UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

GABRIELA DE MORAES RÊGO GUEDES

AVALIAÇÃO DOS TESTES QUANTIFERON-TB GOLD E NESTED PCR EM ÚNICO TUBO NO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM PACIENTES IMUNODEPRIMIDOS

Recife
2013

Gabriela de Moraes Rêgo Guedes

Avaliação dos testes QuantiFERON-TB GOLD e Nested PCR em único tubo no diagnóstico de tuberculose em pacientes imunodeprimidos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica

Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Co-orientador(a): Profa. Dra. Haiana Charifker Schindler

Recife

2013

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

G924a Guedes, Gabriela de Moraes Rêgo

Avaliação dos testes Quanti-FERON-TB GOLD e Nested PCR em único tubo no diagnóstico de tuberculose em pacientes imunodeprimidos / Gabriela de Moraes Rêgo Guedes. – Recife: O Autor, 2013.

112 f. : il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Coorientadora: Haiana Charifker Schindler

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Tuberculose – Diagnóstico 2. Testes imunológicos 3. AIDS (doença) I. Pitta, Ivan da Rocha (orientador) II. Shindler, Haiana Charifker (coorientadora) III. Título.

616.995 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2013-193

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: GUEDES, Gabriela de Moraes Rêgo

Título: Avaliação dos testes QuantiFERON-TB Gold e *Nested* PCR em único tubo no diagnóstico de tuberculose em pacientes imunodeprimidos

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: ___/___/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Haiana Charifker Schindler

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Assinatura:_____

Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:_____

Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCCRUZ

Assinatura:_____

Dr. Fábio Lopes de Melo

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCCRUZ

Assinatura:_____

Dra. Rosana de Albuquerque Montenegro

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCCRUZ

Assinatura:_____

À minha avó, “Lala”, aos meus pais Vera e Laércio, ao meu marido Phelipe e aos meus irmãos, Carol e Lucas, por me amarem de forma incondicional e sempre me apoiarem nessa longa jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as coisas boas da minha vida e pela conclusão de mais uma etapa.

À minha querida "Vovó Lalinha" (*in memorian*) por todos os ensinamentos de vida e de amor repassados de maneira tão singela a todos que integram nossa família. Vovó, você sempre permanecerá em meu pensamento!

Aos meu pais, Vera e Laércio por terem plantado a semente da família, amor, carinho e dignidade e por serem responsáveis por tudo que sou hoje. Amo vocês!

Aos meus irmãos, por dividirem comigo todas as alegrias e tristezas que por ventura tivemos que passar.

Ao meu marido Phelipe por ser tão incentivador da minha difícil carreira e por todo amor oferecido. Te amo, meu amor!

Ao meu orientador Ivan da Rocha Pitta pela oportunidade desse Doutorado.

À minha orientadora Haiana Charifker Schindler por ter acreditado e me apoiado ao longo de todo o projeto. Obrigada!

À Lílian Lapa Montenegro pela sua idéia inovadora de dar início a esse projeto.

Aos meus amigos do Aggeu Magalhães, Juliana Figueirêdo, Fabiana, Laís, Klarissa, Heidi, Neide, Kaly, Marcela, Aline, Bruna, Andrea, André, Romero, Nathalya, Bárbara, Rosana e Juliana Falcão, pela ajuda técnica e pelas descontraídas "terapias". A todos vocês meu muito obrigado!

Às minhas eternas amigas, Sá, Ciça e Lu, por estarem ao meu lado em todos os momentos tristes e felizes da minha vida. Muito Obrigada!

Aos meus avós Cláudio e Lourival por sempre acreditarem em mim!

Aos meus sogros Joaquim e Nélia por me incentivarem incodicionalmente.

Aos meus tios, Lúcia, Lígia, Lenira, Laíse, Lena, Euvaldo e Nelson por todo o incentivo ao longo dessa jornada.

Aos meus amigos do Lab. Central/UFPE, Carol, Nadja, Júlio e Marcos André pela ajuda prestada ao longo dessa etapa.

