por me ensinar a "enxergar a Leishmaniose com outros olhos", pela troca de informações, por poder contar com a sua amizade.

As minhas amigas de longa data Maysa Moraes e Sandra Trevisan Beck, pelo carinho, amizade, pelas nossas conversas, troca de experiências e conselhos.

À Sandra Borba, Michael, Anna Catherine, Renata Guimarães, Cíntia, Elaine Millani e família por terem se tornado a minha "família paulistana". Pelos momentos de

alegria, apoio, companheirismo, amizade, preocupações, por estarem presentes na minha vida, inclusive nos longos finais de semana.

A todas as minhas colegas de laboratório, Melissa, Mônica, Juliana, Renata Amanda, Lílian, Patrícia, Caroline, Camila, Clara, Cíntia, Lilia e Mayne pela convivência e amizade.

Ao Dr Paulo Cotrim, Dra. Hiro Goto, Dr. Ângelo Lindoso e a todos os colegas do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Adriano, Edite, Juliana, Luciana, Priscila, Suely, Elizabeth, Larissa, Edna, Beatriz, Prianti, Fabrício, Arnaldo, Fernanda, Priscila, Sandra, pela troca de informações, pela convivência, amizade e momentos de descontração.

A todos os funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela prestatividade e colaboração durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Muito Obrigado

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

Albert Einstein

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, sob apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 03/08308-2 e do LIM/HCFMUSP - 48

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Summary
INTRODUÇÃO..... 1

1. Aspectos epidemiológicos e controle da tuberculose humana..... 2

2. Agente etiológico..... 8

3. Patogenia..... 11

4. Aspectos clínicos..... 16

5. Diagnóstico..... 17

6. Justificativa..... 31

OBJETIVOS..... 33

MÉTODOS..... 35

1. Casuística..... 36

2. Aspectos éticos..... 39

3. Obtenção de antígeno protéico..... 39

4. Avaliação do antígeno protéico..... 42

5. Western blotting..... 43

6. Quantificação de interferon – gama..... 45

7. Quantificação de moléculas de adesão celular..... 47

8. “Receiver Operating Characteristic Curve” (curva ROC)……..... 49

9. “Likelihood ratio”…… 51

10. Análise estatística…… 52

RESULTADOS..... 53

1. Determinação do conteúdo protéico do antígeno de *M. tuberculosis* (H37Rv)..... 54

2. Perfil de proteínas dos diferentes lotes de antígeno por Western blotting 55

3. Western blotting..... 56

4. Western blotting para pesquisa de anticorpos IgG anti – *Mycobacterium tuberculosis*..... 58

5. Desempenho do Western blotting no diagnóstico da tuberculose pulmonar..... 63

6. Quantificação de interferon – gama..... 67

7. Associação dos resultados sorológico, microbiológicos e radiológicos.... 71

8. Quantificação de moléculas de adesão celular (ICAM-1, E-selectina e P-selecitna) na evolução do tratamento da tuberculose pulmonar..... 76

DISCUSSÂO..... 80

CONCLUSÃO..... 100

ANEXOS..... 102

REFERÊNCIAS..... 106

Apêndice

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	“Acquired Immunodeficiency syndrome”
ALA	American Lung Association
ATS	American Thoracic Society
BAAR	bacilo álcool ácido resistente
BCG	bacilo de Calmette- Guérin
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CFP-10	“culture filtrate protein 10”
CR 1, 2, 3	receptores de complemento 1, 2, 3
Curva ROC	“Receiver Operating Characteristic Curve”
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOTS	“Directly Observed Treatment Short Course”
DTT	dietiltreitol
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ensaio immunoenzimático)
ESAT-6	“early secreted antigenic target 6”
FDA	Food and Drug Administration
HIV	vírus da imunodeficiência humana
ICAM	molécula de adesão intercelular
IFN-γ	interferon gama
IL-2	interleucina 2
IUATLD	International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
KNCV	KNCV Tuberculosis Foundation
LAM	lipoarabinomanana
LJ	Lowenstein-Jensen
LR	“Likelihood ratio”
LT-α3	linfotoxina alfa 3
ME	mercaptoetanol
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	“Phosphate Buffer Saline” – solução salina tamponada com fosfato
PBS-Tw20	PBS contendo Tween 20 0,05%
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase)
PMN	polimorfonucleares

PMSF	fluoreto de metilsulfonila
PPD	“Purified Protein Derivative”
QTF - G	QuantiFERON® - TB Gold
SDS	dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificação
TLR	“Toll like receptors”
TMB	tetrametilbenzidina
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidade Internacional
VCAM	molécula de adesão vascular
WHO	World Health Organization
g	aceleração da gravidade ($\cong$ 9,8m/s^2)
M	molar
mM	milimolar
mg	miligrama
mL	mililitro
μL	microlitro
ηm	nanômetro
μg	micrograma
mm	milimetro
ng	nanograma
W	Watts
kDa	kiloDalton
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	ácido sulfúrico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo da detecção de imunoglobulinas em pacientes com tuberculose pulmonar frente a diferentes antígenos, por ensaios imunoenzimáticos.	24
Tabela 2	Diagnóstico estabelecido para os 10 pacientes com outras pneumopatias.	38
Tabela 3	Interpretação do teste de acordo com a área sob a curva ROC	50
Tabela 4	Influência do LR na probabilidade pós-teste	52
Tabela 5	Concentração protéica e volume final de cinco diferentes lotes de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)	54
Tabela 6	Parâmetros sorológicos determinados segundo os critérios de reatividade estabelecidos.	64
Tabela 7	Resultados de “Likelihood ratio” positivo (LR +) e negativo (LR -) para os critérios estabelecidos.	66
Tabela 8	Resultados do teste QuantiFERON® – TB Gold (QTF – G) nos pacientes com tuberculose pulmonar (doença presente) e no grupo controle (doença ausente)	68
Tabela 9	Resultados dos testes Western blotting, baciloscopia e cultura do escarro de 31 pacientes com tuberculose pulmonar.	72
Tabela 10	Resultados dos testes QuantiFERON® – TB Gold (QTF – G), baciloscopia e cultura do escarro de 29 pacientes com tuberculose pulmonar	74
Tabela 11	Resultados do Western blotting e QuantiFERON® - TB Gold relacionados a associação dos resultados de baciloscopia e cultura do escarro de 29 pacientes com tuberculose pulmonar	75
Tabela 12	Comparação dos resultados positivos e negativos dos testes Western blotting e QuantiFERON® – TB Gold de 29 pacientes com tuberculose pulmonar.	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Western blotting realizado após separação eletroforética dos diferentes lotes de extrato antigênico em gel de poliacrilamida 15% com soro reagente (1/100)	55
Figura 2	Western blotting realizado com soros reagentes (1/100) após separação eletroforética do antígeno protéico	57
Figura 3	Western blotting realizado após separação eletroforética do extrato antigênico reatividade com soros (1/100) de pacientes com diferentes perfis sorológicos e formas de tratamento do antígeno.	58
Figura 4	Freqüência de reconhecimento das frações protéicas por anticorpos IgG presentes nos soros de pacientes com tuberculose pulmonar colhidas no pré-tratamento, após 2 meses de tratamento e no término de tratamento	60
Figura 5	Freqüência de reconhecimento das frações protéicas de 38, 30, 26, 16 e 6kDa por anticorpos IgG presentes nos soros dos diferentes grupos estudados.	62
Figura 6	Representação gráfica dos índices de “Likelihood ratio” positivo e negativo obtidos para o critério de reatividade com duas frações antigênicas no Western blotting	67
Figura 7	Resposta individual de IFN-γ produzido após estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 em pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos sadios, considerando ponto de corte ≥ 0,35UI/mL	69
Figura 8	Curva ROC para ESAT-6 e/ou CFP-10	70
Figura 9	Resposta individual de IFN-γ produzido após estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 em pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos sadios, considerando ponto de corte ≥ 0,25UI/mL	71
Figura 10	Distribuição das concentrações das moléculas de adesão celular nas amostras de soros de pacientes com tuberculose pulmonar, colhidas no inicio e após o término do tratamento	78

RESUMO

Kanunfre KA. Tuberculose pulmonar: aumento da eficiência diagnóstica pela associação de métodos microbiológicos e imunológicos para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Mycobacterium tuberculosis* por Western blotting e interferon-gama. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 120p.

A tuberculose permanece como um dos maiores problemas de saúde pública mundial. O diagnóstico precoce e o tratamento rápido e eficiente dos indivíduos com tuberculose pulmonar ativa são medidas essenciais para a redução da morbidade, mortalidade e da incidência da tuberculose no mundo. As limitações encontradas nos métodos microbiológicos tradicionais, fizeram com que metodologias alternativas fossem desenvolvidas para melhorar o diagnóstico e o prognóstico da tuberculose humana. Neste trabalho verificamos o desempenho diagnóstico do Western blotting para pesquisa de anticorpos IgG anti – *Mycobacterium tuberculosis*, a utilização do teste QuantiFERON® – TB Gold e a detecção de moléculas de adesão celular (ICAM-1 e selectinas) como marcadores de prognóstico. Foram acompanhados até o final do tratamento 31 pacientes com tuberculose pulmonar diagnosticados por critérios clínicos e laboratoriais. Como controles, selecionamos população de indivíduos sadios, doadores de banco de sangue e indivíduos com outras pneumopatias. Os resultados mostraram que o Western blotting apresentou sensibilidade de 94% e especificidade de 96% no diagnóstico da tuberculose pulmonar, atendendo os requisitos da OMS para testes sorológicos. O QuantiFERON® – TB Gold apresentou sensibilidade de 83% e especificidade de 100%, após ajuste do limiar de reatividade. Os resultados das moléculas de adesão celular sugerem potencial para serem utilizadas como marcadores de prognóstico da doença. Ao associarmos os resultados do Western blotting ou do QuantiFERON® – TB Gold com a baciloscopia obtivemos sensibilidade superior a 95%; e quando associados à cultura a sensibilidade encontrada foi de 100%. O Western blotting mostrou ser uma ferramenta útil como auxiliar no diagnóstico da tuberculose pulmonar mesmo em pacientes com baciloscopia negativa.

Descritores: 1.Tuberculose pulmonar/diagnóstico 2.*Western blotting* 3.Interferon tipo II 4.Imunoglobulina G 5.Moléculas de adesão celular 6.Prognóstico

SUMMARY

Kanunfre KA. Pulmonary tuberculosis: enhanced efficiency diagnostic combining microbiological and immunological methods to detect IgG anti *Mycobacterium tuberculosis* antibodies by Western blotting and interferon-gamma. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 120p.

Tuberculosis remains a major public-health problem. Rapid diagnosis and prompt treatment is the cornerstone to reduce morbidity, mortality and incidence of tuberculosis in the world. Alternative methods have been developed to overcome the limitations presented by conventional microbiological methods and to improve the diagnosis and prognosis of tuberculosis. In this study we verified the diagnostic performance of Western blotting for IgG anti-*M.tuberculosis* antibodies detection, QuantiFERON® - TB Gold and circulating adhesion molecules (ICAM-1 and Selectins) as prognosis markers. Thirty-one patients were followed-up during the treatment. Active pulmonary tuberculosis was diagnosed by clinical and laboratorial criteria. As group control healthy individuals, blood donors and patients with other lung diseases were included. Western blotting results showed a high performance with sensitivity of 94% and specificity of 96% for the diagnosis of pulmonary tuberculosis, attending WHO requirements for serological tests. After adjusting the threshold, QuantiFERON® - TB Gold showed sensitivity of 83% and specificity of 100%. The results of adhesion molecules suggested potential to use the test as prognosis markers. Combining Western blotting or QuantiFERON® - TB Gold with acid-fast bacilli (AFB) smear results, the overall sensitivity increase to more than 95%, and when combined with culture the overall sensitivity was 100%. Together, these findings, suggest that Western blotting could be a very useful supplementary tool for pulmonary tuberculosis, especially in patients with AFB smear negative.

Descriptors: 1.Tuberculosis pulmonary/diagnosis 2.Western blotting 3.Interferon type II 4.Immunoglobulin G 5.Cell adhesion molecules 6.Prognosis

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica causada por um bacilo, *Mycobacterium tuberculosis*, que acomete principalmente os pulmões, podendo, porém afetar outros órgãos e tecidos do organismo.

1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CONTROLE DA TUBERCULOSE HUMANA

As primeiras evidências da tuberculose humana foram encontradas em fragmentos ósseos da coluna vertebral de múmias do antigo Egito, a 5.000 a.C, que apresentavam deformidades características da doença. Essas deformidades ósseas também foram encontradas em cadáveres de várias regiões da Itália, Dinamarca e países do Oriente Médio no período Neolítico, sugerindo que a tuberculose estava amplamente distribuída por todo mundo a mais de 4.000 a.C (CDC 2000; Smith, 2003).

Nas escrituras dos assírios foram encontrados os primeiros relatos de pacientes com hemoptise. Hipócrates no século 5 a.C, descreveu pacientes em estado de consumação, caracterizado pela perda progressiva de peso associada a dor torácica e tosse com expectoração sanguinolenta (CDC 2000; Smith, 2003).

No início dos séculos XVI e XVII a Europa tornou-se centro de muitas epidemias de tuberculose (“Great White Plague”) devido à explosão demográfica, ao grande crescimento dos centros urbanos e ao início da revolução industrial. O apogeu desta doença ocorreu no início do século XIX

quando foi estimado que ¼ dos europeus morreram de tuberculose. Medidas adotadas na segunda metade do século XIX, como a melhoria no saneamento básico e nas condições sócio-econômicas da população colaboraram para a diminuição da mortalidade causada pela tuberculose na Europa (Smith, 2003).

Embora essa doença já fosse conhecida desde o início dos tempos a sua transmissibilidade foi evidenciada apenas em 1865 por Jean – Antoine Villemin, médico militar francês, que conseguiu infectar experimentalmente animais de laboratório mediante a inoculação de material retirado de pacientes tuberculosos (Smith, 2003).

Em 1882, os trabalhos de Robert Koch, biologista alemão, vieram estabelecer definitivamente a relação etiológica entre a tuberculose humana e o *M.tuberculosis*, hoje comumente designado como bacilo de Koch. Todavia, a descoberta do agente etiológico teve pouca influência para o controle dos índices de mortalidade e morbidade causados por esta doença (Bignall, 1971; CDC 2000; Smith, 2003). Somente com a descoberta e utilização de antibióticos como a estreptomicina (1944), ácido para-amino-salicílico (1949) e isoniazida (1952) como drogas terapêuticas, foi observada uma expressiva queda desses índices (Ducati et al., 2005).

A partir de 1980 diversos fatores como a epidemia do HIV/AIDS; problemas sócio-econômicos mundiais; o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes; os grandes movimentos migratórios e as deficiências nos programas de controle e sistemas de saúde, contribuíram para um aumento expressivo do número de casos de tuberculose nos países

em desenvolvimento e o reaparecimento da doença nos países industrializados da Europa e América do Norte (Raviglione et al., 2003).

O reconhecimento de que a tuberculose era um problema de saúde pública negligenciado mundialmente, juntamente com a epidemia desta doença em várias partes do mundo, levou a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1993, declarar um estado de emergência mundial; prevendo que no em 1997 um terço da população mundial estaria infectada pelo *M. tuberculosis* e que 5% desenvolveriam a doença ativa durante os primeiros anos após a exposição, se medidas efetivas para o controle da doença não fossem postas em prática (Raviglione et al., 1995).

Em 1994, foi introduzida a estratégia DOTS - “Directly Observed Treatment Short-Course”, na tentativa de controlar a tuberculose. Cinco elementos essenciais para a política de controle da tuberculose foram definidos: 1) comprometimento do governo com o programa de controle da doença; 2) detecção dos casos pela baciloscopia, principalmente nos sintomáticos respiratórios; 3) tratamento de curta duração e diretamente assistido; 4) regularidade na manutenção de medicamentos; 5) sistema de informação que permita o monitoramento dos resultados (WHO, 1995). Apesar dos esforços realizados, muitos países em desenvolvimento não conseguiram implantar o programa com a eficiência necessária, permanecendo grave a situação mundial da tuberculose.

Em março de 2000, durante a Conferência Ministerial sobre Tuberculose em Amsterdã, Holanda, Ministros de Saúde dos 22 países mais atingidos pela doença e as Instituições Internacionais envolvidas no controle

da tuberculose (WHO, IUATLD, KNCV, CDC, ATS e ALA), elaboraram a "Amsterdam Declaration to Stop TB"; a qual expressa a necessidade de expansão e rapidez nas medidas para o controle da tuberculose bem como o aumento de recursos financeiros e políticos para o controle mundial (WHO, 2000).

Segundo a OMS, 95% dos casos de tuberculose ocorrem nos países em desenvolvimento, sendo que os países da África e Ásia são os que apresentam os maiores coeficientes de incidência, atingindo todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos (WHO/Factsheets/2006).

Atualmente a tuberculose é responsável pela morte de aproximadamente dois milhões de pessoas por ano (cerca de 5000 pessoas/dia), com incidência global aumentando cerca de 1% ao ano. Em 2004, ocorreram 8,9 milhões de casos novos de tuberculose (WHO/Report/2006).

Do total de casos novos de tuberculose, menos da metade são notificados, situação que traduz a insuficiência das políticas de controle. Nos 22 países mais atingidos por essa doença, a estimativa é de 7.102.000 casos. Neste grupo, a Índia ocupa a primeira posição com 1.824.000 casos novos anuais, o Brasil a 16ª com 110.000 e o Camboja a última com 70.000. Se a classificação for feita pelo coeficiente de incidência, a África do Sul que está em 5º lugar em número absoluto de casos, assume a 1ª posição com 718/100.000 habitantes, e o Brasil passa para o 22º com uma estimativa de 60/100.000 habitantes (WHO/Report/2006). Já nos países industrializados

da Europa e América do Norte a incidência da tuberculose é mais baixa. Nos Estados Unidos, em 2005, dos 14.093 casos a maior freqüência foi observada nas minorias étnicas e imigrantes (CDC 2006; Dye, 2006).

No Brasil os números são extremamente preocupantes. Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas estejam infectadas pelo bacilo de Koch e que 6.000 pessoas morrem anualmente (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

Em 2004 foram notificados no SINAN (Sistema de Informações de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde) 80.905 casos novos de tuberculose, sendo que 36.074 ocorreram na região sudeste, 23.913 no nordeste, 9.289 no sul, 7.079 no norte e 3.162 no centro oeste. Os estados de São Paulo e Rio de Janeiro são os apresentaram o maior número de casos da doença 16.680 e 12.538, respectivamente (SVS/MS, 2005).

Dados recentes da OMS estimam que ocorreram, em 2004, 109.672 casos novos de tuberculose no Brasil, sendo que 48.216 indivíduos foram considerados transmissores por apresentarem a forma pulmonar da doença com baciloscopia positiva (WHO/Report/2006).

Segundo a OMS, a tuberculose e a epidemia do HIV/AIDS juntas constituem, hoje, uma calamidade. A estimativa mundial de adultos coinfectados com TB/HIV para o ano de 2000 foi de 11,5 milhões de indivíduos, sendo que 70% dos casos ocorreram na África, 20% no sudeste da Ásia e 4% na América Latina (TB/HIV Manual Clínico – WHO, 2004). Em 2004, dos 3,9 milhões de indivíduos com a forma pulmonar da doença, 714 mil estavam coinfectados pelo HIV. Do número total de óbitos registrados

por decorrência da tuberculose (1,7 milhões) 15% eram indivíduos HIV positivos (WHO/Report/2006).

Embora a infecção pelo HIV tenha alterado drasticamente a epidemiologia da tuberculose, atualmente estão sendo observados também fatores de risco, até no momento negligenciados, como a interação entre tuberculose e doenças crônicas, por exemplo, diabetes, doenças respiratórias causadas pelo cigarro e poluição. A tuberculose em pacientes com diabetes necessita de cuidados especiais, pois nesses pacientes, geralmente torna-se mais difícil o diagnóstico da doença (Singla et al., 2006).

A OMS tem também considerado como relevante o risco ocupacional de profissionais da saúde envolvidos no controle da tuberculose. No Brasil, estudo realizado por Silva et al. (2000) mostraram que dos 351 profissionais do Hospital Clementino Fraga Filho no Rio de Janeiro, 8% apresentaram taxa de conversão tuberculínica. Entre os profissionais de saúde, os médicos apresentaram a maior taxa de conversão (15%) seguida pelos enfermeiros (13%). Nos profissionais com cargos administrativos a taxa de conversão foi menor 0,9%.

Diante de todas essas dificuldades a OMS e as instituições internacionais envolvidas no controle da tuberculose lançaram, em 2006, o novo planejamento mundial para controle da tuberculose para o período 2006-2015, que tem como metas: ampliação do DOTS com a eficácia necessária; melhor qualidade e acesso ao diagnóstico e tratamento da doença; redução da incidência da tuberculose; estimulo à pesquisa com o

desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, novas vacinas e novos testes de diagnóstico (WHO/Factsheets/2006).

2. AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da tuberculose humana pertence à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. O complexo *M. tuberculosis* é constituído por cinco espécies de micobactérias intimamente relacionadas: *M. tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti* e *M.canetti* (Dunlap et al., 2000; Ducati et al., 2005).

Atualmente são conhecidas mais de 60 espécies de micobactérias, a grande maioria fazendo parte do meio ambiente classificadas como micobactérias atípicas ou micobactérias não tuberculosas (Kritski et al., 2000; Dunlap et al., 2000; Ducati et al., 2005).

M. tuberculosis é um bacilo delgado ligeiramente encurvado de 1,0 a 4,0 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de diâmetro, aeróbico estrito, intracelular facultativo, não produtor de toxinas. Apresenta crescimento lento, cerca de 4 a 8 semanas para formar colônias visíveis mesmo em meios de cultura especiais (Andersen, 1997; Kritski et al., 2000; MS/FUNASA, 2002; Ducati et al., 2005).