A todos vocês, meu muito obrigado!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

RESUMO

Guedes, Gabriela de Moraes Rêgo. Avaliação dos testes QuantiFERON-TB GOLD e Nested PCR em único tubo no diagnóstico de tuberculose em pacientes imunodeprimidos. 2013. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A imunossupressão, causada por diversos fatores tais como desnutrição, doença auto-imune, infecção pelo HIV ou uso de drogas imunossupressoras tem contribuído com o aumento da incidência da tuberculose (TB) no mundo. O requisito essencial para o controle da TB é a identificação rápida e precisa dos indivíduos infectados. Os métodos convencionais (baciloscopia, cultura, histopatológico, radiografia de tórax e teste tuberculínico-TT) para diagnóstico da TB têm as suas limitações de especificidade, rapidez e sensibilidade. Ainda é uma tarefa desafiadora diferenciar pacientes com tuberculose ativa daqueles com lesões quiescentes, vacinação prévia com BCG ou outras doenças com sintomas semelhantes ao da TB. Portanto, o trabalho teve como objetivo principal avaliar o desempenho dos testes QuantiFERON®-TB Gold (QFT-GIT) e PCR único tubo (STNPCR) no diagnóstico da TB em pacientes imunodeprimidos. Foram selecionados 100 pacientes, que foram divididos em dois grupos: imunodeprimidos (n = 88) e controle (n = 12). As amostras biológicas (sangue, urina, LCR e escarro) de todos os indivíduos envolvidos foram submetidas aos testes QFT-GIT e STNPCR. A sensibilidade e especificidade do QFT-GIT, da STNPCR e do TT foram 57,4% e 95,3%; 64,3% e 91,4%; 69,2% e 98,1%, respectivamente. Os testes QFT-GIT e TT demonstraram uma concordância moderada (κ = 0,41). Dez pacientes apresentaram resultado indeterminado ao QFT-GIT e apenas 1 foi reagente ao TT. A maior frequência de TT reatores ocorreu nos indivíduos com contagem de T CD4+ >350 céls/μL. Entre os pacientes com TT reator, 60% possuíam vacina BCG, confirmada através da cicatriz vacinal e 46,7% relataram história prévia de TB. Apenas 20% dos pacientes com TB confirmada apresentaram cultura bacteriana positiva nas amostras (urina, LCR ou escarro). Os testes QFT-GIT e STNPCR não demonstraram utilidade na rotina dignóstica em pacientes imunodeprimidos. Portanto, o TT deverá continuar a ser usado para a triagem inicial de pacientes imunodeprimidos com suspeita de TB.

Palavras chave: Imunodepressão, Tuberculose, HIV, Quantiferon-TB Gold.

ABSTRACT

Guedes, Gabriela de Moraes Rêgo. Evaluation of tests QuantiFERON-TB GOLD and Nested PCR single tube in the diagnosis of tuberculosis in immunocompromised patients. 2013. Tesis (Ph.D.). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The immunosuppression caused by many factors such as malnutrition, autoimmune disease, HIV infection or immunosuppressive drugs has contributed to the increased incidence of tuberculosis (TB) in the world. The essential requirement for TB control is the rapid and precise identification of infected individuals. The essential requirement for TB control is the rapid and precise identification of infected individuals. Conventional methods (smear, culture, histopathology, chest radiography and tuberculin skin test-TT) for the diagnosis of TB have their limitations in specificity, sensitivity and rapidity. Is still a challenging task to differentiate patients with active tuberculosis from those with quiescent lesions, previous BCG vaccination or other diseases with similar symptoms to TB. Therefore, the work aimed to evaluate the performance of the tests QuantiFERON ®-TB Gold (QFT-GIT) and PCR single tube (STNPCR) in the diagnosis of TB in immunocompromised patients. 100 patients were selected who were divided into two groups: immunocompromised patients (n = 88) and control (n = 12). Biological samples (blood, urine, sputum and CSF) of all individuals involved were tested for QFT-GIT and STNPCR. The sensitivity and specificity of the QFT-GIT of STNPCR and TT were 57.4% and 95.3%, 64.3% and 91.4%, 69.2% and 98.1%, respectively. Tests QFT-GIT and TT showed a moderate agreement ($\kappa = .41$). Ten patients had indeterminate QFT-GIT and the only one was reactive to TT. The higher frequency of TT reactors occurred in individuals with CD4 counts> 350 cells/µl. Among patients with TT reactor, 60% had BCG vaccine, confirmed through the scar and 46.7% reported a history of TB. Only 20% of patients with confirmed TB had positive bacterial culture in the samples (urine, sputum, or CSF). Tests QFT-GIT and STNPCR not demonstrated utility in routine dignóstica in immunocompromised patients. Therefore, the TT should continue to be used for initial screening of immunosuppressed patients with suspected TB.