A parede celular do bacilo da tuberculose apresenta uma estrutura extremamente singular composta por: peptídeoglicano (ácido N-glicolilmurâmico), ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa), arabinogalactano (polissacarídeo) e proteínas e lipídeos livres que não estão

ligados covalentemente a este esqueleto basal (complexo arabinogalactano-peptideoglicano). Os lipídeos livres representam epítopos passíveis de serem reconhecidos pelo hospedeiro. Entre os lipídeos que constituem a parede celular da micobactéria destacam-se:

A) Ácidos Micólicos, moléculas hidrofóbicas localizadas ao redor do bacilo formando uma capa lipídica que o protege da ação de lisozimas, radicais livres de oxigênio e lise osmótica via complemento;

B) Fator Corda (6,6' dimicolato de trealose) responsável pelo crescimento em serpentina, por inibir a migração de polimorfonucleares (PMN). É produzido por cepas virulentas (Smith, 2003; Ducati et al., 2005).

C) Lipoarabinomanana (LAM), complexo glicolipídico que contém repetidas subunidades dissacarídicas arabinose-manose, constituindo um dos maiores componentes da parede celular das micobactérias. Evidências sugerem que LAM possui um importante papel imunomodulador da resposta do hospedeiro, protegendo a micobactéria dos mecanismos letais como o "burst" respiratório dos macrófagos. De fato, experimentos com camundongos demonstraram que o LAM reduz a produção de INF-γ, bloqueando a expressão de genes que codificam esta citocina (Smith, 2003).

O alto teor de lipídeos presente na parede celular das micobactérias, cerca de 60%, confere a estes microrganismos características como a formação de película em meios líquidos, resistência à descoloração por álcool-ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos (Manzano, 1998; Ducati et al., 2005).

Entre as diversas proteínas da micobactéria, as mais estudadas são aquelas envolvidas com a patogenia da doença e as que são reconhecidas por anticorpos de pacientes com tuberculose. Entre as proteínas destacamos:

A) DnaK (70kDa) e GroEs (10kDa) – pertencem a família das proteínas de choque térmico ou proteínas de estresse. Apresentam um papel importante na adaptação da micobactéria às variações do microambiente. Têm sua síntese aumentada quando o bacilo é exposto à alta temperatura e outros fatores de estresse como radicais de oxigênio e etanol.

B) Proteína ligada a fosfato (38kDa) – está localizada na parte externa da parede celular da micobactéria e tem como função ligar-se ao fosfato e torná-lo disponível para o bacilo.

C) Complexo antigênico 85 (30-32kDa) – são proteínas externas da parede celular, subdividem-se em 85A, B e C que apresentam diferentes graus de ligação com a fibronectina. São imunodominates e sugere-se que estejam envolvidas no processo de ligação da micobactéria à receptores de superfície específicos dos macrófagos.

D) Proteínas MPT 51(27kDa) e MPT 64(26kDa) – possuem epítopos para célula B e reagem de forma cruzada com os antígenos do complexo 85.

E) Superóxido dismutase (23kDa) – tem como função proteger a micobactéria dos efeitos tóxicos dos radicais superóxidos gerados durante o “burst” oxidativo no macrófago.

F) Lipoproteína 19kDa – é um antígeno imunodominante reconhecido por células T e por anticorpos de pacientes com tuberculose.

G) Alfa cristalina (12/16kDa) – pertence à família das proteínas de choque térmico. Sugere-se que esta proteína seja um importante elemento que controla a latência ou persistência do bacilo, pois estudos demonstraram que a superexpressão desta proteína inibe o crescimento do *M. tuberculosis*.

H) ESAT-6/CFP10 (6kDa, 10kDa) – proteínas de baixa massa molecular pertencente à família ESAT6, secretadas pelo *M. tuberculosis.* Os genes que codificam ESAT-6/CFP10 estão localizados na região RD1, a 1ª. deleção encontrada quando comparados os genomas cepa selvagem *M.bovis* e o da cepa vacinal BCG. Esta região é encontrada em todas as cepas virulentas de *M. tuberculosis* e *M.bovis* e está também presente em algumas micobactérias ambientais não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* como *M.kansasii*, *M.marinum* e *M.szulgai*. Estudos recentes têm demonstrado que estas proteínas são reconhecidas por células T e reagem com anticorpos de pacientes com tuberculose, sendo consideradas antígenos imunodominates. Uma outra proteína também reconhecida por anticorpos de pacientes com tuberculose é a TB 10.4, também pertencente à família ESAT-6, capaz de gerar forte resposta imune de células T dos pacientes, comprovada pela detecção de interferon – gama (IFN-γ) (Andersen, 1997; Skjöt et al, 2000; Arend et al, 2000; Smith 2003).

3. PATOGENIA DA TUBERCULOSE

A tuberculose é transmitida de pessoa a pessoa através do ar, pela inalação de gotículas expelidas por indivíduo com a forma pulmonar ou

laríngea da doença. Somente os núcleos secos das gotículas (núcleo de Wells), partículas de 1 a 5 µm de diâmetro que contém 2 a 3 bacilos conseguem atingir os alvéolos pulmonares e dar início à multiplicação.

Após a inalação, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos alveolares através de receptores de complemento (CR1, CR2, e CR3), receptores de manose, outras moléculas receptoras de superfície celular como a fibronectina, receptores para fração Fc de imunoglobulinas e mais recentemente pelos receptores “Toll like receptors” (TLR) (Schlunger, 2001). Embora a fagocitose aconteça e parte dos bacilos sejam destruídos, um maior número permanece vivo dentro do fagossoma do macrófago. A sobrevivência do patógeno dentro da célula é mediada principalmente pela sua habilidade de interferir na maturação do fagossoma, impedindo a acidificação do microambiente que é fundamental para a fusão fago-lisossoma, permitindo assim a sua multiplicação nos estágios iniciais da infecção. O crescimento intracelular da micobactéria pode ser inibido pela ação de macrófagos ativados por citocinas (IFN-γ) produzidas por células T (Stewart et al., 2003; Kaufmann, 2004).

A presença de antígenos micobacterianos no fagossoma do macrófago permite que estes sejam processados e apresentados às células T CD4+ via MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe II. Alternativamente, ocorre também o processamento de antígeno no citosol e apresentação de peptídeos micobacterianos às células T CD8+ via MHC de classe I. Estudos têm demonstrado que na infecção pelo bacilo da tuberculose há uma intensa resposta de células T CD4+ Th1 (T helper 1).

Estas células apresentam um importante papel na resposta imune do hospedeiro, pois as citocinas que produzem (IFN-γ, TNF-α, LT-α3, IL-2) estão envolvidas na ativação de células fagocíticas e outras células inflamatórias capazes de inibir o crescimento da micobactéria, ou seja, estão envolvidas no controle da infecção (resistência adquirida) (Schluger et al., 1998; Boom et al., 2003).

O IFN-γ é uma das principais citocinas produzidas na resposta do hospedeiro contra a micobactéria. É responsável pela ativação de macrófagos, está envolvido na formação e manutenção do granuloma e aumenta a expressão de MHC de classe II. Indivíduos com deficiência na produção de IFN-γ ou com deficiência de expressão de receptor para esta citocina são susceptíveis a uma infecção sistêmica severa causada por micobactérias que usualmente não causam doença em indivíduos imunocompetentes (Schluger, 2001).

O IFN-γ e o TNF-α são responsáveis pela regulação da expressão de moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1, selectinas), sendo estas moléculas importantes no processo de manutenção do granuloma quando presente na superfície celular dos PMN e no endotélio celular. A presença das formas solúveis de ICAM-1, VCAM-1 e selectinas na circulação pode refletir severidade e atividade do processo inflamatório na tuberculose pulmonar (Schluger, 1998; Demir et al., 2002; Boom et al., 2003; Mukae et al., 2003).

Células dendríticas também fagocitam a micobactéria ou fragmentos da micobactéria e migram para os linfonodos. As células T são ativadas e

dirigem-se para o foco da infecção promovendo uma resposta intensa que envolve a ativação de macrófagos, recrutamento de outras células como células B, células dendríticas, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, células gigantes multinucleadas e ainda a produção de citocinas (IFN-γ, TNF α, Lt α3). Esta intensa resposta resulta na formação da lesão granulomatosa também chamada de granuloma ou tubérculo, coincidindo com o aparecimento da hipersensibilidade do tipo tardia (reatividade ao teste tuberculínico). No centro do granuloma pode ocorrer necrose granular caseosa, decorrente da liberação de substâncias citotóxicas por células T (Tufariello et al., 2003; Stewart et al., 2003; Kaufmann, 2004). A formação do granuloma tem como finalidade a contenção dos bacilos, impedindo o desenvolvimento da doença.

O padrão de resposta do hospedeiro depende de uma primeira exposição (tuberculose primária) ou de uma reação secundária em um hospedeiro já sensibilizado (tuberculose secundária ou pós-primária).

Na tuberculose primária, em 90 a 95% dos casos, as lesões pulmonares iniciais (complexo de Gohn) evoluem para fibrose do granuloma e/ou a calcificação do caseo, controlando a infecção. Entretanto, bacilos viáveis podem permanecer na região em um estado de latência ou dormência sem causar a doença, e posteriormente devido a algum processo de imunossupressão poderão ser reativados ocasionando a tuberculose secundária. Em 5 a 10% dos casos, a primoinfecção não é contida, seja pela deficiência no desenvolvimento de imunidade celular, seja pela carga infectante ou pela virulência da cepa inalada. Ocorre a liquefação do caseo

devido à ação de enzimas líticas liberadas pela degradação dos macrófagos na reação exsudativa tecidual, facilitando o crescimento do bacilo e o desenvolvimento da doença (Samuelson, 2000; Kritski et al., 2000). Uma das formas mais graves da tuberculose primária é a forma miliar, caracterizada pela difusão de lesões granulomatosas muito pequenas que atingem os pulmões e muitos outros órgãos.

A tuberculose secundária ou pós-primária é a forma de tuberculose que ocorre em geral tardiamente, anos após o estabelecimento da lesão primária. O indivíduo desenvolve uma lesão mais circunscrita, de evolução mais lenta que as formas primárias, com maior reação inflamatória do tipo hipersensibilidade, caracterizada por cavitação e fibrose. A origem pode ser tanto endógena, por reativação de um foco quiescente (bacilos que se encontravam em estado de dormência ou latência), quanto exógena, a partir de uma nova contaminação por cepas mais virulentas que resistem à forte resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro. (FUNASA, 2002).

Depois de penetrar no organismo através de via respiratória, o *M. tuberculosis* pode se disseminar e se instalar em qualquer órgão. A via linfo-hematogênica é a responsável pela maioria das formas extrapulomonares da doença. Os sítios de implantação são aqueles com maior suprimento sangüíneo e, portanto, de oxigênio, como por exemplo, o córtex renal, cerebral, as extremidades de crescimento dos ossos longos, vértebras, e adrenais (Melo e Afiune, 1993).

4. ASPECTOS CLÍNICOS

As manifestações clínicas da tuberculose são variáveis e dependem de alguns fatores relacionados ao hospedeiro como a idade, estado nutricional, estado imune, co-morbidades, vacinação pelo BCG e ao patógeno como a virulência e o tropismo para alguns órgãos ou tecidos.

Anteriormente à epidemia de HIV/AIDS, cerca de 80% dos casos de tuberculose acometia o pulmão e 15% envolviam além deste outros órgãos ou apenas outros órgãos (tuberculose extrapulmonar). Embora não existam atualmente dados que descrevam os locais de maior acometimento em indivíduos co-infectados pelo HIV, um estudo retrospectivo desta população em estado avançado da doença demonstrou que 38% dos pacientes apresentavam apenas acometimento pulmonar, 30% apresentavam acometimento extrapulmonar e em 32% tanto o pulmão como outros órgãos estavam acometidos pela tuberculose (Dunlap et al., 2000).

4.1 Tuberculose pulmonar

O pulmão é a porta de entrada natural do *M. tuberculosis* onde as manifestações clínicas são mais freqüentes e de maior importância epidemiológica.

Tosse é o sintoma mais comum podendo ser seca no início da doença e com expectoração após inflamação e necrose tecidual. Pode ocorrer em alguns casos expectoração sanguinolenta (hemoptise).

Tosse associada aos demais sinais clínicos mencionados acima são de grande importância na investigação clínica principalmente quando associados aos resultados dos exames radiológicos e laboratoriais. As alterações radiológicas mais freqüentes na tuberculose pulmonar são: a presença de infiltrados nos ápices pulmonares, formação de cavernas e focos de disseminações broncogênicas (Dunlap et al., 2000; Leite, 2001).

4.2 Tuberculose extrapulmonar

Todos os órgãos e sistemas podem ser infectados pelo *M. tuberculosis*. Geralmente os mais envolvidos são linfonodos periféricos, sistema urogenital, ossos e articulações, fígado, baço, sistema nervoso central (SNC) e pele. Os sinais e sintomas associados a cada uma destas localizações são variados e dependem fundamentalmente do estado imunológico do indivíduo. Na tuberculose extrapulmonar são necessários procedimentos mais invasivos para estabelecer o diagnóstico da doença (Dunlap et al., 2000; Leite, 2001).

5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce e o tratamento rápido do indivíduo com a forma pulmonar da tuberculose bloqueia a cadeia de transmissão da doença proporcionando um grande impacto na saúde pública e controle da patologia.

Atualmente o diagnóstico da tuberculose baseia-se na suspeita clínica, nos achados radiológicos com confirmação laboratorial através de métodos que visam à detecção e identificação do bacilo da tuberculose (Chan et al., 2000).

5.1 Métodos de detecção e identificação de *M. tuberculosis*

5.1.1 Baciloscopia

A pesquisa direta de bacilos-álcool-ácido-resistentes (BAAR) pela coloração de Ziehl-Neelsen permite a rápida detecção do bacilo pela microscopia. Por ser uma metodologia simples, rápida, de baixo custo e que permite estimar o número de bacilos presentes na amostra clínica, faz com que permaneça como uma ferramenta importante na detecção de indivíduos bacilíferos, principalmente nas regiões de alta endemicidade da doença (Perkins, 2000; Ganguly, 2002).

Em pacientes com tuberculose pulmonar a sensibilidade da baciloscopia varia de 50 a 80%, nos indivíduos paucibacilares é de aproximadamente de 50%, em crianças, pacientes co-infectados pelo HIV e em pacientes com tuberculose extrapulmonar a variação da sensibilidade é de 35 a 70%.

A sensibilidade da baciloscopia é limitada por diversos fatores como o número de bacilos presentes nos espécimes clínicos, são necessários de 5.000 a 10.000 bacilos/mL de escarro para obter-se um resultado positivo na baciloscopia; a habilidade e experiência do microscopista; o número de

amostras analisadas por dia; a forma de tratamento dado à amostra (liquefação ou concentração) e o preparo da lâmina (Ganguly, 2002; Cooksey, 2003; Garg et al., 2003; II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004; API TB Consensus Guidelines 2006; WHO/TDR/FIND 2006).

Estas limitações tornam-se críticas principalmente pelo aumento da incidência da doença sem confirmação bacteriológica (baciloscopia negativa), em regiões onde a infecção pelo HIV é mais prevalente. Metodologias alternativas à baciloscopia devem ser estudas e definidas para o diagnóstico da doença e controle da transmissão (Perkins, 2000; Ganguly, 2002).

5.1.2 Cultura

O isolamento do bacilo da tuberculose pela cultura, a partir de espécimes clínicos de paciente, permanece até hoje como diagnóstico definitivo ("gold-standard") da doença. A cultura pode ser realizada em meios sólidos como Lowenstein-Jensen (LJ) e o Middlebrook 7H10 e 7H11, ou em meios líquidos como Kirchner e o caldo Middle Brook 7H9.

A cultura apresenta sensibilidade superior à baciloscopia (80-96%) detectando menos de 10 bacilos/mL de espécime clínico e por testes bioquímicos permite diferenciar *M. tuberculosis* de outras micobactérias. É pelo cultivo de *M. tuberculosis* que podemos avaliar à susceptibilidade do bacilo às drogas terapêuticas (Dunlap et al., 2000; Leite, 2001; Ganguly, 2002).

A cultura permanece como um método de grande auxílio no diagnóstico de indivíduos com suspeita de tuberculose pulmonar e resultado negativo na baciloscopia, em casos de tuberculose extrapulmonar como meníngea, renal, pleural, óssea e ganglionar e também no diagnóstico da tuberculose em pacientes co-infectados pelo HIV (FUNASA, 2002).

A desvantagem da cultura é o tempo necessário para a liberação do resultado, devido ao lento crescimento bacilar que varia de 2 a 6 semanas. Como alternativa a este problema foram desenvolvidos sistemas semi-automáticos e automatizados que utilizam ensaios radiométricos e/ou colorimétricos para a detecção de CO_2 produzidos e O_2 consumidos durante o crescimento bacilar. Como exemplos desses sistemas temos o BACTEC 460 e BACTEC 9000MB (Becton Dickinson), o Mycobacterial Growth Indicator Tube - MGIT™960 (Becton Dickinson) e o MB/BacT (bioMérieux). Com a utilização desses sistemas o tempo necessário para a liberação do resultado é reduzido para 1 a 4 semanas (Ganguly, 2002; Cooksey, 2003; WHO/TDR/FIND 2006).

Todavia o custo é muito alto, principalmente para os países mais acometidos pela tuberculose e segundo a OMS, mesmo com a utilização desses sistemas, não se descarta a utilização de meio LJ, pois cepas raras de *M. tuberculosis* não crescem em outros meios (Perkins, 2000).

Cabe ressaltar que apesar dos métodos microbiológicos (baciloscopia e cultura) serem considerados como métodos de certeza para o diagnóstico, estudos realizados nos Estados Unidos, mostraram que 15% dos casos de tuberculose notificados anualmente não apresentavam evidências

bacteriológicas, ou seja, apresentavam resultados negativos tanto na baciloscopia quanto na cultura (Chan et al., 2000).

5.1.3 Biologia Molecular

A identificação de espécies de micobactérias pode ser realizada por diferentes metodologias. Atualmente as técnicas de biologia molecular são as mais utilizadas devido à rapidez de obtenção dos resultados. Entre as técnicas utilizadas podemos citar as que empregam sondas genéticas, seqüenciamento a partir de produtos de PCR, “DNA microarrays”. Destas o sistema comercial AccuProbe (Gen-Probe Inc.) que utiliza sondas de DNA é o mais utilizado, por ser uma metodologia que não requer equipamentos especiais, de fácil execução, e por fornecer o resultado em aproximadamente 2 horas. Neste sistema é possível identificar as espécies de micobactérias de grande importância clínica como o complexo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*; *M.gordonae* (Soini e Musser, 2001; Ganguly, 2002; Cheng et al., 2005).

Com o desenvolvimento da “Polymerase Chain Reaction” (PCR), muitos pesquisadores têm estudado e avaliado diferentes alvos moleculares para a detecção do bacilo da tuberculose. Entre esses o mais utilizado atualmente é o elemento de inserção IS6110, por ser uma seqüência específica para o complexo *M. tuberculosis* e por estar presente em até 20 vezes no genoma da micobactéria oferecendo múltiplos alvos para a amplificação.

Apesar desta metodologia ser rápida e específica para o diagnóstico da tuberculose, a sensibilidade dos testes ainda permanecem longe do ideal (Cheng et al., 2005). A sensibilidade varia de 79,4 – 95%, quando comparada com a cultura em amostras com resultado positivo na baciloscopia. Estes valores diminuem quando são analisadas amostras com baciloscopia negativa (40-89%) (Soini e Musser, 2001; Cheng et al., 2005).

Em estudo de meta-análise para avaliar o desempenho da PCR no diagnóstico da tuberculose pulmonar, em amostras com baciloscopia negativa, os autores concluíram que a PCR não apresenta acurácia suficiente para ser utilizada na rotina do diagnóstico da tuberculose pulmonar (Sarmiento et al, 2003).

Outras desvantagens das técnicas de biologia molecular também devem ser consideradas como a possibilidade de amplificar material genético de microrganismo não viável, o que desfavorece a sua utilização no acompanhamento terapêutico, o risco de contaminação (resultado falso positivo), a necessidade um profissional capacitado e o elevado custo (Perkins, 2000; Soini e Musser, 2001; Leite, 2001).

5.2 Métodos Imunológicos

5.2.1 Pesquisa de Anticorpos

Nassau et al. (1976) foram os primeiros que descreveram o uso do teste ELISA (“Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”) para pesquisa de

anticorpos anti - *M. tuberculosis*, utilizando como antígeno um filtrado de *M. tuberculosis* (H37Rv).Os autores obtiveram uma sensibilidade de 80,4% e especificidade de 91,7%, sugerindo a utilização deste tipo de teste sorológico para o diagnóstico da tuberculose.

Após este estudo a pesquisa de anticorpos por ELISA tem sido proposta utilizando antígenos de diferentes naturezas, classificados como totais, semipurificados, e purificados protéicos ou lipídicos, com resultados variados de sensibilidade e especificidade.

Antígenos totais, provenientes de filtrados de *M. tuberculosis* e sonicado de BCG, apresentaram grande número de resultados positivos em indivíduos sadios e pacientes não tuberculosos, portanto não são utilizados na prática clínica devido à baixa especificidade. Em virtude desses resultados, os antígenos purificados protéicos e lipídicos e obtidos por tecnologia de DNA recombinante são preferidos na busca de melhor especificidade (API TB Consensus Guidelines 2006).

Na tabela 1 apresentamos um resumo dos ensaios imunoenzimáticos que avaliaram diferentes antígenos para a pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas.

Tabela 1 – Resumo da detecção de imunoglobulinas em pacientes com tuberculose pulmonar frente a diferentes antígenos, por ensaios imunoenzimáticos.