Keywords: Immunosupression, Tuberculosis, HIV, Quantiferon-TB Gold

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estimativa Global da Tuberculose em 2010. 20

Figura 2 - Taxa de incidência (por grupo de 100 mil habitantes) da tuberculose no Brasil, de 1990 a 2015. 22

Figura 3 - Resumo da sequência dinâmica de eventos que regulam a formação do granuloma no curso da infecção por Mycobacterium tuberculosis 29

Figura 4 - Baciloscopia corada pela técnica de Ziehl-Neelsen 36

Figura 5 - Princípio do QFT-GIT 42

Figura 6 - Tubos para coleta sanguínea utilizados na dosagem do interferon-γ. 51

Figura 7: Meio Löwenstein-Jensen contendo culturas de *M. tubeculosis*. 52

Figura 8: Estágios de processamento do QFT-TB. 54

Figura 9: Preparação da curva padrão. 55

Figura 10: Fluxograma que apresenta a distribuição dos resultados QFT-GIT nos pacientes TT reatores e não reatores. 61

Figura 11: Frequência dos resultados positivos aos testes QFT-GIT e TT nos pacientes HIV positivos, estratificados pelo número de células T CD4+ circulantes. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Número de BAAR observados nas baciloscopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos. 37

Tabela 2 - Intepretação dos resultados do QFT-GIT 56

Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes do estudo. 59

Tabela 4 - Desempenho dos testes TT, QFT-GIT e STNPCR de acordo com o estado imunológico dos pacientes. 62

Tabela 5 - Concordância (κ) entre os testes TT, QFT-GIT e STNPCR, aplicados em todos os indivíduos envolvidos no estudo. 64

Tabela 6 - Resultados positivo, negativo e indeterminado para QFT e TT em pacientes HIV, estratificado pela contagem de células T CD4+. 63

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

AAN – Amplificação de ácidos nucléicos
BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente
BCG – Bacilo Calmette-Guérin
CDC - *Center for Disease Control*
CFP-10 - *culture filtrate protein* 10
CPqAM - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DIP – Doença Infecto Parasitária
DSCTAC - *Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children*
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ESAT-6 - *early secretory antigen target* 6
HC – Hospital das Clínicas
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
IC – Intervalo de confiança
IFN-γ - Interferon-γ
IGRA - *Interferon-Gamma Release Assay*
IL - Interleucina
ITBL – Infecção tuberculosa latente
LCR- Líquido cefalorraquidiano
LJ - Löwenstein-Jensen
MS – Ministério da Saúde
MNT – Micobactéria não tuberculosa
NICE – *National Institute for Health and Clinical Excellence*
NK – *Natural killer*
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PPD – Derivado proteico purificado
QFT- GIT – QuantiFERON-TB Gold in Tube
STNPCR – *Single Tube Nested* PCR
TARV – Terapia anti-retroviral
TB – tuberculose
TGF-β - Fator de transformação do crescimento-β.
TLR – Receptor *Toll-like*
TNF-α - fator de necrose tumoral-α
TT – Teste tuberculínico
UT – Unidades de tuberculina
VPN – Valor preditivo negativo
VPP – Valor preditivo positive

SUMÁRIO

1. Introdução 16

2. Objetivos 18

2.1 Geral 18
2.2 Específicos 18

3. Revisão da literatura 19
3.1 Epidemiologia 19
3.1.1 Tuberculose no Mundo 19
3.1.2 Tuberculose no Brasil 22
3.2 Fisiopatologia 23
3.3 Tuberculose e imunodepressão 25
3.4 Imunologia da tuberculose 28
3.5 Diagnóstico da Tuberculose 31
3.5.1 Teste Tuberculínico (TT) ou Teste de Mantoux 33
3.5.2 Radiografia de Tórax 34
3.5.3 Baciloscopia 35
3.5.4 Cultura 37
3.5.5 Histopatológico 38
3.5.6 Métodos Imunológicos 39
3.5.6.1 QuantiFERON-TB Gold In Tube 41
3.5.7 Teste Molecular – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 43
3.6 Tratamento 46