Antígenos	EIE	Classe de Imunoglobulina	S (%)	E (%)	Referência
CFP21(19kDa), ESAT-6 (6kDa), MPT-63 (16kDa), MMPT 64 (23kDa)	ELISA	IgG e IgM	84,6 IgG 96,2 IgM	100 IgG e IgM	Wang et al., 2005
38kDa, GLU-S (glutamina sintetase), 19kDa, 14kDa, ESAT-6, CFP10, Rv 3871	ELISA	IgG	24 – 75	26 – 75	Greenaway et al., 2005
A-60 – complexo antigênico (glicolipídeos e proteínas)	ELISA	IgG e IgM	80 - IgG 28,5 - IgM	95,8 –I gG 95,7 - IgM	Kalantri et al., 2005
TbF-6®/DPEP®	ELISA	IgG	85	91	Beck et al., 2005b
30kDa	ELISA	IgG e IgA	71-84	97	Uma Devi et al., 2003.
16kDa	ELISA	IgG e IgA	56-82	97	
TbF6® (Mtb 8, 38kDa, Mtb 11, Mtb 48), DPEP® (MPT32), TbF10®	ELISA	IgG	>80% BK+ >60% BK-	98	Houghton et al., 2002
Glicolipídeos	ELISA	IgG	81,1	95,7	Maekura et al., 2001.
LAM	ELISA	IgG	85-93	89-100	Chan et al., 2000
5 Ags* + 38kDa	ICT	IgG	41	88-96	Pottumarthy et al., 2000
38kDa	ICT	IgG	25	86-87	
Kp90	ELISA	IgA	57	62-93	
38kDa	ELISA	IgG	16	96-97	
LAM e 38kDa	ELISA	IgG	55	89-90	
LAM e 38kDa	ELISA	IgA	41	72-85	
LAM e 38 kDa	ELISA	IgM	18	80-100	
A60	ELISA	IgG	80,77	88,4	Chiang et al., 1997
38kDa	ELISA	IgG	64,21	80,74	
Kp90	ELISA	IgA	62,58	66,3	

EIE = ensaio imunoenzimático; S = Sensibilidade; E = Especificidade;
* - cinco antígenos purificados (não citados pelo fabricante); ICT – imunocromatográfico

Além da pesquisa de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos (ELISA e imunocromatográficos) para o diagnóstico da tuberculose, muitos estudos têm sido realizados para tentar determinar perfis de reatividade sorológicos por “Western-Blotting”, que possibilitem caracterizar a presença da tuberculose ativa ou indiquem fase ou extensão da doença (Rovatti et al., 1996; Imaz e Zerbini, 2000; Franco et al. 2001; Beck,2003). Resultados mais promissores foram observados com antígenos de baixo peso molecular, uma vez que estudos realizados por “Western-Blotting” demonstraram maior especificidade para antígenos de *M. tuberculosis* situados na região entre 43 e 12 kDa (Bassey et al., 1996).

Beck et al. (2005a) verificaram que a reatividade de anticorpos IgG contra as frações proteínas de 6 e 16 kDa, 6 e 38 kDa, 16 e 38 kDa em indivíduos contactantes sugere a presença de tuberculose latente com um mau prognóstico, ou seja, com um risco maior de desenvolver a doença ativa já que a reatividade com esses perfis estava ausente em indivíduos sadios e em indivíduos com outras pneumopatias não tuberculosas e presente nos pacientes com tuberculose ativa.

Beck et al. (2005b) ao associarem os resultados dos testes ELISA TBF6®/DPEP® e “Western blotting” obtiveram uma sensibilidade geral de 92% em 52 pacientes com tuberculose pulmonar e uma especificidade de 100% no grupo controle (22 indivíduos sadios e 30 pacientes com outras pneumopatias que não tuberculose). Os autores sugerem que a utilização dos testes pode auxiliar nos casos em que os métodos microbiológicos tradicionais não são suficientes para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Apesar dos estudos realizados, até o momento nenhum teste sorológico é recomendado pela Comunidade Internacional de Tuberculose, para ser utilizado na rotina clínico-laboratorial de investigação da tuberculose (II consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004; API TB Consensus Guidelines 2006; WHO/TDR/FIND 2006).

5.2.2 Prova Tuberculínica Cutânea – PPD

A prova tuberculínica baseia-se na reação de hipersensibilidade do tipo tardia desenvolvida após a inoculação intradérmica de um derivado protéico de *M.tuberculosis*, o mais utilizado é o PPD (Purified Protein Derivative). No Brasil, o antígeno padronizado e distribuído pelo Ministério da Saúde é o PPD RT 23. A prova cutânea é um exame complementar que pode auxiliar na investigação diagnóstica, mas a sua interpretação deve ser cuidadosa, pois a resposta ao PPD é influenciada por diversos fatores como a vacinação por BCG, exposição à micobactérias ambientais, infecção passada ou algum tipo de imunossupressão. Portanto, um resultado positivo na prova tuberculínica apenas evidencia a infecção por micobactérias, não caracterizando a presença de tuberculose ativa e um resultado negativo não exclui a possibilidade de tuberculose (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004; WHO/TDR/FIND 2006).

5.2.3 Detecção e quantificação de Interferon – gama (IFN-γ)

Devido às limitações encontradas na prova tuberculínica cutânea, muitos estudos foram realizados na busca de metodologias alternativas que pudessem auxiliar o diagnóstico da tuberculose. Esta nova metodologia baseia-se na detecção de citocina (IFN-γ) produzida por células T após serem estimuladas por antígenos específicos.

Os primeiros estudos de detecção de IFN-γ utilizavam como antígeno o PPD, posteriormente os novos ensaios passaram a utilizar antígenos específicos de *M.tuberculosis*, como o ESAT-6 e CFP-10, principalmente pelo fato de que os genes que codificam estas proteínas estão localizados na região RD1 do genoma do *M.tuberculosis* (Pai et al., 2004).

Comercialmente estão disponíveis o "QuantiFERON® - TB Gold" (Cellestis Limited, Austrália) e o "T SPOT-TB" (Oxford Immunotec, Inglaterra). Ambos avaliam a resposta imune celular mediante a detecção de IFN-γ, por ELISA e suas variáveis técnicas, produzido por células T após estímulo com antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10) (Van Pinxteren et al., 2000; Pai et al., 2004). Esta metodologia tem sido avaliada na detecção da tuberculose infecção, ativa e no prognóstico da doença.

Estudos realizados por Arend et al. (2000), verificaram maior sensibilidade e especificidade do ensaio de detecção de IFN-γ após estimulo com os antígenos ESAT-6 e CFP10, para discriminar pacientes com tuberculose ativa de indivíduos sem a doença.

Doherty et al. (2002) acompanharam 24 indivíduos sadios contactantes de pacientes com tuberculose pulmonar ativa durante 2 anos após a exposição. O ensaio para a detecção de IFN-γ foi realizado no início do estudo e após 2 anos, os antígenos utilizados foram o ESAT-6 e o PPD. Os autores observaram que 29% dos contactantes desenvolveram a doença tardiamente.

Em 2004, Mori et al. avaliaram a sensibilidade e especificidade do teste QuantiFERON®-TB utilizando os antígenos ESAT-6 e CFP-10. Foram avaliados 118 pacientes com tuberculose ativa (com cultura positiva para *M. tuberculosis*) e 213 indivíduos vacinados com BCG e com baixo risco de exposição ao *M. tuberculosis*. Após definição do ponto de corte em níveis de IFN-γ ≥ 0,35UI/mL, os autores obtiveram uma sensibilidade de 89% e especificidade de 98,1%.

Ravn et al. (2005) avaliaram o teste comercial "QuantiFERON®-TB Gold" no diagnóstico da tuberculose. Foram avaliados 73 pacientes suspeitos de terem a doença e 39 indivíduos sadios vacinados com BCG e sem contato prévio com tuberculose. Dos 73 suspeitos, 48 pacientes foram diagnosticados com tuberculose ativa (35 tuberculose pulmonar e 13 tuberculose extrapulmonar) e 25 pacientes não tinham a doença. Os autores obtiveram uma sensibilidade de 83% para os pacientes com tuberculose pulmonar ativa e 92% para os pacientes com tuberculose extrapulmonar. A especificidade foi de 97% quando avaliado os indivíduos sadios.

Em maio de 2005, o teste "QuantiFERON®-TB Gold" foi aprovado pelo "Food and Drug Administration" (FDA). Inicialmente desenvolvido para o

diagnóstico da tuberculose infecção, passou a ser utilizado também no diagnóstico da tuberculose ativa, atendendo as exigências da Organização Mundial da Saúde quanto à sensibilidade e especificidade para testes sorológicos. Este teste também foi aprovado na Comunidade Européia e no Japão para auxiliar no diagnóstico da tuberculose (WHO/TDR/FIND 2006).

Estudos realizados em diferentes países, após aprovação do teste, têm demonstrado índices de sensibilidade que variam de 62 a 86%, em alguns estudos a sensibilidade obtida nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa é inferior ao preconizado pela OMS (Lee et al., 2006; Ferrara et al., 2006; Tsiouris et al., 2006; Dewan et al., 2007).

5.2.4 Detecção de moléculas de adesão

As moléculas de adesão celular são proteínas expressas nos leucócitos e células endoteliais e têm como função promover interações adesivas entre células ou com a matriz extracelular. Esta interação é um componente básico na migração e no reconhecimento celular, envolvidos em muitos processos biológicos, incluindo reparo dos tecidos e respostas imunes e inflamatórias (Abbas e Lichtman, 2005;).

A presença de formas circulantes das moléculas de adesão nos soros e em outros fluidos biológicos refletiria atividade inflamatória tecidual (Lai et al., 1993).

Estudos demonstraram que as formas solúveis das moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1 e selectinas) presentes nos soros de

pacientes com tuberculose pulmonar auxiliariam no diagnóstico da doença, bem como na avaliação prognóstica dos pacientes frente à terapêutica instituída e se estariam associadas com severidade da doença (Lai et al., 1993; Shijubo et al. 1993; Demir et al., 2002; Mukae et al., 2003).

5.3. Métodos de Imagem

O raio X é uma metodologia simples e útil no diagnóstico da tuberculose pulmonar, pois permite verificar a presença de infiltrados pulmonares, formações de cavernas e focos de disseminação broncogênica. As manifestações radiológicas da tuberculose associada ao HIV/AIDS dependem do nível de imunodepressão e do tempo de doença.

As formas extrapulmonares e pulmonares da tuberculose podem ser melhor evidenciadas com a utilização de métodos de imagem mais avançados como a Tomografia Computadorizada, a Ressonância Magnética e os métodos de Medicina Nuclear. Esses métodos mais avançados são de grande importância para a localização da doença no sistema nervoso central, no abdômen, nos gânglios, na coluna vertebral, no tórax. Por serem métodos de maior custo estão disponíveis apenas em centros de referência para o diagnóstico da doença (Leite, 2001; II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

6. JUSTIFICATIVA

A tuberculose humana continua avançando e preocupando cada vez mais as autoridades do mundo inteiro. Problemas sócio-econômicos mundiais, a epidemia do HIV/AIDS, a resistência de *M. tuberculosis* aos quimioterápicos, os movimentos migratórios, as deficiências na manutenção e controle dos programas de saúde são fatores que tornaram a tuberculose um dos maiores problemas de saúde pública mundial e um desafio para o século XXI.

O diagnóstico precoce dos indivíduos doentes e o tratamento rápido e eficiente são medidas que causam um grande impacto na redução da morbidade e mortalidade causadas por esta doença.

As limitações encontradas nos métodos microbiológicos tradicionais, juntamente com a dificuldade de diagnosticar a tuberculose em crianças, paciente co-infectados pelo HIV, pacientes com tuberculose extra-pulmonar, fizeram com que metodologias alternativas fossem desenvolvidas para melhorar o diagnóstico e o prognóstico da tuberculose humana.

Métodos de biologia molecular estão sendo amplamente estudados e avaliados em diferentes partes do mundo. Limitações na sensibilidade especialmente na detecção de indivíduos com baciloscopia negativa, a possibilidade de detecção do microrganismo, sem valor clínico e o alto custo dos testes dificultaram sua utilização na rotina laboratorial principalmente nos paises mais acometidos pela doença.

Métodos imunológicos têm sido desenvolvidos, avaliados e sugeridos como alternativos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. A dosagem de interfon-gama já foi aprovada pelo FDA para uso na rotina diagnóstica da tuberculose humana. Testes imunoenzimáticos têm sido padronizados com diferentes antígenos de *M.tuberculosis* visando atender as exigências da OMS em relação aos parâmetros de sensibilidade e especificidade para testes sorológicos. Neste trabalhado visando atender as exigências da OMS, fizemos um estudo cuidadoso do método de Western blotting para pesquisa de anticorpos IgG para frações antigênicas de *M.tuberculosis* que apresentam valor clínico no diagnóstico e prognóstico na tuberculose pulmonar.

Utilizando uma casuística bem definida pela clínica, epidemiologia e laboratório, padronizamos o método de Western blotting e definimos parâmetros sorológicos que mostraram o seu real valor diagnóstico.

Para verificarmos um aumento na eficácia do diagnóstico laboratorial da tuberculose, fizemos associação de informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais (baciloscopia, cultura, Western blotting e QuantiFERON® - TB Gold). Os resultados mostraram que o método de Western blotting pode ser uma importante ferramenta diagnóstica quando a baciloscopia e a cultura apresentarem resultados negativos.

OBJETIVOS

GERAL

Associar os resultados laboratoriais com informações clínicas e epidemiológicas visando aumentar a probabilidade diagnóstica da tuberculose pulmonar humana.

ESPECÍFICOS

1- Padronizar o método de Western blotting com cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis*, para pesquisa de anticorpos IgG, verificando o seu desempenho no diagnóstico da tuberculose pulmonar.

2- Utilizar o teste "QuantiFERON® – TB Gold" nas amostras de soro selecionadas e analisar os seus resultados.

3- Dosar moléculas de adesão celular presentes na circulação dos pacientes estudados como marcadores de prognóstico na tuberculose humana frente à terapêutica instituída.

MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Grupo I: Pacientes com tuberculose pulmonar (N=31)

Durante o período de março de 2005 a dezembro de 2006, acompanhamos 31 pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no ambulatório de tuberculose do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-SP). Dos 31 pacientes, 17 tiveram o diagnóstico confirmado pela baciloscopia e cultura do escarro e seis pacientes tiveram o diagnóstico confirmado pela cultura. A identificação da espécie foi feita por análise microbiológica e por métodos moleculares. Em sete pacientes que tinham resultados negativos na baciloscopia e cultura do escarro e um paciente com resultado positivo somente na baciloscopia do escarro, o diagnóstico foi confirmado posteriormente pela microscopia e/ou cultura do lavado bronco alveolar ou biópsia.

O acompanhamento clínico/laboratorial foi realizado durante todo o período de tratamento. Amostras de sangue, dos 31 pacientes, foram colhidas antes do início da terapêutica (tempo zero), após dois meses e ao término do tratamento (6 meses), perfazendo um total de 93 amostras analisadas.

A idade média dos pacientes foi 39 anos (mínima de 19 anos e máxima de 68 anos). A média de tempo transcorrido entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico da doença foi três meses. Dos 31 pacientes entrevistados, 13% informaram já terem tido tuberculose no passado e 32%

referiram casos de tuberculose entre familiares e amigos. Doenças associadas como Diabetes *Mellitus* (3%), alcoolismo (9,6%), doenças auto-imune (6,4%), neoplasia (6,4%), foram relatadas pelos pacientes. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes são apresentados no Anexo A.

Grupo II: Indivíduos contactantes (N=25)

Foram analisadas nove amostras de soros de indivíduos com exposição ocupacional a pacientes com tuberculose e 16 amostras de soro de indivíduos que entraram em contato com pacientes com tuberculose ativa, acompanhantes dos pacientes com tuberculose não tratada no momento da consulta no ambulatório de tuberculose HC – SP. Não foi possível realizar o teste tuberculínico neste grupo.

Grupo III: Controle

Indivíduos sadios (N=10)

Foram colhidas 10 amostras de sangue de indivíduos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, que informaram não terem tido contato com pacientes com tuberculose pulmonar, sejam eles parentes ou não, e não apresentavam no momento de inclusão no estudo, qualquer sintoma clínico de tuberculose pulmonar. Não foi realizado o teste tuberculínico nestes indivíduos.

Pacientes com outras pneumopatias (N=10)

Amostras de soros de 10 pacientes com outras doenças pulmonares, onde a possibilidade de tuberculose pulmonar foi excluída, foram colhidas junto ao ambulatório de Pneumologia do Hospital das Clínicas de São Paulo. Na tabela 2 apresentamos o diagnóstico estabelecido para cada paciente pertencente ao grupo de outras pneumopatias.

Tabela 2 – Diagnóstico estabelecido para os 10 pacientes com outras pneumopatias.

Casos estudados (n=10)	Diagnóstico
3	Neoplasia
1	Silicose
1	Aspergilose
2	Fibrose intersticial pulmonar
1	Pneumotórax
1	Asma
1	Broncopneumonia

Doadores de Sangue (N=37)

Foram analisadas 37 amostras de soros de doadores de sangue de bancos de sangue de São Paulo, com resultados negativos na sorologia convencional de triagem.

2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os indivíduos incluídos no estudo foram informados sobre os aspectos científicos da pesquisa de forma clara e simples e da necessidade de se colher sangue por punção intravenosa.

Também foi assegurado que se algum indivíduo se recusasse a participar do estudo, não seria discriminado dentro da Instituição de Saúde e que todas as informações obtidas serviriam apenas ao propósito da pesquisa, sendo totalmente confidenciais.

As amostras de sangue foram colhidas dos indivíduos somente após assinatura do termo de consentimento.

O estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-SP) - CAPPesq, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP) e do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. OBTENÇÃO DE ANTÍGENO DE *Mycobacterium tuberculosis*

3.1 Cultivo de *M. tuberculosis*

O cultivo *in vitro* de *M. tuberculosis* foi realizado após aprovação pela Comissão de Ensino e Pesquisa da Divisão de Laboratório Central do HC-SP, que permitiu o uso das instalações do Laboratório de Microbiologia para o desenvolvimento desta parte experimental do trabalho.

A cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv utilizada no cultivo *in vitro* foi obtida junto à Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz. A bactéria foi cultivada em meio Löwestein-Jensen a 37 ºC por 30 dias.

A partir do crescimento obtido em meio de Löwestein-Jensen, foi realizado um subcultivo em meio líquido de Sauton. A preparação do meio foi realizada segundo protocolo descrito por Beck (2003). Inicialmente, foi utilizado 1 litro do meio de Sauton para cultivo a 37 ºC por quatro semanas. Os bacilos que cresceram na superfície do meio, em forma de película, foram utilizados como pré-cultivo em três novos frascos contendo 250 mL de meio líquido de Sauton, que foram então incubados por mais 10 semanas.

3.2 Obtenção de antígenos de *M. tuberculosis*

Em cabine de segurança biológica e em condições estéreis, a massa bacteriana foi colhida da superfície do meio líquido com o auxílio de uma alça descartável e transferida para um tubo plástico de 50 mL. Esta massa foi ressuspensa em 20 mL de solução salina tamponada com fosfatos 0,01M (PBS) acrescida de dietiltreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) na concentração final de 1mM, e centrifugada a 5 000 x g por 15 minutos a 5 ºC para retirada do meio de cultivo. Após centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 10 mL da solução PBS/DTT/EDTA/PMSF e submetido a sonicação por 20 ciclos de 1 minuto/80W, em banho de gelo, utilizando o sonicador Vibra Cell™ 72405 (BioBlock Scientific). O material sonicado foi centrifugado a 10 000 x g por

30 minutos a 4 ºC, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico e o sedimento foi desprezado. Este procedimento foi repetido por mais quatro vezes até não ser mais verificado material particulado no tubo plástico utilizado.

Ao sobrenadante transferido para um béquer foi adicionado, gota a gota, solução de sulfato de amônia 80% (volume a volume) para a precipitação das proteínas. Este procedimento foi realizado em banho de gelo e mantido sob agitação constante por 30 minutos. A mistura obtida foi mantida a 4 ºC por 24 horas, sendo posteriormente centrifugada a 10 000 x g por 15 minutos a 4 ºC.

O sedimento obtido foi lavado por duas vezes com sulfato de amônia 40% nas mesmas condições de centrifugação descrita anteriormente. Após a lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 3,0 mL de solução fisiológica 0,9%. A solução obtida foi dialisada contra solução fisiológica por 24 horas a 4 ºC, utilizando membrana de diálise (Sigma D-7884) capaz de reter proteínas com massa molecular maior que 2 000 Dalton. Foram realizadas três trocas da solução de diálise.

Após diálise, o conteúdo antigênico foi transferido para tubo tipo Eppendorf e centrifugado a 10 000 x g por 15 minutos a 4 ºC. O sobrenadante obtido foi aliquotado e mantido congelado em N_2 líquido, uma pequena alíquota foi separada para a dosagem do conteúdo protéico. Foram obtidos cinco lotes de antígenos de *M.tuberculosis*, seguindo os procedimentos descritos acima.

4. AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO PROTÉICO

Os cinco lotes de antígenos obtidos da cepa padrão de *M.tuberculosis* (H37Rv) foram analisados quanto ao conteúdo e perfil protéico.

4.1 Dosagem protéica

Para a dosagem do conteúdo protéico dos extratos antigênicos de *M.tuberculosis* foi utilizado o reagente comercial "Bio Rad Dc Protein Assay Reagent" (Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA), fundamentado no método de Lowry et al. (1951).

4.2 Reprodutibilidade dos extratos antigênicos

A análise do perfil de fracionamento protéico foi realizada para determinar a reprodutibilidade na obtenção dos diferentes lotes de extratos antigênicos de *M. tuberculosis* (H37Rv) e compará-los ao lote obtido de cepa clínica em 2002. Esta análise foi feita por Western blotting.

5. WESTERN BLOTTING

5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

As frações protéicas do extrato antigênico da cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970). O extrato antigênico foi avaliado nas concentrações de 2 µg e 3 µg por milímetro de gel, diluído em tampão de amostra contendo ou não 2-mercapto etanol (2-ME), aquecido por cinco minutos a 100 ºC e sem aquecer, foram aplicados separadamente no gel utilizando um molde com cavidades múltiplas de 5 milímetros, com espaçador de 1 milímetro.

O gel de poliacrilamida foi feito em duas concentrações 15% e 18% e o gel de empilhamento foi utilizado na concentração fixa de 5%. A eletroforese foi realizada em aparelho Mini-Protean III® (Bio-Rad) com voltagem inicial de 60 volts por 30 minutos, e após penetração no gel de corrida, a voltagem foi mantida a 120 volts até que o corante indicador atingisse o final do gel de separação.

O padrão de massa molecular utilizado foi o Rainbow™(Amersham Biosciences, RPN 755) pré-corado que compreende proteínas entre 2,5 a 45 kDa. As massas moleculares e cores definidas pelo fabricante são: ovoalbumina (45 kDa – amarelo), anidrase carbônica (30 kDa – laranja),

inibidor tripsina (20,1 kDa – azul), lisozima (14,3 kDa – magenta), aprotinina (6,5 kDa – azul escuro), cadeia β insulina (2,5 kDa – azul).

5.2 Transferência para membrana de nitrocelulose

Após a separação das frações antigênicas no gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio Rad nº162 – 0115n), por 18 horas a 20 Volts, em aparelho Mini Protean III® (Bio-Rad), como descrito por Towbin et al. (1979). O uso de padrão de massa molecular pré-corado auxiliou na verificação da eficiência do processo de transferência.

Após o término da transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada por 15 minutos, à temperatura ambiente, com leite desnatado 5% em PBS Tween 20 0,05% (PBS-Tw20). Em seguida a membrana foi lavada com PBS-Tw20 e colocada para secar entre folhas de papel toalha. Depois de seca a membrana foi cortada em tiras de 4 mm. As tiras foram numeradas e guardadas em tubos de vidro com sílica e armazenadas à 4ºC até a sua utilização nos testes.

5.3 Reação Imunoenzimática

As tiras de nitrocelulose, previamente bloqueadas e armazenadas, foram incubadas separadamente com o soro reagente e não reagente, para anticorpos anti - *M. tuberculosis*, diluídos a 1/100 em leite desnatado 0,5%

em PBS-Tw20, por 18 horas a 4 ºC. Após a incubação, as tiras foram lavadas com PBS-Tw20 seis vezes por cinco minutos cada. Para a detecção dos anticorpos, foi adicionado conjugado enzimático anti-IgG humana - peroxidase, diluído a 1/500 no mesmo diluente do soro e incubado por duas horas a temperatura ambiente. Novo ciclo de lavagem com PBS-Tw20 foi realizado e a reação foi revelada com solução cromogênica composta de 3 mg de 4-cloro-α-naftol (Sigma Chemical C., St. Louis, MO, USA), em 10 mL de metanol. Para cada 2 mL da solução cromógena acrescentou-se 10 mL de PBS e 4 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 volumes). Após 15 minutos ao abrigo da luz, as tiras foram lavadas com água destilada. Todas as incubações foram realizadas sob agitação constante.

As tiras foram colocadas para secar ao abrigo da luz e analisadas conforme o perfil imunológico de reatividade para as diferentes frações protéicas. A massa molecular das frações protéicas apresentadas foi estimada em relação ao padrão de massa molecular utilizado.

6. QUANTIFICAÇÃO DE INTERFERON – GAMA (IFN-γ)

Para a detecção e quantificação de IFN-γ em amostras de sangue de pacientes com tuberculose pulmonar e de indivíduos sadios foi utilizado o reagente comercial QuantiFERON® – TB Gold (Cellestis Limited, Austrália). O princípio do teste é baseado na detecção de IFN-γ, por ELISA, produzido por células T após terem sido estimuladas por antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10).

Quatro alíquotas de 1 mL de sangue total de cada indivíduo foram incubadas, em placas de cultura celular estéreis, a 37 ºC, por 24h na presença de antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10) e de controles, conforme orientação do fabricante.

Para a detecção de IFN-γ foram adicionados às cavidades das placas de poliestireno previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti - IFN-γ humano, 50 µL de cada sobrenadante e 50µL do conjugado enzimático (anti – IFN-γ humano – peroxidase). Após incubação por 120 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução cromogênica (tetrametilbenzidina - TMB/H_2O_2) e as placas foram incubadas por 30 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de solução bloqueadora (H_2SO_4 0,5 M). As densidades ópticas obtidas foram lidas em leitor de ELISA a 450 nm. Em cada ensaio realizado foram incluídos quatro padrões de IFN-γ humano em duplicata fornecidos pelo fabricante.

Para o ELISA ser considerado válido, o teste deve apresentar um coeficiente de variação menor que 15% e um coeficiente de correlação para a curva padrão maior que 0,98. Esses valores foram calculados pelo “software” fornecido pelo fabricante. Depois dessas verificações, as densidades ópticas obtidas para cada antígeno e controles foram convertidas em Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL) baseando-se na curva padrão gerada em cada ensaio. O resultado do teste foi considerado

como positivo quando os níveis de IFN-γ produzido após estímulo com ESAT-6 e/ou CFP-10 foram maiores ou iguais a 0,35 UI/mL já descontado o valor do controle negativo.

7. QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR

A quantificação das moléculas de adesão celular (P-selectina, E-selectina e sICAM-1) presentes no soro de pacientes com tuberculose pulmonar foi determinada utilizando reagente comercial Quantikine® ELISA kits (R&D System – USA), segundo o protocolo do fabricante.

7.1 P-selectina

Foram adicionados às cavidades da placa de poliestireno previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti – P-selectina humano, 100 µL de cada amostra de soro diluído a 1/20 em diluente apropriado e 100 µL do conjugado enzimático (anti – P-selectina humano – peroxidase). Após incubação por 1 hora em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução cromogênica (TMB/H_2O_2) e a placa foi incubada por 15 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução bloqueadora. As densidades ópticas obtidas foram lidas em leitor de ELISA a 450 nm. Em cada ensaio realizado foram incluídos cinco

padrões de P-selectina humano em duplicata e o controle positivo fornecidos pelo fabricante.

Para o ELISA ser considerado válido, o valor do controle positivo (soro humano contendo P-selectina) deve estar dentro do espectro esperado (494 – 749 ng/mL).

7.2 E-selectina

Foram adicionados às cavidades da placa de poliestireno previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti – E-selectina humano, 100 µL de cada amostra de soro diluído a 1/20 em diluente apropriado e 100 µL do conjugado enzimático (anti – E-selectina humano – peroxidase). Após incubação por 90 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução cromogênica (TMB/H_2O_2) e a placa foi incubada por 30 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução bloqueadora. As densidades ópticas obtidas foram lidas em leitor de ELISA a 450 nm. Em cada ensaio realizado foram incluídos cinco padrões de E-selectina humano em duplicata e o controle positivo fornecidos pelo fabricante.

Para o ELISA ser considerado válido, o valor do controle positivo (soro humano contendo E-selectina) deve estar dentro do espectro esperado (54,1 - 86,1 ng/mL).

7.3 sICAM-1

Foram adicionados às cavidades da placa de poliestireno previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti – sICAM-1 humano, 100 µL de cada amostra de soro diluído a 1/20 em diluente apropriado e 100 µL do conjugado enzimático (anti – sICAM-1 humano – peroxidase). Após incubação por 90 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução cromogênica (TMB/H_2O_2) e a placa foi incubada por 30 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução bloqueadora. As densidades ópticas obtidas foram lidas em leitor de ELISA a 450 nm. Em cada ensaio realizado foram incluídos cinco padrões de sICAM-1 humano em duplicata e o controle positivo fornecidos pelo fabricante.

Para o ELISA ser considerado válido, o valor do controle positivo (soro humano contendo sICAM-1) deve estar dentro do espectro esperado (217 - 292 ng/mL).

8. “Receiver Operating Characteristic Curve” (CURVA ROC)

Os diferentes pontos de corte (cut-off) onde são discriminados os indivíduos doentes dos não doentes resultam em diferentes índices de sensibilidade e especificidade de um teste.

A curva ROC é construída a partir dos diferentes pontos de corte de um teste; para cada ponto de decisão é colocada no eixo das ordenadas à taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) e no eixo das abscissas à taxa de falsos positivos (1 – especificidade). Portanto, a curva ROC permite o estudo do ponto de corte ideal para obterem-se os melhores índices de sensibilidade e especificidade de um teste, pois visa a melhor definição da região onde existe sobreposição de dados quando são colocados em gráficos os resultados obtidos de amostras de indivíduos doentes e sadios.

O critério de decisão para a curva ROC varia entre 0 a 100%. Estes valores são resultantes do cálculo da área sob a curva.

Na tabela 3 apresentamos a interpretação do teste de acordo com a área da curva ROC.

Tabela 3 – Interpretação do teste de acordo com a área sob a curva ROC

Área sob a curva ROC (%)	Interpretação do teste
90 – 100	excelente
80 – 90	muito bom
70 – 80	bom
60 – 70	regular
50	ruim

9. “LIKELIHOOD RATIO”

“Likelihood Ratio” (LR), também denominado de verossimilhança ou taxa de probabilidades, é utilizado para verificar, de maneira rápida e simples, a utilidade de um teste diagnóstico.

O LR permite determinar o quanto o resultado de um teste poderá aumentar ou diminuir a probabilidade de diagnóstico de um determinado paciente em relação a uma doença alvo, ou seja, o resultado de um teste ajudará a transformar a probabilidade pré-teste, determinada pela avaliação clínica inicial, em uma nova probabilidade pós-teste, cuja magnitude e sentido de variação são determinados pelo LR do teste (Hayden e Brown, 1999).

Na prática clínica, frequentemente, o valor clínico de um teste é avaliado através dos valores preditivos positivo e negativo, todavia estes valores sofrem a influência da prevalência da doença na população em estudo. Os valores de LR não sofrem esta influência, pois são aplicados na avaliação individual de cada paciente (Grimes e Schulz, 2005).

Para calcular o LR utilizamos os valores de sensibilidade e especificidade de um determinado teste. Podendo ser calculado tanto para resultados positivos como para resultados negativos do teste:

Para teste com resultado positivo: LR + = sensibilidade / 1 - especificidade

Para teste com resultado negativo: LR – = 1 - sensibilidade / especificidade

Quanto mais alto for o valor do LR + e mais baixo o valor do LR -, maior força terá o resultado do teste em alterar a opinião inicial do clínico em relação a uma determinada doença.

Tabela 4 – Influência do LR na probabilidade pós-teste

LR para resultado positivo	LR para resultado negativo	Efeito na probabilidade pós-teste
> 10	< 0,1	Grande
5 – 10	0,1 – 0,2	Moderado
2 – 5	0,2 – 0,5	Pequeno
1	1	Nenhum

10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando os programas Sigma Stat (Jandel Scientific) versão 1.0, Win Episcope 2.0 e Prisma versão 5.0. Os níveis de significância dos testes foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha = 0,05$). A comparação entre grupos múltiplos para amostras independentes foi feita pela análise de variância de Kruskal-Wallis, quando os dados eram não paramétricos. A verificação das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo método de comparação múltiplas de Dunn's. A comparação entre o mesmo grupo em duas situações diferentes foi feita pelo teste *t* pareado, quando os dados eram paramétricos.

RESULTADOS

1. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO DO ANTÍGENO DE *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)

Partindo do cultivo “in vitro” de *M.tuberculosis* (H37Rv) foram obtidos cinco diferentes lotes de antígeno como descrito nos itens 3.1 e 3.2 da metodologia. O conteúdo protéico foi determinado pelo reagente comercial “Bio Rad Dc Protein Assay Reagent”. Os resultados são apresentados na Tabela 5

Tabela 5 – Concentração protéica e volume final de cinco diferentes lotes de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)

Extrato antigênico	Concentração (μg/mL)	Volume obtido (mL)
Lote 1	2.617,31	2,0
Lote 2	2.972,00	2,0
Lote 3	2.301,00	2,5
Lote 4	2.226,25	2,0
Lote 5	2.170,00	2,5

Pelos dados da tabela 5, observamos que os cinco diferentes lotes de antígeno de *M. tuberculosis* apresentaram um rendimento semelhante ao considerarmos o volume final obtido e a concentração protéica.

2. PERFIS DE PROTEÍNAS DOS DIFERENTES LOTES DE ANTÍGENOS POR WESTERN BLOTTING

Ao avaliarmos o perfil de proteínas por Western blotting, verificamos que todos os lotes apresentaram perfis de proteínas semelhantes quando comparado com o lote de cepa clínica estocado no nosso laboratório (2002). Observamos na Figura **1** que nos diferentes lotes da cepa padrão (H37Rv) estão presentes as proteínas de baixa massa molecular situadas entre 45 a 3,5 kDa. A presença das proteínas com massa molecular estimada em 38, 30, 26, 16 e 6 kDa são de grande importância na determinação de perfis sorológicos. O padrão homogêneo, observado através das frações protéicas reveladas, assegura a boa reprodutibilidade dos lotes avaliados.

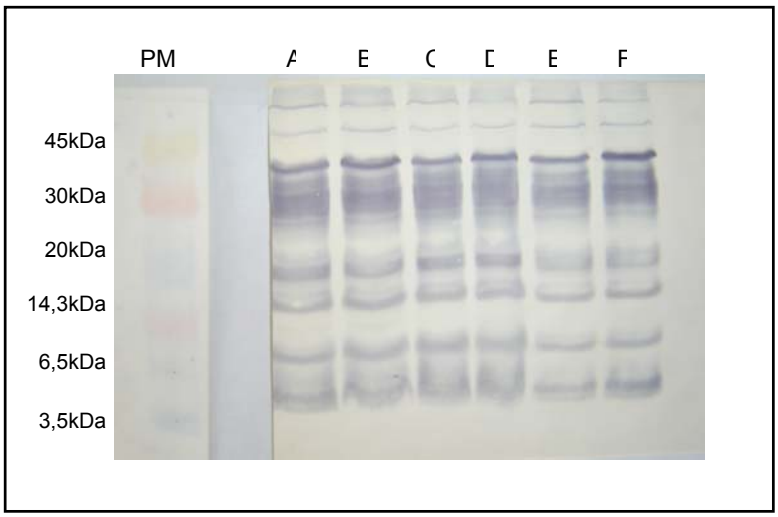

Figura 1. Western blotting realizado após separação eletroforética do antígeno protéico em gel de poliacrilamida 15% com soro reagente (1/100). **A** – lote de cepa clínica (2002); **B, C, D, E, F** – lotes 1, 2, 3, 4 e 5 de *M.tuberculosis* (H37Rv). **PM** - Padrão de massa molecular em KiloDaltons (kDa).

3. WESTERN BLOTTING

Beck (2003) padronizou o Western-Blotting utilizando antígeno protéico total obtido de cepa clínica de *M.tuberculosis*. Baseando-se nesta padronização fizemos um Western-Blotting com a cepa padrão H37Rv. Ao final da reação verificamos que a definição das frações protéicas reconhecidas pelos anticorpos dos pacientes não foi satisfatória, ou seja, não conseguimos definir os perfis de reatividade observados anteriormente com as proteínas de baixo peso molecular. Este resultado nos levou a reavaliar algumas fases da padronização realizada por Beck (2003).

3.1 Definição da concentração do gel de poliacrilamida

O perfil de proteínas observado em gel de poliacrilamida 15% mostrou-se melhor do que no gel 18%, quando avaliamos o perfil das frações antigênicas reconhecidas por anticorpos de pacientes com diferentes perfis sorológicos. Como o nosso interesse é por proteínas de baixo peso molecular (45kDa a 3,5kDa), verificamos também que estas proteínas estavam presentes mesmo utilizando um gel de concentração inferior ao inicialmente padronizado por Beck (2003). Os resultados são apresentados na figura 2.

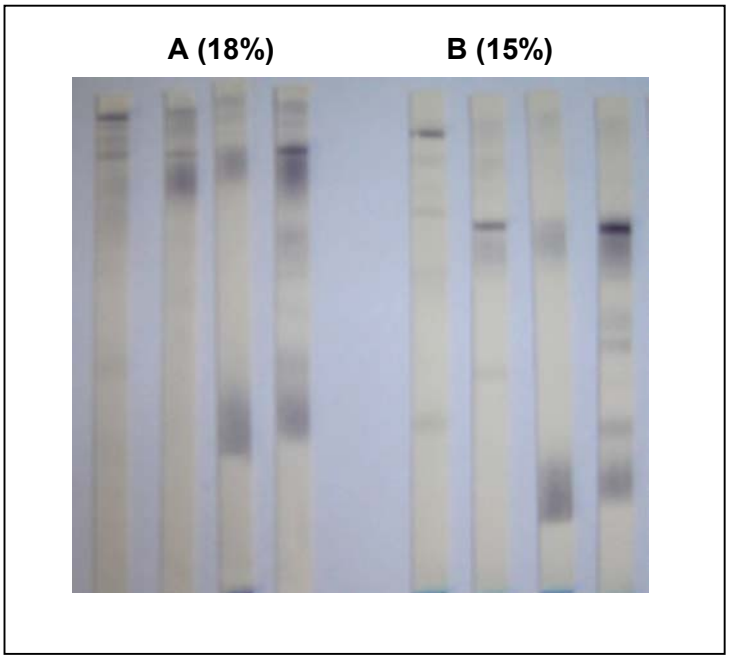

Figura 2. Western blotting realizado com soros de pacientes com diferentes perfis sorológicos (1/100). **A** – Western blotting após separação eletroforética do extrato protéico em gel de poliacrilamida na concentração de 18%. **B** - Western blotting após separação eletroforética do extrato protéico em gel de poliacrilamida na concentração de 15%.

3.2 Definição da concentração protéica e do extrato antigênico de *M.tuberculosis* (H37Rv) no Western blotting

A concentração de 2µg/mm de gel apresentou melhor definição das frações antigênicas reconhecidas pelos anticorpos de pacientes com tuberculose pulmonar.

A utilização de 2ME no tampão de amostra não alterou o padrão de corrida apresentado pelas proteínas reconhecidas pelo soro positivo, portanto optamos por não utilizá-lo em ensaios futuros devido a sua toxicidade. O extrato antigênico aquecido por 5 minutos foi o que apresentou os melhores resultados quando testado com soros de pacientes com diferentes perfis sorológicos como demonstrado na figura 3.

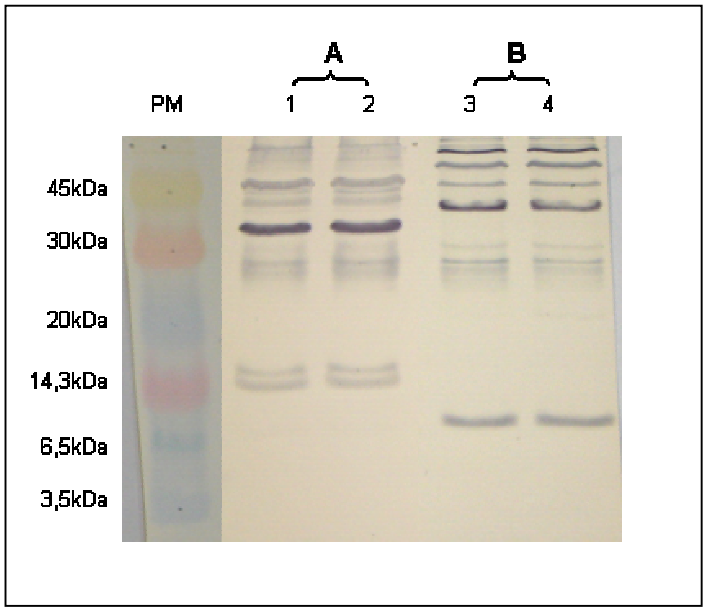

Figura 3. Western blotting realizado após separação eletroforética do extrato antigênico (H37Rv) em gel de poliacrilamida 15%, reatividade com soros (1/100) de pacientes com diferentes perfis sorológicos **(A e B)** e formas de tratamento do antígeno: **1 e 3** = antígeno sem aquecer; **2 e 4** = antígeno aquecido por 5 minutos. **PM** - Padrão de massa molecular em kiloDaltons (kDa).

4. WESTERN BLOTTING PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*M. tuberculosis*

Utilizando o Western blotting avaliamos a freqüência de reconhecimento de anticorpos IgG presentes nos soros dos grupos estudados, para as diferentes frações protéicas do extrato antigênico da cepa padrão de *M.tuberculosis*.

4.1 Grupo I: Pacientes com tuberculose pulmonar

As frações protéicas reconhecidas com maior freqüência pelos anticorpos presentes nos soros analisados, foram as de massas moleculares

estimadas entre 38 e 6kDa, sendo as regiões de 38, 30, 16 e 6kDa as reconhecidas com maior freqüência.

Ao analisarmos as frações reconhecidas pelos soros colhidos no pré-tratamento (1ª colheita), 31 (100%) dos pacientes apresentaram anticorpos que reagiram com a região de 38kDa, 24 (77%) reagiram com a região de 30kDa, 15 (48%) reagiram com a região de 16kDa, 20 (65%) reagiram com a região de 6kDa. A região de 26kDa foi a menos reconhecida pelos anticorpos dos pacientes (29%).

A análise dos soros dos 31 pacientes após dois meses de tratamento (2ª colheita), mostrou um aumento de 6% e de 12% no número de pacientes que reconheceram as frações protéicas de 26 e 6kDa, respectivamente. No término do tratamento (3ª colheita), observamos que o padrão de reconhecimento diminuiu para as regiões de 30, 16 e 6kDa e manteve-se o mesmo para a regiões de 38 e 26 kDa. (Figura 4)

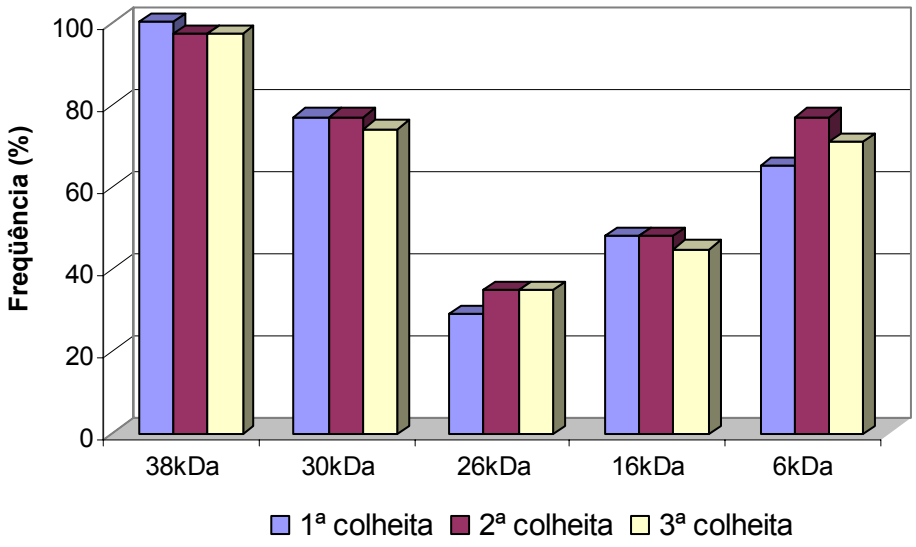

Figura 4. Freqüência de reconhecimento das frações protéicas por anticorpos IgG presentes nos soros de pacientes com tuberculose pulmonar colhidas no pré-tratamento – 1ª colheita; após 2 meses de tratamento – 2ª colheita; no término de tratamento – 3ª colheita.