4. Material e Métodos 48
4.1 População e Local de estudo 48
4.2 Casuística 49
4.3 Critérios de definição de caso de TB: Padrão-ouro 49
4.4 TesteTuberculínico 49
4.5 Coleta de amostras biológicas 50
4.5.1 Sangue 50
4.5.2 Urina e outros fluidos biológicos 50
4.6 Isolamento de células mononucleares 51
4.7 Descontaminação e cultura da urina e outras amostras 52
4.8 Extração de DNA 53
4.9 QuantiFERON-TB Gold In Tube 53
4.10 *Nested* PCR em único tubo (STNPCR) 56
4.11 Análise estatística 58

5. Resultados 59
5.1 Características clínicas dos pacientes 59
5.2 Desempenho dos testes diagnósticos 60
5.3 Níveis de células T CD4+ 63

6. Discussão 65
7. Conclusões 73

8. Referências Bibliográficas 74

9. Anexos 98
9.1 Termo de Consentimento 98
9.2 Ficha Clínica 100
9.3 Comitê de ética em Pesquisa 103
9.4 Relato de caso 104

1. INTRODUÇAO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo álcool ácido resistente (BAAR), e que afeta principalmente os pulmões, mas pode atingir qualquer órgão do corpo. Amplamente difundida no mundo, permanece como uma das infecções mais devastadora sendo considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública, sobretudo nos países em desenvolvimento (GONZÁLEZ-MARTÍN *et al*., 2010). O Brasil está entre os 22 países responsáveis por 82% do total de casos no mundo (BRASIL, 2012). O Estado de Pernambuco registrou, em 2011, um total de 4.096 novos casos (BRASIL, 2012).

O diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais para a eficácia dos programas públicos de controle da doença, os quais buscam curar os doentes e evitar a transmissão da doença. O tratamento inadequado ou a não aderência do mesmo pelo paciente, quer seja por abandono ou efeitos adversos da medicação, são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da resistência na tuberculose (DUCATI *et al.*, 2006).

Nos últimos anos observou-se em várias regiões do mundo, um aumento do número de casos da doença, inclusive associada com o vírus HIV. Nos países em desenvolvimento, a TB é a maior causa de mortalidade entre pacientes infectados por HIV (CONDE *et al*., 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada por *Micobacterium tuberculosis*; anualmente, ocorrem cerca de 9,2 milhões de casos novos de TB. São identificados 5 milhões de casos novos soropositivos para o HIV; sendo a maior causa de morte por doenças transmissíveis no mundo. Diversas evidências sugerem que a co-infecção TB/HIV é responsável pelo aumento na incidência de TB em várias regiões do mundo. Por meio de dados de vigilância epidemiológica estima-se que em 2005, em domínio mundial, houve um total de 1,6 milhões de mortes por TB, e destes, 195.000 pacientes estavam infectados por HIV.

O diagnóstico da TB é comumente realizado através dos dados da história clínica e epidemiológica e dos achados radiológicos do paciente, sendo geralmente inespecíficos nas formas paucibacilares. Os métodos diagnósticos mais comuns para a detecção da TB são a baciloscopia realizada com auxílio da coloração de Ziehl-Neelsen, uma metodologia rápida, barata e acessível, mas que requer pelo menos 10^4 bacilos/ml, e a cultura que é mais sensível,

porém o resultado pode demorar entre 3 a 8 semanas (BACH, 2003; CAMPOS, 2006). A comprovação bacteriológica torna-se ainda mais difícil nos casos onde a doença está associada a outras enfermidades e nas formas paucibacilares (LIMA *et al.*, 2009).

A aplicação de técnicas moleculares e imunológicas para o diagnóstico e o monitoramento clínico através da quantificação do *M. tuberculosis* está ganhando cada vez mais atenção (BROCCOLO *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, a metodologia que utiliza a dosagem de interferon gama (QFT-GIT) tem sido considerada um grande avanço no diagnóstico da tuberculose (PAI & MENZIES, 2007; STOUT & MENZIES, 2008; HARDY *et al*, 2010; RANGAKA *et al*., 2012). Há dois testes disponíveis para dosar citocinas: o QuantiFERON-TB Gold *in tube* e o T-SPOT.TB chamados *interferon gama release assay* – IGRA, que utiliza antígenos mais específicos do *Mycobacterium tuberculosis* (III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2009).

Os testes de amplificação de ácidos nucléicos (AAN) surgiram com o intuito de fornecer ao clínico um resultado mais rápido e preciso (BENTO *et al.*, 2011). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular que vem sendo utilizada como alternativa de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas (OGUSKU & SALEM, 2004). A Nested-PCR em único tubo/Single tube Nested-PCR (STNPCR) tem a vantagem de ter menor risco de contaminação, quando comparada com a Nested-PCR convencional.