4.2 Grupo II: Indivíduos contactantes

Entre as 25 amostras de soros de indivíduos contactantes, 19 (76%) apresentaram anticorpos IgG para a região de 6kDa, nove (36%) apresentaram anticorpos IgG para a região de 16kDa, seis (24%) apresentaram reatividade para a região de 38kDa e dois (8%) apresentaram reatividade para a região de 30kDa. A ausência de reatividade de anticorpos IgG para frações protéicas situadas entre a região de 38 e 6kDa foi observada em 6 (24%) indivíduos. Dos 19 pacientes que apresentaram anticorpos IgG para a região de 6kDa, 11 apresentaram reatividade para as regiões de 38 ou 30 e/ou 16kDa (Figura 5).

4.3 Grupo III: Controle

4.3.1 Indivíduos sadios

Entre os 10 soros de indivíduos sadios analisados, um (10%) apresentou anticorpos IgG para as regiões de 38 e 16kDa e outro apresentou anticorpos IgG para região de 16kDa (Figura 5).

4.3.2 Indivíduos com outras pneumopatias que não tuberculose

Entre as 10 amostras de soros de indivíduos com outras pneumopatias, três (30%) apresentaram reatividade para a região de 6 kDa e um (10%) para a região de 16kDa (Figura 5).

4.3.3 Doadores de banco de sangue

Das 37 amostras de soro de doadores de banco de sangue, representativos da população geral, 27 não apresentaram reatividade de anticorpos IgG para as frações protéicas situadas entre 38 e 6kDa. Com relação as 10 amostras que apresentaram reatividade, cinco (13,5%) apresentaram anticorpos IgG para a região de 30kDa, duas (5,4%) para a região de 26kDa, três (8,1%) para a região de 38kDa. Na figura 5 apresentamos a freqüência de reconhecimento das frações antigênicas de

38, 30, 26, 16 e 6 kDa por anticorpos IgG presentes nos soros dos diferentes grupos estudados.

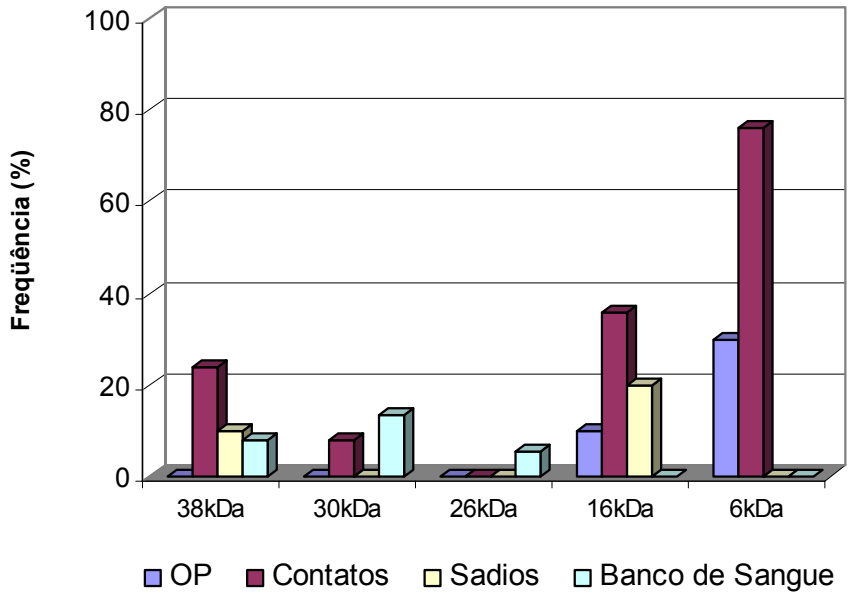

Figura 5 Freqüência de reconhecimento das frações protéicas de 38, 30, 26, 16 e 6kDa por anticorpos IgG presentes nos soros dos diferentes grupos estudados. **OP** = indivíduos com outras pneumopatias; **Contatos** = indivíduos que tiveram contato com paciente tuberculoso ou exposição ocupacional ao *M.tuberculosis*; **Sadios** = indivíduos sem contato prévio com tuberculose; **Banco de Sangue** = 10 indivíduos doadores de sangue.

Todos os indivíduos pertencentes ao grupo de não tuberculosos, compostos por indivíduos sadios, indivíduos com outras pneumopatias, banco de sangue e contactantes, diferiram com significância ($p<0,0001$ – Kruskal-Wallis) na freqüência de reconhecimento das frações antigênicas, 38, 30, 26, 16 e 6kDa, em relação ao grupo de pacientes com tuberculose pulmonar.

5. DESEMPENHO DO WESTERN BLOTTING NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR

A reatividade de anticorpos IgG para as frações antigênicas de 38, 30, 26, 16 e 6kDa nos diferentes grupos estudados, mostrou que a 1ª amostra de soro dos pacientes apresentou reatividade com pelo menos duas frações antigênicas. Enquanto que a maior parte dos indivíduos sadios, doadores de sangue e indivíduos com outras pneumopatias, apresentaram reatividade para uma fração antigênica.

A partir desses dados, quatro critérios foram estabelecidos para definirmos os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e "Likelihood Ratio" do Western blotting.

1. Reatividade de anticorpos IgG para 4 frações antigênicas; (38kDa ou 30kDa ou 26kDa ou 16kDa ou 6kDa);
2. Reatividade de anticorpos IgG para 3 frações antigênicas;
3. Reatividade de anticorpos IgG para 2 frações antigênicas;
4. Reatividade de anticorpos IgG para 1 fração antigênica;

Para a análise dos critérios em tabela de contingência 2x2, consideramos como negativos os indivíduos pertencentes ao grupo controle (n=57), e como verdadeiros positivos os pacientes com tuberculose pulmonar com confirmação do diagnóstico pela baciloscopia e/ou cultura do escarro, analise do lavado bronco alveolar e/ou biópsia (n=31). Dados

detalhados são apresentados no Anexo B. Na tabela 6, apresentamos os resultados dos parâmetros sorológicos para os critérios estabelecidos.

Tabela 6 – Parâmetros sorológicos determinados segundo os critérios de reatividade estabelecidos.

Reatividade	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
4 frações antigênicas	45	100	100	77
3 frações antigênicas	71	100	100	86
2 frações antigênicas	94	96	94	96
1 fração antigênica	100	77	70	100

S – Sensibilidade; E – Especificidade; VPP – Valor Preditivo Positivo; VPN - Valor Preditivo Negativo.

Para o critério de reatividade com quatro frações antigênicas, o Western blotting foi positivo em 14 de 31 pacientes com tuberculose pulmonar, sensibilidade de 45%. A especificidade encontrada foi de 100%, ou seja, dos 57 indivíduos do grupo controle, todos apresentaram resultado negativo no Western blotting para a reatividade com 4 ou mais frações antigênicas. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 100% e 77%, respectivamente.

Para o segundo critério, reatividade com três frações antigênicas, o Western blotting foi positivo em 22 de 31 pacientes com tuberculose pulmonar, sensibilidade de 71%, e especificidade de 100% para o grupo controle. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 100% e 86%, respectivamente.

Para o critério de reatividade com duas frações antigênicas, o Western blotting apresentou uma sensibilidade de 94%, foi positivo em 29 de 31 pacientes com tuberculose pulmonar; e uma especificidade de 96%, de 57 indivíduos sem a doença o teste foi negativo em 55. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 94% e 96%, respectivamente.

Para o quarto critério, reatividade com uma fração antigênica, o Western blotting foi positivo em todos os pacientes com tuberculose pulmonar, sensibilidade de 100%, e foi negativo em 44 de 57 amostras de soros dos indivíduos do grupo controle, especificidade de 77%. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 70% e 100%, respectivamente.

Como observamos na tabela 6, o critério de reatividade com duas frações antigênicas foi o que apresentou os melhores parâmetros sorológicos quando comparado aos demais, atendendo os requisitos da OMS para o diagnóstico sorológico da tuberculose, sendo então definido para a análise dos nossos resultados.

Na tabela 7 apresentamos os resultados de “Likelihood Ratio” positivo e negativo baseados nos resultados de sensibilidade e especificidade apresentados na tabela 6 para os diferentes critérios estabelecidos.

Tabela 7. Resultados de “Likelihood ratio” positivo (LR +) e negativo (LR -) para os critérios estabelecidos.

Reatividade	LR +	LR -
4 frações antigênicas	0,5	5,5
3 frações antigênicas	0,8	2,9
2 frações antigênicas	24	0,06
1 fração antigênica	0,43	1,16

LR + = “Likelihood ratio” positivo; LR - = “Likelihood ratio” negativo

Ao analisarmos a tabela 7, observamos que o critério de reatividade para duas frações antigênicas foi o que apresentou os melhores índices de “Likelihood ratio” positivo (24) e negativo (0,06). Os índices de LR+ e LR - são utilizados no Nomograma de Fagan para verificar a probabilidade pós-teste para uma determinada doença, neste caso a tuberculose pulmonar. Na figura 6 apresentamos o Nomograma de Fagan para a utilização dos índices de “Likelihood ratio”.

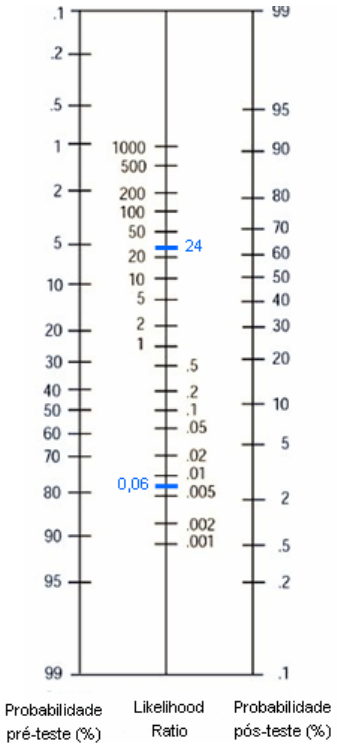

Figura 6. Nomograma de Fagan, em azul os índices de “Likelihood ratio” positivo (24) e negativo (0,06) para o critério de reatividade com duas frações antigênicas no Western blotting.

6. QUANTIFICAÇÃO DE INTERFERON-GAMA (IFN-γ)

Para a quantificação de IFN-γ nas amostras de sangue estudadas foi utilizado o reagente comercial QuantiFERON® – TB Gold, como descrito no item 6 da metodologia.

Dos 31 pacientes com tuberculose pulmonar foi possível realizar o teste em 29, em dois pacientes a quantidade de sangue colhido não foi suficiente para realizar o teste. Como controles negativos foram avaliados os indivíduos do grupo III. Na Tabela 8 são apresentados os parâmetros de sensibilidade e especificidade do teste nos grupos estudados.

Tabela 8 – Resultados do teste QuantiFERON® – TB Gold (QTF – G) nos pacientes com tuberculose pulmonar (doença presente) e no grupo controle (doença ausente)

QFT - G	DOENÇA		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	22	0	22
Negativo	7	10	17
Total	29	10	39

Dos 29 pacientes com tuberculose pulmonar, o teste apresentou resultado positivo em 22 pacientes, sensibilidade de 76%; dos 10 indivíduos sadios, o teste apresentou resultado negativo nas 10 amostras avaliadas, especificidade de 100%.

Na Figura 7 apresentamos a resposta individual de IFN-γ produzido após o estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 nos grupos estudados.

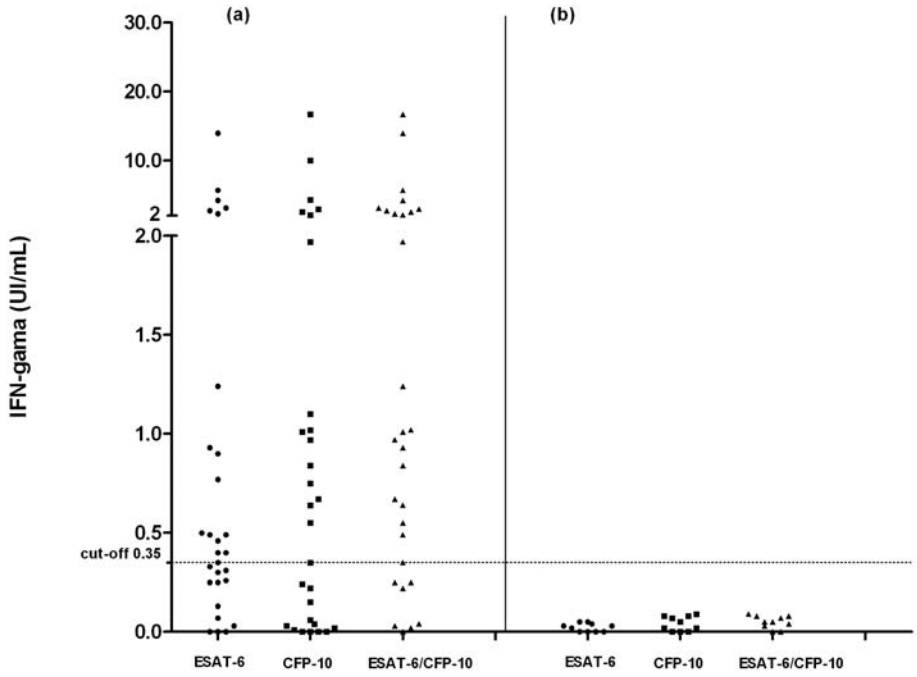

Figura 7. Resposta individual de IFN-γ produzido após estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 em 29 pacientes com tuberculose pulmonar (a) e em 10 indivíduos sadios (b). A linha pontilhada representa o ponto de corte ("cut-off") do teste definido pelo fabricante em 0,35 UI/mL.

A determinação do ponto de corte ("cut-off") do teste em 0,35UI/mL foi definido pelo fabricante em estudos realizados no Japão e países da Europa. Como podemos observar na Figura 7, os níveis de IFN-γ no grupo controle, são mais baixos que os valores observados nos pacientes com tuberculose pulmonar.

A partir desses dados, foi construída curva ROC para avaliarmos o melhor ponto de corte ("cut-off") do teste, de forma a obtermos o melhor índice de sensibilidade sem perda de especificidade. A acurácia do teste pode ser avaliada através da área sob a curva ROC.

A análise da curva ROC para os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10, permitiu verificar que ponto de corte ≥ 0,25 UI/mL de IFN-γ, resultou em uma

sensibilidade de 83% (IC 70 – 96,51) e especificidade de 100%, e a área sob a curva foi de 90% (IC 85,4 – 95,2) (Figura 8).

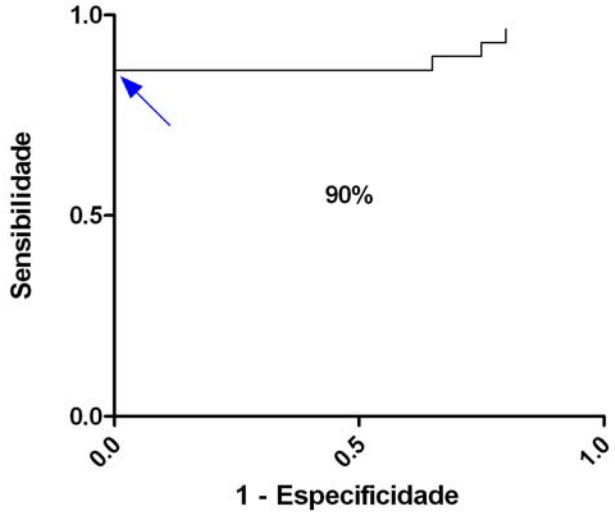

Figura 8. Curva ROC para ESAT-6 e/ou CFP-10; o ponto indicado representa valor de IFN-γ ≥ 0,25 UI/mL onde se obteve a máxima sensibilidade (83%) sem perda da especificidade (100%).

Considerando como resultado positivo níveis de IFN-γ ≥ 0,25 UI/mL, o teste detectou 24 de 29 pacientes com tuberculose pulmonar e foi negativo nas 10 amostras de indivíduos sadios. Na Figura 9 apresentamos a resposta individual de IFN-γ produzido após o estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 nos grupos estudados considerando o ponto de corte em ≥ 0,25 UI/mL IFN-γ.

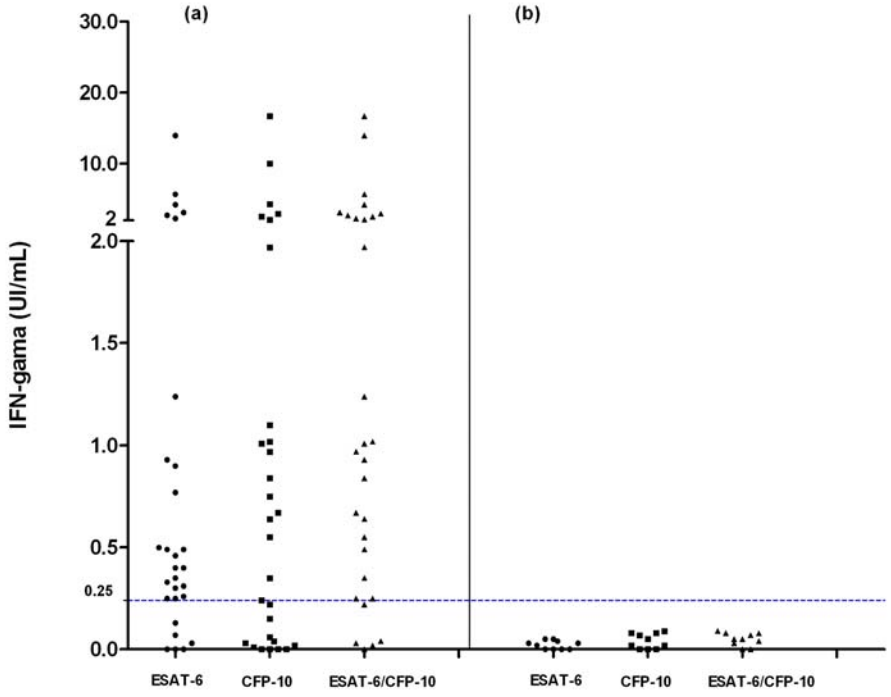

Figura 9. Resposta individual de IFN-γ, produzido após estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10, em 29 amostras de sangue de pacientes com tuberculose pulmonar (a) e em 10 indivíduos sadios (b). A linha pontilhada em azul representa o ponto de corte ("cut-off") em 0,25 UI/mL.

7. ASSOCIAÇÃO DOS RESULTADOS SOROLÓGICOS, MICROBIOLÓGICOS E RADIOLÓGICOS.

7.1 Western blotting – Baciloscopia – Cultura

Considerando como positividade no Western blotting a reatividade de anticorpos IgG, presentes nos soros dos pacientes, para duas frações antigênicas, apresentamos na tabela 9 os resultados do Western blotting, da baciloscopia e cultura do escarro de 31 pacientes com tuberculose pulmonar.

Tabela 9 – Resultados dos testes Western blotting, baciloscopia e cultura do escarro de 31 pacientes com tuberculose pulmonar.

Western blotting	Baciloscopia			Cultura		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	17	12	29	21	8	29
Negativo	1	1	2	2	0	2
Total	18	13	31	23	8	31

Dos 18 pacientes com resultado positivo na baciloscopia do escarro, 17 (94%) foram positivos no Western blotting e um paciente apresentou teve resultado negativo. Dos 13 pacientes com resultado negativo na baciloscopia do escarro, 12 (92%) foram positivos no Western blotting e um paciente foi negativo.

Dos 23 pacientes com resultado positivo na cultura do escarro, o Western blotting foi positivo em 21 (91%) e negativo em dois pacientes. Dos oito pacientes com resultado negativo na cultura do escarro, todos foram positivos no Western blotting.

A análise da positividade da baciloscopia, cultura e Western blotting mostrou diferença significativa ($p = 0,0055$ – Kruskal-Wallis; $p<0,05$ – método de Dunn's).

7.2. Western blotting – Exame Radiológico

Dos 31 pacientes com tuberculose pulmonar, 26 (84%) apresentaram alterações no exame radiológico. A presença de processo cavitário foi

observada em 16 pacientes, e a presença de infiltrado pulmonar foi observado em 24 pacientes.

A presença de processo cavitário ao exame radiológico relacionou-se de forma estatisticamente significante com a presença de reatividade para a fração protéica de 38kDa ($p = 0,0002$ – método de Wilcoxon), não estando relacionada com as outras frações protéicas estudadas. Entre os pacientes que apresentavam infiltrado pulmonar e processo cavitário, (54%) reagiram com a fração protéica de 38kDa.

7.3 QuantiFERON® – TB Gold (QTF - G) – Baciloscopia – Cultura

Após ajuste do ponto de corte ("cut-off") do teste QuantiFERON® – TB Gold para níveis de IFN-γ ≥ 0,25 UI/mL, comparamos os resultados do teste aos resultados da baciloscopia e cultura do escarro de 29 pacientes com tuberculose pulmonar (tabela 10).

Tabela 10 – Resultados dos testes QuantiFERON® - TB Gold (QTF – G), baciloscopia e cultura do escarro de 29 pacientes com tuberculose pulmonar.

QFT - G	Baciloscopia			Cultura		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	11	13	24	17	7	24
Negativo	5	0	5	5	0	5
Total	16	13	29	22	7	29

Das 16 amostras com resultado positivo na baciloscopia do escarro, 11 (69%) apresentaram resultado positivo no QTF – G, quantidades de IFN-γ (≥ 0,25UI/mL) presente no sobrenadante, e cinco foram negativas. De 13 amostras com resultado negativo na baciloscopia do escarro, todas apresentaram resultado positivo no teste.

Das 22 amostras com resultado positivo na cultura do escarro, 17 (77%) apresentaram resultado positivo no QTF – G e cinco foram negativas. De sete amostras com resultado negativo na cultura do escarro, todas (100%) foram positivas no teste.

Dos cinco pacientes com tuberculose pulmonar que apresentaram resultados negativos no teste e positivos na baciloscopia e cultura do escarro, um paciente tinha como co-morbidade Leucemia Linfóide Crônica e quatro apresentavam contagem de linfócitos inferiores aos valores de referência.

A análise da positividade da baciloscopia, cultura e QuantiFERON® - TB Gold não mostrou diferença significativa ($p = 0,05$ – Kruskal - Wallis).

7.4 QuantiFERON® – TB Gold (QTF – G) – Exame Radiológico

Foi avaliada se a presença de processo cavitário e infiltrado pulmonar, observados ao exame radiológico, estariam relacionados aos resultados obtido no teste QTF – G. Todavia, essas associações não foram significantes (p>0,05 – método Wilcoxon).

7.5 Western blotting e QuantiFERON® – TB Gold (QTF - G) relacionados à Baciloscopia e Cultura de escarro

Na tabela 11 apresentamos os resultados do Western blotting e QuantiFERON® - TB Gold relacionados à associação dos resultados da baciloscopia e cultura do escarro de 29 pacientes com tuberculose pulmonar.

Tabela 11 – Resultados do Western blotting e QuantiFERON® - TB Gold relacionados a associação dos resultados de baciloscopia e cultura do escarro de 29 pacientes com tuberculose pulmonar.

Associação dos resultados dos testes microbiológicos	WB		QTF - G	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Baciloscopia + e Cultura +	15	1	11	5
Baciloscopia - e Cultura +	5	1	6	0
Baciloscopia - e Cultura -	7	0	7	0
Total (n =)	27	2	24	5

+ = resultado positivo; - = resultado negativo; QTF - G = QuantiFERON® – TB Gold
WB = Western blotting;

Pelos dados apresentados na tabela 11, observamos que dos 16 pacientes com resultado positivo na baciloscopia e cultura do escarro, 15 foram positivos no Western blotting e 11 foram positivos no QTF – G. Dos seis pacientes com resultados negativos na baciloscopia e positivos na cultura do escarro, todos apresentaram resultado positivo no QTF - G e cinco foram positivos no Western blotting. Os sete pacientes com resultados negativos na baciloscopia e cultura do escarro, todos apresentaram resultados positivos no Western blotting e QTF – G.

Nos resultados discrepantes, verificamos que os dois pacientes com resultado negativo no Western blotting tiveram resultados positivos no QTF – G (níveis de IFN - γ de 0,84 e 13,9 UI/mL) e os cinco pacientes com resultado negativo no QTF – G, apresentaram reatividade com mais de 2 frações protéicas no Western blotting. Os resultados dos 29 pacientes nos testes Western blotting e QuantiFERON® – TB Gold (QTF- G) são apresentados na tabela 12.

Tabela 12 – Comparação dos resultados positivos e negativos dos testes Western blotting e QuantiFERON® – TB Gold de 29 pacientes com tuberculose pulmonar.

WB	QTF - G		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	22	5	27
Negativo	2	0	2
Total	24	5	29

WB = Western blotting;
QTF - G = QuantiFERON® - TB Gold

Como observamos na tabela 12, os resultados concordantes foram 22 de 29 pacientes com tuberculose pulmonar. Cinco pacientes com resultados negativos no QTF - G apresentaram resultado positivo no Western blotting e os dois pacientes com resultados negativos no Western blotting foram positivos no QTF - G.

8. QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR (ICAM – 1, E-SELECTINA, P-SELECTINA) NA EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR.

Para a quantificação das moléculas de adesão celular no soro dos pacientes com tuberculose pulmonar foi utilizado o reagente comercial Quantikine® ELISA kits como descrito no item 7 da metodologia.

Foi realizado o acompanhamento clínico e laboratorial de 31 pacientes com tuberculose pulmonar, destes, 18 pacientes foram selecionados para avaliarmos a quantificação das moléculas de adesão celular na evolução da terapêutica instituída.

Na figura 10 apresentamos as concentrações das moléculas de adesão celular ICAM-1; E-selectina e P-selectina, determinadas por ELISA, nas amostras de soros de 18 pacientes com tuberculose pulmonar, colhidas no inicio do tratamento (1ªC) e no término do tratamento (3ªC).

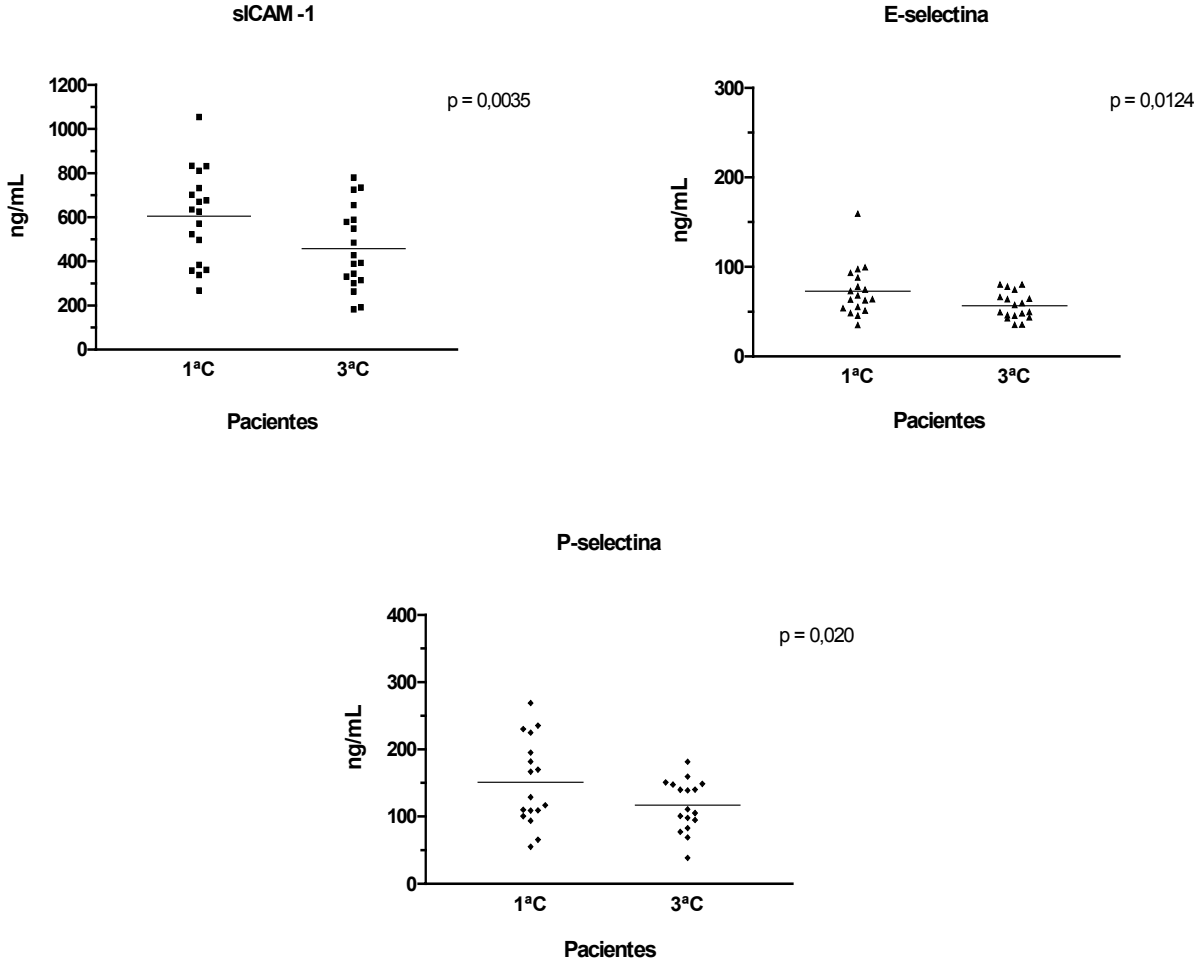

Figura 10: Distribuição das concentrações das moléculas de adesão celular ICAM-1; E-selectina e P-selectina, determinadas por ELISA, nas amostras de soros de 18 pacientes com tuberculose pulmonar, colhidas no inicio do tratamento (1ªC) e no término do tratamento (3ªC). A barra horizontal representa à média das concentrações

Ao analisarmos as concentrações das moléculas de adesão celular s-ICAM-1, E-selectina e P-selectina nas amostras de soros de 18 pacientes com tuberculose pulmonar, colhidas no início do tratamento (1ªC) e no término do tratamento (3ªC), observamos diferença estatisticamente significante (p = 0,0035 para sICAM-1; p = 0,0124 para E-selectina; p = 0,020 para P-selectina – teste *t* pareado). Estes pacientes, no início do tratamento, apresentavam alterações radiológicas importantes, como

presença de processo cavitário e infiltrado, e número de bacilos presentes na microscopia do escarro era superior a 2 cruzes. A diferença observada entre a 1ª colheita e 3ª colheita mostra uma boa evolução frente à terapêutica instituída.

DISCUSSÃO

“Um estado de emergência mundial”! Essa foi a declaração da OMS, em 1993, para a situação da tuberculose no mundo. Desde então uma série de medidas e metas foram adotadas, incluindo a necessidade da criação de parcerias entre indústrias de biotecnologia, grupos de pesquisas, órgãos oficiais de saúde e universidades para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas e de novos testes de diagnóstico, na tentativa de controlar a doença.

O diagnóstico precoce e o tratamento rápido e eficiente dos indivíduos bacilíferos, com tuberculose pulmonar ativa, são medidas essenciais para a redução da morbidade, mortalidade e incidência da tuberculose no mundo.

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico laboratorial da tuberculose nos países da Europa, América do Norte e Japão, a baciloscopia permanece como ferramenta principal na detecção e acompanhamento dos casos. Desenvolvida a mais de 100 anos, a baciloscopia apresenta uma sensibilidade de 40-60% em condições de campo, diminuindo para menos de 20% em pacientes co-infectados pelo HIV (WHO 2006).

Segundo a OMS, sem ferramentas diagnósticas adequadas não será possível controlar a epidemia da tuberculose. O desenvolvimento de novos testes de diagnóstico continua fazendo parte do novo planejamento mundial de controle da tuberculose para o período 2006-2015 (WHO/HTM/STB 2006). Parcerias público-privadas como a “Foundation for Innovative New Diagnostics” (FIND) foram criadas para integrar pesquisas e o desenvolvimento de testes, direcionando-os para a necessidade do paciente e condições locais de infraestrutura de saúde.

Cabe ressaltar que o diagnóstico da tuberculose em crianças e em pacientes com co-morbidades têm sido difícil, pois nem sempre a doença apresenta-se de forma clássica. Estas observações e as limitações encontradas nos métodos microbiológicos tradicionais, baciloscopia e cultura, levaram ao desenvolvimento de metodologias mais promissoras de biologia molecular e imunologia para auxiliar na investigação clínico-laboratorial da tuberculose humana.

Os testes de biologia molecular, apesar dos avanços obtidos, ainda são onerosos e complexos para serem aplicados rotineiramente nos países mais acometidos pela doença.

Muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de melhorar o desempenho dos testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose principalmente por serem testes de fácil execução, rápidos, e passíveis de serem implantados nos países em desenvolvimento. Porém, os testes disponíveis comercialmente apresentam valores de sensibilidade e especificidade abaixo do recomendado pela OMS, em 1997 (sensibilidade e especificidade superiores a 80% e 90%, respectivamente).

Sabe-se que a resposta imune na tuberculose é ampla e heterogênea, podendo variar de indivíduo para indivíduo e ser “fase” específica, ou seja, as proteínas expressas, pelo *M. tuberculosis*, durante a fase de latência podem ser diferentes das proteínas expressas durante a doença ativa. Portanto, os testes sorológicos apresentariam diferentes índices de sensibilidade, dependendo do antígeno utilizado, da classe de imunoglobulina pesquisada e da população em estudo. Outro fator que deve

ser considerado e que limita a sensibilidade dos testes comerciais são os antígenos recombinantes utilizados, que não possuem todos os epítopos presentes na proteína nativa, devido às próprias limitações da tecnologia de DNA recombinante (processamento transducional) (Gennaro, 2000; Samanich et al., 2001; Pai et al., 2006). Diante dessas limitações encontradas estão sendo avaliadas como a utilização de suportes sólidos, como a membrana de nitrocelulose, na imobilização de componentes antigênicos múltiplos para a pesquisa de anticorpos, a pesquisa de antígenos circulantes em fluídos biológicos e a detecção de citocinas (IFN-γ), produzidas por linfócitos T, após estímulo com antígenos específicos de *M. tuberculosis.*

Analisar criticamente o desempenho do Western blotting para pesquisa de anticorpos IgG anti - *M.tuberculosis*, como ferramenta auxiliar no diagnóstico da tuberculose pulmonar, pareceu – nos uma proposta viável, além de uma alternativa que poderia melhorar a investigação clínico-laboratorial da tuberculose humana. Sob este foco iniciamos nosso trabalho.

O extrato antigênico proveniente do cultivo de cepa padrão H37Rv de *M.tuberculosis* foi escolhido para a realização deste estudo, por ser amplamente utilizado nos trabalhos encontrados na literatura (Laal et al., 1997; Franco et al., 2001). Utilizando a mesma condição de cultivo, já desenvolvida no laboratório para cepa clínica, observamos uma boa reprodutibilidade do perfil protéico e um rendimento similar (considerando volume final e a concentração protéica) do extrato antigênico, quando cinco diferentes lotes foram comparados.

A avaliação do perfil de proteínas por Western blotting, evidenciou ainda que todos os lotes apresentavam perfil de proteínas semelhantes quando comparado ao lote da cepa clínica (Figura 1). Betts et al. (2000) fazendo um estudo comparativo de proteomas de duas cepas virulentas de *M. tuberculosis* (H37Rv e cepa clínica CDC 1551), concluíram que o padrão de proteoma era semelhante, e que a cepa padrão H37Rv poderia continuar sendo utilizada para estudos de mecanismos da doença, apesar do tempo que está sendo mantida no laboratório.

Observamos também que nos diferentes lotes de extratos antigênicos, estavam presentes as proteínas com massas moleculares estimadas em 38, 30, 26, 16 e 6 kDa, de grande importância no diagnóstico e determinação de perfis sorológicos como definido anteriormente. O padrão homogêneo observado na definição das frações antigênicas assegurou uma boa reprodutibilidade dos lotes avaliados.

Baseando-se em estudos de padronização realizados em nosso laboratório por Beck (2003), fizemos o Western blotting com a cepa padrão H37Rv, nas mesmas condições, e verificamos ao término da reação que a definição das frações protéicas reconhecidas por anticorpos dos pacientes com tuberculose pulmonar não foi satisfatória, o que nos levou a reavaliar algumas fases dessa padronização.

Definimos a concentração do gel de separação em 15% ao avaliarmos o perfil de reatividade das frações antigênicas reconhecidas por soros de pacientes com diferentes perfis sorológicos, pertencentes a nossa soroteca. Na Figura 2 apresentamos os resultados do Western blotting,

frente aos soros de pacientes com tuberculose ativa. Verificamos, nas condições estabelecidas grande qualidade na definição das frações antigênicas de baixa massa molecular, o que garantiu a continuidade do trabalho.

Outros pontos importantes na padronização do Western blotting foram as definições da concentração do extrato antigênico por milímetro de gel e sua forma de tratamento para melhor evidenciar as proteínas de massa molecular baixa. A facilidade de leitura na identificação das frações antigênicas reconhecidas por soros de pacientes com tuberculose em diferentes estágios da doença, foi fator determinante da padronização.

Outro fator importante que garantiu a reprodutibilidade dos resultados durante todo o estudo foi a utilização de um único lote de extrato antigênico. Essa observação é muitas vezes negligenciada nas pesquisas e pode refletir em erros quando os ensaios são repetidos.

Após a definição das condições adequadas para a realização do Western blotting, verificamos a freqüência de reconhecimento de anticorpos IgG presentes nos soros dos grupos estudados, para as diferentes frações protéicas do extrato antigênico da cepa padrão de *M. tuberculosis.*

A freqüência de reconhecimentos das frações antigênicas com massas moleculares estimadas em 38, 30, 26, 16 e 6 kDa nas amostras de soros dos pacientes colhidas pré-tratamento foi comparada a outros estudos descritos na literatura corroborando assim os nossos resultados (Figura 4).

Beck et al. (2005a) verificaram a importância do reconhecimento das regiões 38, 26, 16, e 6 kDa por soros dos pacientes com tuberculose pulmonar.

A reatividade para a região de 30 kDa foi verificada em 24 (77%) pacientes. Uma Devi et al. (2003) avaliaram por ELISA a resposta humoral de pacientes com tuberculose pulmonar frente ao complexo antigênico 85 (30 - 32 kDa) e verificaram a presença de anticorpos IgG em 118 de 175 pacientes com tuberculose pulmonar. Segundo Orme (2001), as proteínas pertencentes ao complexo antigênico 85 são secretadas quando temos atividade metabólica da micobactéria, o que indicaria atividade do microrganismo, com progressão da doença na avaliação clínica do paciente.

O antígeno de 38kDa considerado específico para o bacilo da tuberculose, sua expressão encontra-se aumentada na presença de processos cavitários, onde ocorre o aumento da replicação extracelular da bactéria. Anticorpos anti-38kDa têm sido frequentemente detectados nos soros de pacientes com tuberculose pulmonar e estão relacionados a multiplicação bacilar e a certos eventos patológicos associados à estágios avançados da doença (Jackett et al., 1988; Bothamley, 1995; Samanich et al., 2001). Verificamos em nosso estudo que a região de 38kDa foi reconhecida pelos soros de todos os pacientes com tuberculose pulmonar, esses apresentavam processos cavitários observados no exame radiológico, multiplicação bacilar (carga bacilar) e hemoptise em alguns pacientes.

A fração antigênica com massa molecular estimada em 16kDa foi reconhecida pelos soros colhidos pré-tratamento de 48% dos pacientes com

tuberculose pulmonar. Estudos realizados por Verbon et al. (1994), Laal et al. (1997), mostraram freqüências de reconhecimento similares 50% e 62%, respectivamente. Segundo Samanich et al. (2001) essa menor freqüência de reconhecimento pode ser devida à presença de imuno-complexos nas amostras de soros de pacientes com a doença. A proteína de 16kDa é expressa em condições de estresse oxidativo *in vitro*. Recentemente foi descrito o reconhecimento desta proteína por células T (através da detecção de IFN-γ) de indivíduos com evidência prévia de infecção por *M.tuberculosis*. Todavia a avaliação clínica e epidemiológica mostrou que esses indivíduos eram assintomáticos e não referiram exposição recente ao *M. tuberculosis*. Segundo Demissie et al (2006) estes dados sugerem fortemente que de fato a proteína de 16kDa é expressa durante a infecção latente.

A região de 6 kDa foi reconhecida pelos soros de 65% dos pacientes com tuberculose pulmonar. As proteínas de baixa massa molecular (6 – 12 kDa) pertencem à família ESAT-6 que são secretadas pelo *M. tuberculosis* e expressas em fase recente da infecção. Estudos têm demonstrado que estas proteínas são reconhecidas por células T e reagem com anticorpos de pacientes com tuberculose, sendo consideradas antígenos imunodominates (Skjöt et al, 2000; Arend et al, 2000; Smith 2003). Está sendo observada também uma forte associação entre a resposta *in vitro* ao antígeno ESAT-6 (através da detecção de IFN-γ) e progressão tardia da tuberculose em indivíduos sadios contactantes de pacientes com tuberculose ativa (Arend et al., 2000; Doherty et al., 2002).

Para os indivíduos contactantes avaliados por Western blotting, foi verificado que 76% (19/25) apresentaram anticorpos para a região de 6kDa e 36% apresentaram reatividade para a região de 16kDa. Esta alta freqüência de reconhecimento diferiu da observada por Beck et al. (2005a). A análise do perfil desses indivíduos mostrou que dos 19 com reatividade para a região de 6kDa, 11 apresentavam reatividade simultânea com as regiões de 38 e/ou 30 e/ou 16kDa.

Nos indivíduos pertencentes ao grupo controle foi observado uma menor freqüência no reconhecimento individual das regiões 38, 30, 26,16 e 6kDa, a qual foi estatisticamente significante ($p<0,05$) quando comparada à freqüência observada nos pacientes com tuberculose pulmonar (Figura 5). Dos 57 indivíduos avaliados apenas dois apresentaram reatividade simultânea para duas frações antigênicas (38 e 16kDa; 16 e 6kDa).

Comparando a reatividade de anticorpos IgG para as regiões de 38, 30, 26, 16 e 6 kDa, verificou-se que a 1ª amostra de soro dos pacientes apresentava reatividade simultânea com pelo menos duas frações antigênicas, enquanto que a maior parte dos indivíduos do grupo controle apresentava reatividade para uma fração antigênica.

Partindo dessas observações estabelecemos quatro critérios (reatividade para quatro, três, duas e uma fração antigênica) para definirmos os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e o “Likelihood ratio” do Western blotting, para a pesquisa de anticorpos IgG anti – *M. tuberculosis*.

Cabe relembrar que foram considerados como verdadeiros positivos os pacientes com tuberculose pulmonar com confirmação do diagnóstico pela baciloscopia e/ou cultura do escarro, pela análise do lavado bronco alveolar ou biópsia e como negativos os indivíduos do grupo controle.

A reatividade para duas frações antigênicas, entre os critérios estabelecidos, foi a que apresentou os melhores parâmetros sorológicos, com sensibilidade de 94%, especificidade de 96% e valores preditivos positivo e negativo de 94 e 96%, respectivamente (Tabela 6). Estes resultados atendem os requisitos da OMS para o diagnóstico sorológico da tuberculose (sensibilidade superior a 80% e especificidade superior a 90%).