Os métodos diagnósticos da TB, atualmente disponíveis, possuem diversas limitações, sobretudo quando utilizados em pacientes imunodeprimidos. Testes imunodiagnóstico mostram-se promissores, podendo superar lacunas presentes nos testes convencionais. Métodos de diagnósticos moleculares baseados na metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) têm também apresentado excelentes resultados de desempenho, principalmente quando foram avaliados em pacientes com tuberculose extrapulmonar, forma predominantes nos imunodeprimidos.

Portanto, diante das dificuldades diagnósticas, expostas, este estudo teve como foco principal a avaliação de novas metodologias de base imunológica e molecular que auxiliem na decisão clínica para confirmação da doença, em pacientes que possam adoecer gravemente por serem portadores de doenças consumptivas como HIV, doença renal crônica, entre outras.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o desempenho do teste imunológico QuantiFERON®-TB Gold e do método molecular baseado em *Nested* PCR único tubo no diagnóstico da tuberculose em pacientes imunodeprimidos.

2.2 Específicos

- Avaliar o método QFT-GIT como teste de triagem para TB em pacientes imunodeprimidos;
- Avaliar o método molecular baseado em PCR em único tubo na detecção específica do *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes imunodeprimidos;
- Comparar o desempenho do TT, do teste QFT-GIT e da PCR em único tubo no diagnóstico de TB nos pacientes imunodeprimidos;
- Estabelecer o método diagnóstico laboratorial com melhor desempenho para auxiliar na detecção da tuberculose em pacientes imunodeprimidos;
- Avaliar a possível interferência do nível de células T CD4 no teste QFT-GIT.
- Avaliar a relação entre o nível de células T CD4 com o desempenho do teste QFT-GIT.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia

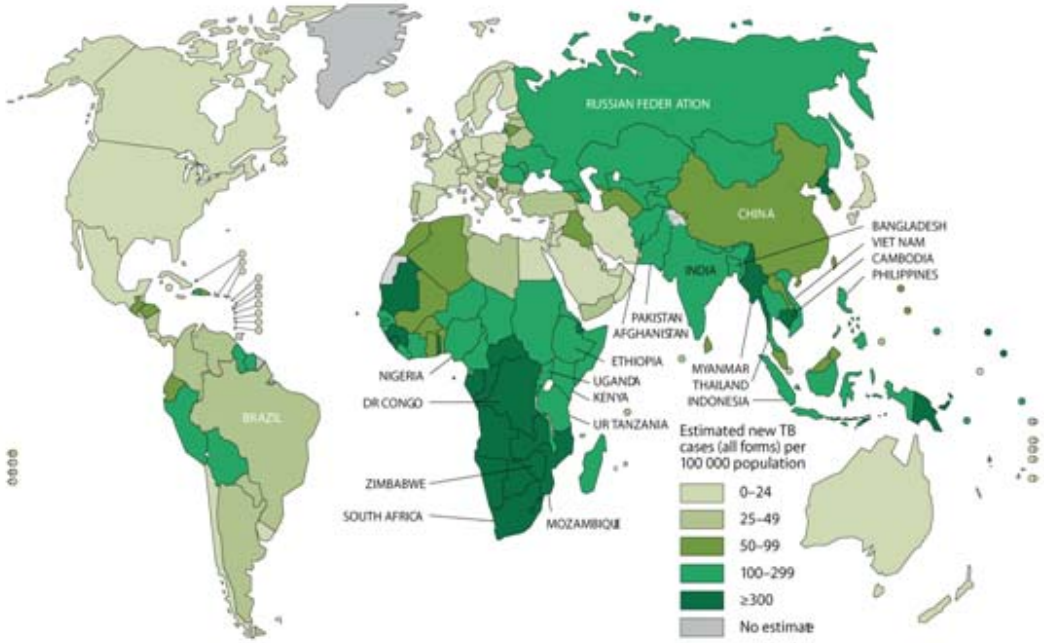
3.1.1 Tuberculose no mundo

Tuberculose é a segunda mais comum causa de morte por doenças infecciosa, depois do HIV/AIDS. Noventa e cinco por cento dos casos de TB ocorrem nas regiões mais pobres do mundo (NIAID, 2001). Nos países desenvolvidos é mais frequente entre as pessoas idosas, nas minorias étnicas e imigrantes estrangeiros (BRASIL, 2010).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2010 ocorreram 8,8 milhões de novos casos ($139/10^5$ habitantes) de tuberculose (TB) no mundo (Figura 1), que causaram a morte de 1,45 milhão de indivíduos, dos quais 44% possuíam baciloscopia positiva. A mortalidade total foi de 1,3 milhões de pacientes não infectados pelo HIV e 456 mil co-infectados com HIV. O aumento da incidência de TB, a partir de 1990, tem sido relacionado ao aparecimento da epidemia de AIDS (FRIEDEN, 2003). Apesar da disponibilidade de terapia anti-retroviral combinada, a incidência da tuberculose continua a ser significativamente maior entre a população infectada pelo HIV em todo o mundo (GIRARDI *et al*., 2004). Em 1993, a tuberculose foi declarada, pela OMS, como uma emergência médica global.

Baseando-se no teste tuberculínico (TT), estima-se que um terço da população mundial tem uma infecção tuberculosa latente (ITBL), não existindo manifestações clínicas, bacteriológicas nem radiológicas que evidenciam a infecção (OMS, 2012). Infecção tuberculosa latente (ITBL) é geralmente definida como a infecção pelo *M. tuberculosis*, que se manifesta por um teste tuberculínico (TT) e/ou IGRA (interferon-γ release assay) sem qualquer sinal de doença ativa (MACK *et al*., 2009). Dez por cento desses infectados irão desenvolver doença ativa ao longo de suas vidas (SHILOH *et al*., 2009).

Figura 1: Estimativa Global da Tuberculose em 2010.



Fonte: WHO, 2011.

As taxas de infecção por tuberculose entre pacientes com HIV são elevadas, superiores a 60% em Botsuana, África do Sul, Zâmbia e Zimbabwe. Cerca de dois milhões de pessoas morreram de tuberculose em 2000, cerca de 13% dessas pessoas estavam também infectados com o HIV (CORBETT *et al*., 2003). A Índia e a China representam 40% dos casos notificados. Já o Brasil está entre os 22 países que concentram 82% dos casos de TB no planeta.

Mundialmente, cerca de 2 bilhões de pessoas têm infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O risco de progressão de ITBL para a doença tuberculose é maior em crianças (MARAIS *et al*, 2006).

Nos Estados Unidos, estima-se que 11 milhões de pessoas têm ITBL (infecção tuberculosa latente), porém, a prevalência de ITBL varia muito de < 1% entre os jovens e indivíduos recém-nascidos a >50% entre os imigrantes de países endêmicos (LI, 2010; VARKEY *et al*., 2007).

Em um recente estudo da transmissão da tuberculose em Londres, verificou-se que a doença foi mais resultante da reativação de infecção latente ou associada com a recente imigração (MAGUIRE *et al*., 2002).

A imunossupressão, seja devido ao estado de saúde do indivíduo (desnutrição, doença auto-imune, cirrose hepática, doença renal crônica), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou uso de drogas imunossupressoras tem contribuído com o aumento da incidência da tuberculose no mundo. Dentre as causas de imunossupressão, a infeção por HIV tem maior importância nesse contexto. A elevação das taxas de co-infecção pelo vírus HIV e bacilo da tuberculose determina desafios que impedem a redução da incidência de ambas às infecções. O vírus HIV não só tem contribuído para um crescente número de casos de TB, como também tem sido um dos principais responsáveis pelo aumento da mortalidade entre os pacientes co-infectados (JAMAL & MOHERDAUI, 2007), sendo a tuberculose a doença oportunista mais prevalente em indivíduos infectados (CORBETT, 2003; OMS, 2007).

O risco de morte em pacientes co-infectados é 2-4 vezes maior do que indivíduos sem HIV, independente da contagem de linfócitos T CD4 (CONNOLY *et al*., 1999). Além disso, pacientes co-infectados têm um risco significativamente maior de progressão para AIDS em comparação a pacientes com HIV sem tuberculose (WHALEN *et al*., 1997). Dados recentes também indicam que a infecção com o HIV dobra o risco de reativação da tuberculose logo após a infecção pelo HIV (SONNENBERG *et al*., 2005). Trinta a quarenta por cento de todos os novos casos de tuberculose em muitos países africanos ocorrem em pessoas com HIV (BADRI *et al*., 2001).