Beck et al. (2005a) ao definirem quatro perfis sorológicos no Western blotting, reatividade para 3 frações antigênicas (38, 26, 16 kDa; 38, 26, 6 kDa e 26, 16, 6 kDa) e reatividade para 4 frações antigênicas (38, 26, 16, 6 kDa), obtiveram uma sensibilidade de 75% em pacientes com baciloscopia positiva e de 30% em pacientes com baciloscopia negativa, com especificidade variando de 92 a 100%.

Os índices de sensibilidade e especificidade encontrados em nosso estudo foram mais altos que os obtidos por Beck et al (2005a). Este resultado deve-se ao fato que consideramos como critério de positividade no Western blotting a reatividade simultânea, de anticorpos IgG presentes nos soros dos grupos estudados, para duas frações antigênicas, e possivelmente pela utilização de cepa padrão H37Rv e as condições estabelecidas na padronização do teste.

Na prática clínica, frequentemente, o resultado de um teste é avaliado pelos valores preditivos positivo e negativo. Para a reatividade com duas frações antigênicas no Western blotting obtivemos um valor preditivo positivo de 94% e negativo de 96%. Todavia, estes valores sofrem a influência da prevalência da doença na população em estudo.

Atualmente os índices de “Likelihood ratio” estão sendo utilizados para verificar o real valor clínico de um teste com a vantagem de não sofrerem a influência da prevalência da doença, pois são aplicados na avaliação individual do paciente. Sabe-se que quanto maior for o valor do LR positivo e menor for o valor de LR negativo, melhor será a utilização do teste em aumentar ou diminuir a probabilidade de diagnóstico de um determinado paciente em relação a uma doença (Hayden e Brown, 1999). Os índices de LR positivo e negativo são utilizados no Nomograma de Fagan para verificar a probabilidade pós-teste, como demonstrado na Figura 6.

Segundo Neves et al. (2004), quase a metade dos casos de tuberculose pleural, no Rio de Janeiro, inicia o tratamento sem um diagnóstico definitivo. Para discriminar a tuberculose pleural de outras causas de efusão pleural, os autores associaram variáveis como: idade, dosagem de proteína, porcentagem de linfócitos e dosagem da enzima adenosina deaminase (ADA). Associando os resultados das quatro variáveis obtiveram um “Likelihood ratio” positivo maior que 10 e um “Likelihood ratio” negativo menor que 0,1. Ao considerarem uma probabilidade pré-teste de 50% para a tuberculose pleural, com o LR positivo maior que 10 a probabilidade pós-teste seria maior que 90% indicando a presença da

doença e com um LR negativo menor que 0,1 a probabilidade pós-teste seria menos de 10% indicando a ausência da tuberculose pleural.

Os valores de “Likelihood ratio” positivo e negativo obtidos em nosso estudo foram de 24 e 0,06, respectivamente (Tabela 7). Se hipoteticamente considerássemos a probabilidade inicial de 40% para a tuberculose pulmonar, com um LR positivo de 24, a probabilidade pós-teste seria maior que 90% indicando a presença da doença e com um LR negativo de 0,06 a probabilidade pós-teste seria menor que 0,5% indicando a ausência da doença.

Devido a sua aplicabilidade na prática clínica índices de “Likelihood ratio” já estão sendo utilizados para melhorar o desempenho dos marcadores cardíacos para o diagnóstico e prognóstico em pacientes com dissecção aguda da aorta; na avaliação de pacientes com dispnéia na unidade de emergência clínica relacionada à possível infarto; em estudos de prognóstico para pacientes com AIDS e linfoma não Hodgkin diagnosticados na era da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART), em estudos de diagnóstico da mononucleose infecciosa (Ebell et al., 2004; Wang et al., 2005; Bower et al., 2005; Ohlmann et al., 2006).

A reposta imune mediada por células é de grande importância para controlar a progressão da doença e eliminar o patógeno. Como o *M.tuberculosis* é um microrganismo intracelular, avaliar se a células T dos pacientes foram expostas e sensibilizadas por antigos específicos deste patógeno forneceria uma metodologia alternativa para o diagnóstico da tuberculose humana (Andersen et al., 2000).

Para tanto, está sendo utilizado à quantificação de IFN – γ, produzido por células T, após estímulo com antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10). Utilizando o reagente comercial QuantiFERON® - TB Gold verificamos os parâmetros de sensibilidade e especificidade em 29 pacientes com tuberculose pulmonar e em 10 indivíduos sadios. Considerando o ponto de corte ("cut-off") estabelecido pelo fabricante em níveis de IFN-γ ≥ 0,35 UI/mL, obtivemos uma sensibilidade de 76% e especificidade de 100% (Tabela 8), inferiores aos definidos pela OMS para o diagnóstico da tuberculose. Nossos resultados estão de acordo com estudos realizados por outros pesquisadores (Lee et al., 2006; Ferrara et al., 2006; Tsiouris et al., 2006; Dewan et al. 2007).

As diferentes situações epidemiológicas da tuberculose no mundo e a exposição da população a diferentes microrganismos devem ser levadas em consideração na avaliação de novas metodologias para o diagnóstico de doenças. Analisando os resultados do QuantiFERON® - TB Gold verificamos que os níveis de IFN-γ nos indivíduos sadios eram significativamente inferiores aos dos pacientes, o que nos levou a estudar um novo ponto de corte. Utilizando a curva ROC determinamos o melhor ponto de corte em níveis de IFN-γ ≥ 0,25 UI/mL resultando em uma sensibilidade de 83% sem a perda de especificidade (Figura 7).

Após a definição dos parâmetros sorológicos (sensibilidade e especificidade) para a detecção de IFN-γ e IgG anti – M.*tuberculosis* por Western blotting, comparamos os resultados obtidos com os resultados dos testes microbiológicos.

Considerando como positividade no Western blotting a reatividade de anticorpos IgG para duas frações antigênicas (38 ou 30 ou 26 ou 16 ou 6kDa), verificamos que dos 18 pacientes com resultado positivo na baciloscopia do escarro, o Western blotting foi positivo em 17 (94%). Dos 13 pacientes com resultado negativo na baciloscopia do escarro 12 (92%) foram positivos no Western blotting (Tabela 9). Os resultados obtidos diferiram com significância ($p<0,05$).

Estudos sobre a sensibilidade do Western blotting na detecção de pacientes tuberculosos com baciloscopia positiva e negativa são escassos na literatura, o que nos levou a discutir os nossos resultados em função das informações clínicas e laboratoriais dos pacientes e do conhecimento literário do diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Ao analisarmos os resultados do Western blotting e da cultura do escarro, observamos que dos 23 pacientes com resultado positivo na cultura, 21 (91%) foram positivos no Western blotting e dos oito pacientes com cultura do escarro negativa, todos (100%) foram positivos no Western blotting (Tabela 9). A diferença observada foi significante ($p<0,05$).

Dois pacientes que foram considerados negativos no Western blotting, apresentaram apenas reatividade para uma fração antigênica, insuficientes para serem considerados como positivo pelo critério estabelecido. Todavia fica claro que esta é uma situação peculiar que pode ser reavaliada se fortes evidências clínicas, epidemiológicas e laboratoriais mostrarem tendência da doença nos indivíduos investigados.

Os dados mostram que o Western blotting auxiliou no esclarecimento de 22% dos casos onde os achados clínicos e radiológicos eram compatíveis com tuberculose e a baciloscopia e cultura eram negativas.

Ao associarmos os resultados do Western blotting às alterações radiológicas, observamos que a presença de processo cavitário relacionou-se de forma estatisticamente significante com a presença de anticorpos IgG para a região de 38kDa não estando relacionado com as outras frações antigênicas estudadas. Estes resultados também foram observados por outros pesquisadores (Samanich et al., 2001; Davidow et al., 2005).

Dos 31 pacientes com tuberculose pulmonar selecionados no nosso estudo foi possível realizar o teste QuantiFERON® - TB Gold em 29 pacientes como mencionado na seção de resultados deste trabalho.

Considerando o ponto de corte do teste em níveis de IFN-γ ≥0,25 UI/mL, verificamos que dos 29 pacientes com tuberculose pulmonar analisados pela baciloscopia do escarro e pelo QuantiFERON® – TB Gold, 16 foram positivos na baciloscopia (sensibilidade de 55%) e 24 foram positivos no QuantiFERON® – TB Gold (sensibilidade 83%).

Ravn et al. (2005) quando avaliaram 35 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, também verificaram que o teste QuantiFERON® - Tb Gold apresentou uma positividade de 83% (29/35) enquanto que a baciloscopia foi positiva em 16 de 35 pacientes com tuberculose pulmonar ativa (46%).

Analisando os resultados do QuantiFERON® – TB Gold em comparação com os resultados da cultura verificamos que em 22 pacientes com resultado positivo na cultura do escarro, 17 (77%) foram positivos no

teste e cinco foram negativos. Os sete pacientes com resultado negativo da cultura, todos apresentaram resultados positivos no QuantiFERON® - TB Gold.

Dos cinco pacientes com resultados positivos na baciloscopia e cultura e negativos no QuantiFERON® - TB Gold, um paciente tinha como co-morbidade Leucemia Linfóide Crônica e um apresentava contagem de linfócitos inferior aos valores de referência (1000 – 4500 linfócitos por microlitro). Com relação aos outros três pacientes, verificamos que apresentavam alterações radiológicas (presença de cavitação e/ou infiltrado) com baciloscopia positiva (2 e 4 cruzes) e ainda um paciente referiu hemoptise, essas informações sugerem doença mais avançada.

O seqüestro de células T no local de infecção, a inibição da resposta de células T por citocinas (TGF-β) liberada por macrógafos infectados são alguns fatores que podem explicar a fraca resposta de linfócitos T associada à doença mais avançada. Outro aspecto a ser considerado é que alguns epítopos da proteína ESAT-6 têm a sua apresentação restrita algumas moléculas de HLA (Ravn et al., 1999; Pathan et al., 2001; Silva, 2005; Ravn et al., 2005, Kobashi et al., 2006).

Neste sentido, à ausência de contagem diferencial de linfócitos T (CD4+ e CD8+) e de dados referentes à tipagem de HLA dos pacientes, limitaram uma melhor análise dos nossos resultados negativos no QuantiFERON® - TB Gold.

Contudo, a análise geral dos dados mostra que o QuantiFERON® - TB Gold auxiliou no esclarecimento de 24% dos casos onde os achados clínicos

e radiológicos eram compatíveis com tuberculose e a baciloscopia e cultura eram negativas.

A associação dos resultados dos testes microbiológicos tradicionais (baciloscopia e cultura) aumenta a sensibilidade na detecção dos casos. Estudos recentes têm avaliado o quanto os novos testes associados aos testes microbiológicos tradicionais aumentam a sensibilidade na detecção dos casos contribuindo para o controle da doença (Ravn et al., 2005).

Com esse objetivo, associamos os resultados da baciloscopia e cultura do escarro de 29 pacientes com tuberculose pulmonar para verificarmos o quanto o Western blotting e o QuantiFERON® – TB Gold auxiliaram no diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Dos 16 pacientes com resultados positivos na baciloscopia e cultura, 94% e 69% apresentaram resultados positivos no Western blotting e QuantiFERON® – TB Gold, respectivamente (Tabela 11). Dos seis pacientes com resultados negativos na baciloscopia e positivos na cultura, 100% foram positivos para detecção de IFN-γ e 83% foram positivos no Western blotting. Nos sete casos negativos na baciloscopia e cultura do escarro, todos apresentaram resultados positivos no Western blotting e no QuantiFERON® – TB Gold.

A análise dos resultados mostrou que o Western blotting e o QuantiFERON® - TB Gold detectaram 41% e 45 % mais casos que a baciloscopia, respectivamente. Um ponto de extrema importância foi à positividade do Western blotting e QuantiFERON® TB – Gold nos pacientes que apresentavam resultados laboratoriais de baciloscopia e cultura

negativos. Nesta situação os testes foram 100% sensíveis e totalmente compatível com a clínica e RX dos pacientes.

Como mencionado anteriormente, tivemos cinco pacientes com resultados negativos para a detecção de IFN-γ e positivos na baciloscopia e cultura e Western blotting. Dois pacientes com resultados positivos na baciloscopia e/ou cultura foram negativos no Western blotting, ambos apresentaram resultados positivos no QuantiFERON® - TB Gold (Tabela 12). Além dos testes Western blotting e QuantiFERON® – TB Gold se complementarem, auxiliando no diagnóstico da tuberculose pulmonar, se associarmos o Western blotting ou QuantiFERON® TB - Gold com a baciloscopia à sensibilidade seria superior a 95% e quando associados à cultura atingiriam sensibilidade de 100%.

Complementando o nosso estudo na busca de evidências laboratoriais que pudessem auxiliar a investigação clínica estudamos o papel das moléculas de adesão. Observamos que muitos pesquisadores têm avaliado se as formas solúveis das moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1 e selectinas) presentes nos soros de pacientes com tuberculose pulmonar poderiam auxiliar no diagnóstico da doença, na avaliação prognóstica dos pacientes frente à terapêutica instituída e se estariam associadas com severidade da doença (Lai et al., 1993; Shijubo et al., 1993; Demir et al., 2002; Mukae et al., 2003).

Lai et al. (1993) avaliaram se as moléculas de adesão (ICAM-1, VACM-1 e E-selectina) poderiam ser utilizadas como marcadores de doença ativa em 34 pacientes com tuberculose. Os autores sugerem que as

elevadas concentrações de ICAM-1 poderiam ser úteis como marcadores de doença ativa.

Demir et al. (2002) avaliaram os níveis da molécula de adesão celular ICAM-1, em 30 pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento. Os autores verificaram que houve uma diminuição significativa nos níveis de ICAM-1 nos soros de todos os pacientes após o término do tratamento, sugerindo que a detecção de ICAM pode ser útil no seguimento dos pacientes.

Mukae et al., em 2003, verificaram se as moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1, E, P e L- selectinas) presentes nos soros dos pacientes com tuberculose pulmonar refletiam severidade da doença. Segundo os autores elevadas concentrações de ICAM-1, P e E-selectinas correlacionaram com extensão de lesão pulmonar e com alta carga bacilar (número de bacilos estimados na baciloscopia), podendo estar relacionadas com severidade da doença.

Com mesmo intuito, inicialmente avaliamos os 31 pacientes com tuberculose pulmonar e verificamos a presença de elevadas concentrações das moléculas de adesão celular (ICAM-1, E e P-selectinas), as quais foram mais significativas nos pacientes que apresentavam alterações radiológicas e/ou resultado da baciloscopia superior a 2 cruzes (dados não mostrados).

Partindo desses resultados preliminares selecionamos 18 pacientes que apresentavam alterações radiológicas importantes e/ou apresentavam resultado na baciloscopia superior a 2 cruzes para verificarmos os níveis

séricos das moléculas de adesão celular (ICAM-1, E-selectina e P-selectina) durante a evolução do tratamento.

Ao compararmos as concentrações séricas das moléculas de adesão celular no início (1ª colheita) e após o término do tratamento (3ª colheita) (Figura 9), verificamos uma diminuição significativa ($p<0,05$), sugerindo que a detecção/quantificação das referidas moléculas de adesão celular pode ser sim útil no seguimento dos pacientes. Este estudo apesar de inicial, evidenciou uma boa evolução dos pacientes à terapêutica instituída.

Como mencionado anteriormente, observamos elevadas concentrações de ICAM-1, P e E- selectinas nos pacientes com presença de processos cavitários e infiltrados ao exame radiológico e nos indivíduos com alta carga bacilar, mostrando que elevadas concentrações dessas moléculas poderiam estar associadas a doença mais avançada, conforme já descrito, em 2003, por Mukae et al.

Entretanto pensamos que seriam necessários mais estudos para a avaliação dessas moléculas de adesão na prática clínica para, então, serem efetivamente utilizadas monitoramento da doença frente à terapêutica instituída.

CONCLUSÃO

1- A associação dos resultados do Western blotting e do QuantiFERON® - TB Gold com a baciloscopia forneceu índices sensibilidade superior a 95% e quando associados à cultura índice de sensibilidade de 100%

2- O Western blotting apresentou índices sensibilidade de 94% e especificidade 96% no diagnóstico da tuberculose pulmonar, auxiliando em 41% na detecção de casos com baciloscopia negativa.

3- O QuantiFERON® - TB Gold apresentou índices sensibilidade de 83% e especificidade de 100%, após ajuste do limiar de reatividade.

4- A diminuição significativa das concentrações das moléculas de adesão celular (ICAM-1, E-selectina e P-selectina) presentes nos soros de 18 pacientes com tuberculose pulmonar, colhidos no início e no final do tratamento, sugeriu um bom prognóstico frente à terapêutica instituída.

ANEXOS

ANEXO A – Informações clínicas e laboratoriais dos pacientes com tuberculose pulmonar

N	Sexo	Idade	Baciloscopia	Cultura	Caverna	Infiltrado	Sintomas	Hemoptise	Contato com TB
1	M	25	4+	Mtb	N/A	N/A	1	N	N/A
2	M	49	4+	Mtb	N	S	N/A	N	N/A
3	M	26	N	Mtb	N	N	N/A	N	N/A
4	M	66	4+	Mtb	S	N	1	N	N/A
5	M	21	4+	Mtb	N	S	2	N	N/A
6	M	34	2+	Mtb	S	S	3	N	S
7	M	40	N	Mtb	N	N	2	N	S
8	M	42	N	Mtb	S	S	1	N	N/A
9*	F	42	N	negativo*	N	S	7	N	S
10*	M	24	N	negativo*	N	S	3	S	N/A
11	M	23	N	Mtb	N/A	N/A	1	N	S
12	M	68	2+	Mtb	S	S	6	N	N/A
13	M	46	4+	Mtb	S	S	6	N	S
14	F	26	N	Mtb	S	S	2	N	N/A
15	M	55	4+	Mtb	S	N	N/A	N	N/A
16	M	40	4+	Mtb	S	S	2	S	S
17	M	50	2+	Mtb	N	S	12	N	N/A
18	F	42	3+	Mtb	N	S	8	N	N/A
19*	F	65	1+	negativo*	N	S	2	N	N/A
20	F	49	1+	Mtb	S	S	<1	N	N/A
21*	F	35	N	negativo*	S	S	4	N	N/A
22	F	34	4+	Mtb	S	S	2	S	S
23*	F	29	N	negativo*	S	S	2	S	S
24*	M	30	N	negativo*	S	S	N/A	S	N/A
25*	M	41	N	negativo*	N	S	N/A	S	N/A
26*	F	38	N	negativo*	N	N	4	N	S
27	M	53	4+	Mtb	N	S	N/A	N	N/A
28	F	37	N	Mtb	S	S	<1	N	N/A
29	F	21	1+	Mtb	S	S	N/A	N	N/A
30	F	41	3+	Mtb	S	S	2	N	N/A
31	M	19	2+	Mtb	N	S	1	S	S

*Diagnóstico de tuberculose confirmado por análise do lavado bronco alveolar ou biópsia
Sintomas - meses
N/A - sem informação

ANEXO A – Informações clínicas e laboratoriais dos pacientes com tuberculose pulmonar (continuação)

N	PPD	Co-morbidade	Leucócitos**	Linfócitos**	% Linfócitos	Western blotting	QTF ≥0,25 UI/mL
1	N/A	tabagista	N/A	N/A	N/A	38,30,26,6	positivo
2	N/A	N/A	8,42	0,9	11,2	38,26,16,6	positivo
3	N/A	N/A	14,09	2,1	14,8	38	positivo
4	N/A	alcoolismo	13,08	10	10,7	38,30,26,6	positivo
5	N/A	N/A	16,16	0,9	5,6	38,30,26	negativo
6	N/A	N/A	14	2,5	17,6	38,16,6	negativo
7	negativo	hipotireoidismo	7,23	1,1	14,6	38,30,16,6	positivo
8	N/A	anemia ferropriva	13,52	3	22,3	38,30	positivo
9*	N/A	N/A	14,21	2,3	16,3	38,6	positivo
10*	negativo	tabagista	12,22	3,2	25,9	38,30,16,6	positivo
11	N/A	N/A	11,16	2,1	18,7	38,30,16	positivo
12	N/A	alcoolismo	6,82	1,3	18,3	38,30	Não realizado
13	N/A	alcoolismo	10,55	1,8	16,9	38,30,26,16,6	negativo
14	20	N/A	8,33	1,1	13	38,30	positivo
15	N/A	LLC	63,3			38,30,16,6	negativo
16	N/A	tabagista	10,83	1,7	16	38,30,6	positivo
17	N/A	linfoma Hodgkin	9,56	0,5	5,4	38	positivo
18	N/A	S.Jögren	8,44	1,9	22,6	38,6	positivo
19*	N/A	N/A	5,88	2	33,8	38,30,6	Não realizado
20	15	diabetes	9,43	3,6	38,1	38,30,16	positivo
21*	N/A	gastrite	N/A	N/A	N/A	38,30,16,6	positivo
22	N/A	N/A	5,85	1,3	21,7	38,30,16,6	positivo
23*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	38,30,16,6	positivo
24*	N/A	N/A	9,6	2	21,1	38,30,26,6	positivo
25*	N/A	N/A	10,19	1,5	14,9	38,30,26,16	positivo
26*	18	depressão	9,55	2,1	21,5	38,16,6	positivo
27	N/A	albinismo, gota	6,21	0,5	8,2	38,30,6	positivo
28	20	N/A	8,61	2,3	26,6	38,30,26,16,6	positivo
29	N/A	N/A	10,23	1,9	18,9	38,30	positivo
30	N/A	AR	6,93	2	28,4	38,30	positivo
31	N/A	N/A	12,78	1,7	13,2	38,30,26,16,6	negativo

*Diagnóstico de tuberculose confirmado por análise do lavado bronco alveolar ou biópsia
** contagem leucócitos e linfócitos expressa em: mil / mm^3
N/A - sem informação

ANEXO B – Tabelas de contingência 2x2 para cada critério avaliado no Western Blotting

Reatividade anticorpos IgG para 4 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	14	0	14
Negativo	17	57	74
Total	31	57	88

VPP = 14 / 14 = 100%
VPN = 57 / 74 = 77%
LR + = 0,45 / 1 – 0,1 = 0,5
LR – = 1 – 0,45 / 0,1 = 5,5

Reatividade anticorpos IgG para 3 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	22	0	22
Negativo	9	57	66
Total	31	57	88

VPP = 22 / 22 = 100%
VPN = 57 / 66 = 86%
LR + = 0,71 / 1 – 0,96 = 0,8
LR – = 1 – 0,71 / 0,1 = 2,9

Reatividade anticorpos IgG para 2 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	29	2	31
Negativo	2	55	57
Total	31	57	88

VPP = 29 / 31 = 94%
VPN = 55 / 57 = 96%
LR + = 0,94 / 1- 0,96 = 24
LR – = 1- 0,94 / 0,96 = 0,06

Reatividade anticorpos IgG para 1 fração antigênica

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	31	13	44
Negativo	0	44	44
Total	31	57	88

VPP = 31 / 44 = 70%
VPN = 44 / 44 = 100%
LR + = 0,1 / 1 – 0,77 = 0,43
LR – = 1 – 0,1 / 0,77 = 1,16

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH. Imunologia celular e molecular. Tradução de Claudia Reali. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. Cap 6, p.109-29: Receptores de antígenos e moléculas acessórias dos linfócitos T.

Andersen P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol*. 1997;45:115-31.

Andersen P; Munk ME; Pollock JM; Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet.* 2000;356:1099-104.

API TB Consensus Guidelines 2006: Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations. *JAPI*. 2006;54:219-34.

Arend SM, Andersen P, Van Meijgaarden KE, Skjot RLV, Subronto YW, Van Dissel JT, Ottenhoff THM. 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.

Bassey EOE, Catty D, Kumararatne DS, Raykendalia C. Candidates antigens for improved serodiagnosis of tuberculosis. *Tuberc Lung Dis*. 1996;77:136-45.

Beck ST, Leite OHM, Arruda RS, Ferreira AW. Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycoabcterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. *Braz J Med Biol Res*. 2005a;38:587-96.

Beck ST, Leite OM, Arruda RS, Ferreira AW. Combined use of Western Blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. *Braz J Infect Dis*. 2005b;9:35-43.

Beck ST. Padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose humana [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2003.

Betts JC; Dodson P; Quan S; Lewis AP; Thomas PJ; Duncan K; McAdam RA. Comparison of proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology.* 2000;146:3205-16.

Bignal JR. Tuberculosis in England and Wales in the next 20 years. *Post Grad Med J*. 1971; 47:759-62.

Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M Human immunity to *M.tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis*. 2003;83:98-106.

Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J.* 1995;8(suppl 20):676-88.

Bower M; Gazzard B; Mandalla S; Newsom-Davis T; Thirlwell C; Dilon T; Young AM et al. A Prognostic index for systemic AIDS-related non-Hodgkin lymphoma treated in the era of highly active antiretroviral therapy. *Ann Intern Med.* 2005;143:265-273.

Centers for Disease Control and Prevention - U.S. Department of Health and Human Services, TB notes No. 1, 2000. Available from http://www.cdc.gov/nchstp/tb.

Centers for Disease Control and Prevention. Fact sheet – U.S. Tuberculosis cases at an all-time low in 2005, but drug resistance increasing. United States march, 2006. Available from: http://www.cdc.gov/ nchstp/tb.

Chan ED, Heifets I, Iseman MD. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber Lung Dis*. 2000;80:131-40.

Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnosis in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:711-20.

Chiang I, Suo J, Bai K, Lin T, Luh K, Yu C,.Yang P. Serodiagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:906-11.

II Consenso Brasileiro de Tuberculose. *J Brasil Pneumol*. 2004;30 (Suppl1):4-23.

Cooksey RC. Recent advances in laboratory procedures for pathogenic micobactéria. *Clin Lab Med*. 2003; 23:801-21.

Davidow A; Kanaujia GV; Shi L; Kaviar J; Guo X; Sung N; Kaplan G; Menzies D; Gennaro ML. Antibody profiles characteristic of Mycobacterium tuberculosis infection state. *Infect Immunity*. 2005;73:6846-51.

Demir T, Yalçinoz C, Keskinel J, Demiröz F, Vildirim N. SICAM -1 as a serum marker in the diagnosis and follow-up of treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6:155-9.

Demissie A, Leyten EMS, Abebe M, Wassie I, Aseffa A, Abate G, Fletcher H, Owiade P, Hill PC, Brookes R, Rook G, Zulma A, Arend SM, Klein M, Ottenhoff THM, Andersen P, Dorherty TM, Vacsel Study Group. Recognition of stage-specific mycobacteria antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis. Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:179-86.

Dewan PK; Grinsdale J; Kawamura LM. Low sensitivity of a whole-blood interferon-γ release assay for detection of active Tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007;44:69-73.

Doherty TM.; Demissie A, Olobo J, Wolday, D, Britton S, Eguale T, Ravn, P, Andersen P. Immune responses to the M*ycobacterium tuberculosis* – specific antigen esat-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:704-6.

Ducati RG, Basso lA, Santos DS. Micobactérias. In: Trabulsi IR, Alterthum F. Microbiologia. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2005.

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

Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*. 2006;367:938-40.

Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *American Family Physician*. 2004;70:1279-87 Available from:http//www.aafp.or/afp

Ferrara G, Losi M, D'Amico R, et al. Use in routine clincial pratice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*:prospective study. *Lancet*. 2006;367:1328-34.

Franco J, Camarena JJ, Nogueira JM, Blanquer R, Ruiz MJ, Marin J. Serological response (western blot) to fractions of *Mycobacterium tuberculosis* sonicate antigen in tuberculosis patients and contacts. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001; 5:958-62.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Boletim Eletrônico Epidemiológico no. 2. 2002. Disponível em: http//www.funasa.gov.br

Ganguly NK, What is new in the diagnosis of tuberculosis? Part I: techniques for diagnosis of tuberculosis. *ICMR Bulletin*. 2002;32 (8).

Garg SK; Tiwari RP; Tiwari D; Singh R; Malhotra D; Ramnani VK; Prasad GBKS; Handra R; Fraziano M; Colizzi V; Bisen PS. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations and possibilities. *J Clin Lab Anal.* 2003;17:155-63.

Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2000;30(Suppl 3):243-6.

Greenaway C; Lienhardt C; Adegbola R; Brusasca P; Mcadam K, Menzies D. Humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with tuberculosis in the Gambia. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 9:1112-9.

Grimes DA; Schulz KF. Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *Lancet.* 2005;365:1500-05.

Hayden SR; Brown MD. Likelihood ratio: A powerful tool for incorporating the results of a diagnostic test into clinical decisionmaking. *Ann Emerg Med*. 1999;33:575-80.

Houghton RL; Iodes MJ; Dillon DC; Reynolds ID; Day CH; Mcneill PD; Hendrickson RC; Skeiky YAW; Sampaio DP; Badaró R; Lyashchenko KP; Reed SG. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9:883–91.

Imaz MS, Zerbini E. Antibody response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* during and after treatment of tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4: 562-9.

Jackett PS, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of antibodies to immunodominant mycbacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1988;26:2313-8.

Kalantri Y, Hemvani N, Bhatia GC, Chitnis DS. Elisa kit evaluation for IgG and IgM antibodies to A-60 tubercular protein antigen. *Ind J Med Sci*. 2005;59:337-46.

Kaufmann SHE. New issues in tuberculosis. *Ann. Rheum. Dis*. 2004;63(Suppl):50-6.

Kobashi Y; Obase Y; Fukuda M; Yoshida K; Miyashita N; Oka M. Clinical Reevaluation of the QuantiFERON TB-2G test as a diagnostic method for differentiating active tuberculosis from nontuberculous mycobacteriosis. *Clin Infect Dis*. 2006;43:1540-6.

Kritski AL; Conde MB; Muzy de Souza GR. A bacteriologia da tuberculose. In Tuberculose do ambulatório à enfermaria. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p21-6.

Kritski AL; Conde MB; Muzy de Souza GR. A imunopatogenia da tuberculose. In Tuberculose do ambulatório à enfermaria. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p27-40.

Laal S; Samanich KM; Sonnenberg MG; Zolla-Pazner S; Phadtare JM; Besisle J. Human humoral responses to antigens of mycobacterium

tuberculosis immunodominance of high molecular-mass antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997;4:49-56.

Laemmli UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-85.

Lai CKW; Wong KC; Chan CHS; Ho SS; Chung SY; Haskard DO; Lai KN. Circulating adhesion molecules in tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 1993;94:522-6.

Landowski CP; Godfrey HP; Bentley-Hibbert SI; Liu X; Huang Z; Sepulveda R; Huygen K; Gennaro ML; Moy FH; Lesley SA; Haak-Frendscho M. Combinatorial use of antibodies to secreted mycobacterial proteins in a host immune system-independent test for tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2418-24.

Lee JY; Choi HJ; Park IN et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection *Eur Respir J.* 2006;28:24-30.

Leite OHM. Tuberculose. In Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p.221-9.

Lowry OH; Rosebrough D; Farr C; Randal RJ. Protein measure with the phenol reagent. *J.Biochem*. 1981;193:265-75.

Maekura R; Nakagawa M; Nakamura Y; Yamamura Y; Ito M; Ueda E; Yano S; He H; Oka S. Clinical evaluation of rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis by ELISA with cord factor (trehalose-6,6-dimycolate) as antigen

purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:997-1001.

Maekura R; Okuda Y; Nakagawa M; Hiraga T; Yokota S; Ito M; Kohno H. Clinical evaluation of anti-tuberculous glycolipid immunoglobulin G antibody assay for rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3603-08.

Manzano JR; Manterola JM; Ausina V; Sauret J. Nomenclatura y classificación de lãs micobactérias. *Arch. Bcopneumol*. 1998; 34:154-7.

Melo FFA; Afiune JB. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. *J. Pneumol*. 1993;19:11-8.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Controle da tuberculose – uma proposta de integração, ensino – serviço. 5a ed. Rio de Janeiro; 2002.

Mori T; Sakatani M; Yamagishi F; Takashima T; Kawabe Y; Nagao K 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.

Mukae H; Ashitani J; Tokojima M; Ihi T; Kohno S; Matsukura S. Elevated levels of circulating adhesion molecules in patients with active pulmonary tuberculosis. *Respirology*. 2003;8:326-31.

Nassau E; Parsons ER; Johnson GD. The detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis by microplate and enzyme-linked immunosorbent assay. *Tubercle*. 1976;57:67-70.

Neves DD; Dias RM; Cunha AJLA; Preza PCA. What is the Probability of a patient presenting a pleural effusion due to tuberculosis? *Braz J Infect Dis*. 2004;8:311-18.

Ohlmann P; Faure A; Morel O; Petit H; Kabbaj H; Meyer N et al. Diagnostic and prognostic value of circulating D-Dimers in patients with acute aortic dissection. *Crit Care Med*. 2006;34:1358-64.

Orme JM. The latent tuberculosis bacillus. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5:589-93.

Pai M; Kalantri S; Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006;6:423-32.

Pai, M; Riley lW; Colford JMJ. Interferon- assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:761–6.

Pathan AA; Wilkinson KA; Klenerman P; McShane H; Davidson RN; Pasvol G; Hill AVS; Lalvani A. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-γ-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: Associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol*. 2001;167:5217-25.

Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int. J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4(Suppl 12):182-8.

Pottumarthy S; Wells VC; Morris AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2227-31.

Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis.* 2003;83:4-14.

Raviglione MC; Snider JRDE; Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis – morbidity and mortality of a worldwide epidemic *JAMA.* 1995;273:220-6.

Ravn P; Demissie A; Eguale T; Wondwosson H; Lein D; Amoudy HA et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1999; 179:637-45.

Ravn P; Munk ME; Andersen AB; Lundgren B; Lundgren ED; Nielsen IN; Kok-Jensen A; Andersen P; Weldingh K. 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.

Rovatti E; Corradi MP; Amicosante M; Tartoni PL; Panini W; Ancora A; Cenci AM; Zucchi I; Monno I; Saltini C. Evaluation of western blot serum test for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J.* 1996;9:288-92.

Samanich K; Belisle JT; Laal S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immunity*. 2001;69:4600–09.

Samuelson J. Doenças infecciosas. In Cotran R, Kumar V, Collins T. Robins patologia estrutural e funcional. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Sarmiento OL; Weigle KA; Alexander J; Weber DJ; Miller WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41: 3233-40.

Schluger NW Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res*. 2001;2:157–163.

Schluger NW; Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:679-91.

Shijubo N; Imai K; Nakanishi F; Yachi A; Abe S. Elevated concentrations of circulating ICAM-1 in far advanced and miliary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:1298-1301.

Silva TM. Compartimentalização e ativação de linfócitos T na tuberculose pleural [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2005.

Silva VM; Cunha AJ; Oliveira JR; Figueira MM; Nunes ZB; Deriemer K; Kritski AL. Medical students at risk of nosocomial transmission of *Mycobaterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4: 420-6.

Singla R; Khan N; Al-Sharif N; Al-Sayegh, MO; Shaikh MA; Osman MM. Influence of diabetes on manifestations and treatment outcome of pulmonary TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis. 2006*; 10: 74-9.

Skjot RV; Oettinger T; Rosenkrands J; Ravn P; Brock I; Jacobsen S; Andersen P. Comparative evaluation of low molecular mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the esat-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect. Immun.* 2000; 68: 214-20.

Smith J. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:463-96.

Soini H; Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem.* 2001;47:809-14.

Stewart GR; Robertson BD; Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1:97-105.

SVS/MS Secretaria de vigilância em saúde/Ministério da Saúde. Vigilância em saúde: dados e indicadores selecionados. Departamento de análise de situação de saúde – ano 3, n. 3, (nov. 2005). Disponível em: www.svs.ms.gov

Towbin N; Satehelin T; Bordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1979;76:43650-4.

Tsiouris SJ; Coetzee D; Toro PL; Austin j; Stein Z; El-Sadr W. Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2844-50.

Tufariello JM; Chan J; Flynn J. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. Lancet Infect Dis. 2003;3:578-90.

Uma Devi KR; Ramalingam B; Raja A. Antibody response to *Mycobacterium tubercuosis* 30 and 16kda antigens in pulmonary tuberculosis with human immunodefiency virus coinfection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2003;46:205-09.

Van Pinxteren lAH; Ravn P; Agger EM; Pollock J; Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000:7155-160.

Verbon A. Development of a serological test for tuberculosis. *Trop Geog Med*. 1994;46:275-9.

Wang BL; Xu Y; Li ZM; Xu YM; Weng XH; Wang HH. Antibody response to four secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 9:1327-34.

Wang CS, FitzGerald JM, Schulzer M, Mak E, Ayas NT. Does this dyspneic patient in the emergency department have congestive heart failure? *JAMA.* 2005;294:1944-56.

Worl Heath Organization The Stop TB Strategy. 2006 Available from: htpp//www.who.org/htm/stb/2006.37

World Health Organization. 2006 Tuberculosis facts. Available from: http//www.who.org

World Health Organization. Diagnostics for tuberculosis : global demand and market potential / TDR, FIND SA. 2006. Available from: htpp://www.who.org

World Health Organization. Dots Stops TB at the source: WHO report on tuberculosis epidemic. 1995 Available from: http//www.stoptb.org/conference/decla.access.htlm

World Health Organization. Fifty - third world health assembly: stop tuberculosis initiative, report by the director – general, 5 may 2000. Available from: http//www.who.int/wha

World Health Organization. Global tuberculosis programme. Workshop report tuberculosis diagnosis.1997. Available from: http//www.who.org

World Health Organization. Report - Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. 2006. Available from: http//www.who.org.

World Health Organization. TB/HIV: clinical manual 2a. ed. Available from: http//www.who.org.

World Health Organization. Tuberculosis. WHO fact sheet nº. 104 revised march 2006. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104

APÊNDICE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ( ) F ( )
DATA NASCIMENTO:
ENDEREÇO: Nº: APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE:

2.RESPONSÁVEL LEGAL :
NATUREZA:
(grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:: SEXO: M( ) F( )
DATA NASCIMENTO:
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE:

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CLÍNICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
Padronização, Desenvolvimento e Aplicação de métodos imunológicos para a pesquisa de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* e correlação com fatores pró e anti inflamatórios decorrentes de resposta imune do hospedeiro frente a micobactéria para avaliação prognostica dos pacientes.

2. PESQUISADOR: Farmacêutica e Bioquímica Kelly Aparecida Kanunfre
CARGO/FUNÇÃO: Pós-graduanda - Doutorado INSC. CONS. REG. FARM. N^{o}: 30011
UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO: ☐ RISCO MINÍMO: **X** ☐ RISCO MÉDIO: ☐
RISCO BAIXO: ☐ RISCO MAIOR: ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA :30 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) em uma pesquisa para a padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico rápido e específico

da tuberculose humana, infecção causada pelo bacilo de *M. tuberculosis*. Antes de decidir se quer ou não participar, você precisa compreender o objetivo do estudo, como sua participação poderá ajudá-lo, os riscos decorrentes de sua participação e o que é esperado de você durante o estudo.

SEUS DIREITOS

Este termo de consentimento livre e esclarecido explica a pesquisa, porém o pesquisador responsável pelo projeto também poderá ler com você e dar as explicações, assim como poderá responder a qualquer dúvida que você venha a ter. Se você concordar em participar, você será solicitado(a) a assinar este termo de consentimento livre e esclarecido e receberá uma cópia para guardar. Ninguém pode forçá-lo(a) a participar deste estudo. Mesmo se concordar em participar agora, você poderá mudar de idéia e retirar seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a assistência a que tenha direito. Por favor, tenha certeza de ter revisado completamente este documento e de perguntar quaisquer dúvidas que lhe ocorram antes de assinar o mesmo.

OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo do estudo é padronizar testes de laboratório, para diagnóstico de pessoas infectadas com o bacilo da tuberculose. Com o resultado será possível iniciar rapidamente o tratamento das pessoas que se encontrarem com a doença ativa, contendo a sua transmissão. Serão também avaliadas as pessoas que mantiverem contato com o doente, para verificar provável contaminação.

Serão coletadas amostras de soro de 100 pacientes.

Grupo A: 50 pacientes com tuberculose pulmonar comprovada por exames clínicos e laboratoriais. Esses pacientes serão acompanhados durante a evolução do tratamento. Portanto, as amostras de soros serão coletadas antes do início do tratamento, após dois meses, após seis meses; totalizando três coletas.

Grupo B: 50 pacientes com outras doenças do pulmão, que não seja tuberculose

Para verificação de índice de contaminação serão coletadas amostras de soro de contactantes (familiares dos pacientes que se dispuserem a participar do estudo).

Como controle dos testes serão utilizadas amostras de soro de doadores de sangue (N=300).

PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, você será submetido(a) a uma entrevista a respeito das doenças que já teve, um exame clínico, exames de sangue.

Durante a pesquisa, serão retiradas amostras de sangue. Essas amostras serão usadas para verificar a presença de componentes antigênicos de micobactérias e anticorpos formados contra o bacilo da tuberculose. A presença destes anticorpos pode indicar se você entrou em

contato, de alguma forma, com o agente causador da Tuberculose. Caso você esteja com tuberculose ativa, será necessário solicitar a presença das pessoas que convivem com você, para que estas sejam examinadas, para verificar se elas também estão com a doença.

DESCONFORTOS E RISCOS

O sangue será coletado dentro das normas de segurança e dentro das dependências do hospital ou laboratório, com risco mínimo para você.

BENEFÍCIOS

Você estará colaborando para a realização de um teste que poderá auxiliar, no futuro, o diagnóstico da tuberculose. Este estudo não trará benefício direto para você.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá a garantia, a qualquer tempo, que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para o esclarecimento de qualquer dúvida.

2. Você não terá custos adicionais ao participar deste estudo. Todos os custos da consulta, dos profissionais médicos e enfermeiros e exames laboratoriais que forem parte deste estudo serão fornecidos gratuitamente. Você ou seu provedor de assistência médica serão responsáveis por quaisquer outros custos de assistência médica.

3. As pessoas envolvidas neste estudo, inclusive médicos e investigadores, terão acesso aos prontuários de forma que possam acompanhar o progresso da pesquisa. Não haverá nomes nem outra identificação dos pacientes em nenhum relatório ou publicação do estudo. Toda a informação médica adquirida durante este estudo será tratada como confidencial e será apenas dada a conhecer aos investigadores. Só os dados anônimos serão usados para possível publicação em publicações científicas.

4. Disponibilidade de assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, por eventuais danos à saúde, decorrentes desta pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Caso você apresente algum evento fora de seu período avaliação, você deverá entrar em contato com os investigadores e coordenadores deste projeto de pesquisa. Os investigadores são os Dr. Antonio Walter Ferreira, ou Kelly Aparecida Kanunfre, pelos telefones: 3085-0416 (horário comercial) ou 3062-2751.

Este termo de consentimento foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP, que é um grupo de pessoas que avaliam e aprovam ou não pesquisas ou estudos que envolvam pessoas. Este grupo de pessoas também avaliam o andamento do estudo.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Nenhuma

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Apenas voluntários serão incluídos como participantes neste estudo.

Recebi e li as informações relativas a este estudo. O desenho e o objetivo do estudo foram explicados de forma adequada, tive ampla oportunidade para fazer perguntas que foram respondidas satisfatoriamente. Estou ciente dos possíveis riscos (para a minha saúde e bem estar) envolvendo a minha participação neste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido, estou ciente que posso abandonar este estudo em qualquer altura, sem para isso dar razão e sem que isso tenha conseqüência negativa para o meu tratamento futuro. Consinto que se envie uma carta ao meu médico acerca da minha participação neste estudo, se for o caso. Consinto em participar deste estudo como descrito neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Quando você assinar na linha abaixo, isto significa que concorda em participar da pesquisa descrita acima. É preciso que a sua assinatura seja obtida antes da realização de qualquer procedimento do estudo.

Data : Hora:

_____

Assinatura do paciente

Data: Hora:

_____

Assinatura do responsável, quando pertinente

Data: Hora:

_____

Assinatura do investigador do estudo (nome e carimbo)

Data: Hora:

_____

Assinatura do coordenador do estudo (nome e carimbo)