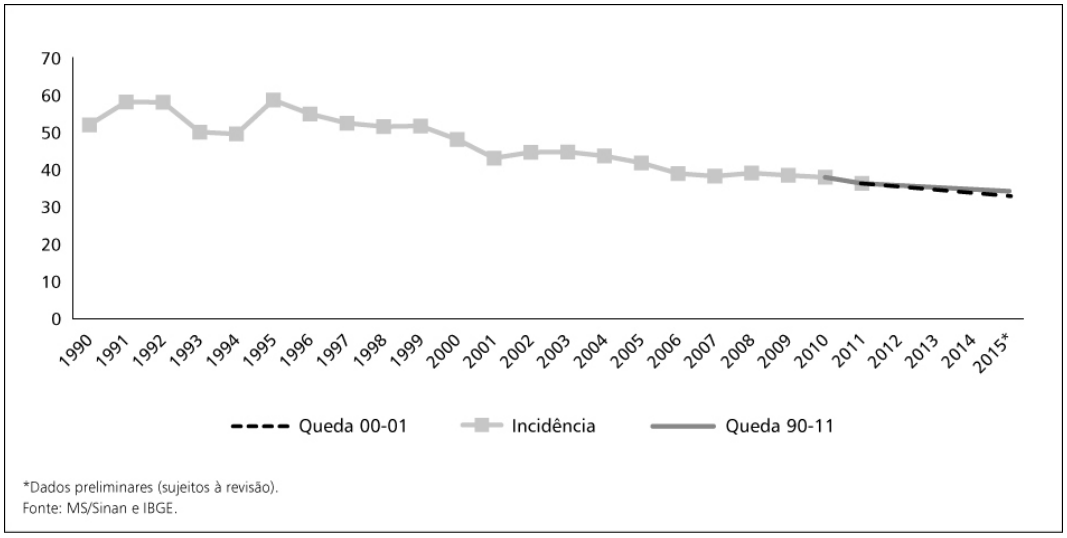
Atualmente, os indivíduos considerados de alto risco podem ser classificados em dois grupos: aqueles que possam ter infecção adquirida recentemente e com condições que aumentam o risco de reativação de ITBL. Na primeira categoria estão os contatos de pacientes com tuberculose ativa, os indivíduos conhecidos por terem convertido o teste de Mantoux nos últimos dois anos, crianças < 5 anos; imigrantes recentes (dentro de dois anos) e viajantes freqüentes para países com alta incidência de TB; indivíduos que vivem ou trabalham em abrigos, prisões, lares de idosos, residenciais ou instalações para portadores de AIDS e profissionais de saúde que trabalham com pacientes com TB. Na segunda categoria estão os indivíduos com condições imunossupressoras (p. ex., infecção por HIV, tratamento com terapia imunossupressora, incluindo os antagonistas de TNF-α e corticóides em altas doses; malignidade hematopoiética, diabetes e doença renal crônica), aqueles com doença pulmonar fibrótica ou gastrectomia, e indivíduos que usam drogas ou álcool, ou são (>10%) abaixo do peso (HERRERA *et al*., 2010).

3.1.2 Tuberculose no Brasil

A tuberculose é um problema de saúde prioritáro no Brasil. O Brasil é um dos 22 países, ocupando 16º lugar no ranking, responsáveis por 80% dos casos de TB no mundo, até o ano de 2007. Na Região das Américas, o Brasil e o Peru são responsáveis por 50% dos casos de TB notificados por ano. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), o gênero masculino, os homens adoecem duas vezes mais do que as mulheres, e o grupo etário 45-59 anos apresentam as maiores taxas de incidência. Em 2006 a maior taxa de mortalidade foi na região Nordeste, seguida pela região Sudeste (BRASIL, 2008).

A notificação de casos de TB diminuiu na década de 90, mas manteve-se estável a partir de 2001 (figura 2). Os estados da região sul, áreas onde historicamente era menor endemicidade da TB, observou-se uma reversão da queda da incidência na década de 90. Este fato é resultante da epidemia de HIV.

Figura 2: Taxa de incidência (por grupo de 100 mil habitantes) da tuberculose no Brasil, de 1990 a 2015.



Em 2010 foram notificados 71 mil casos de TB, com 4,6 mil mortos. Sendo a 4ª. causa de morte por doenças infecciosas e a 1ª causa de morte dos pacientes com AIDS (BRASIL, 2011). Em 2011, foram notificados 69.245 casos novos de TB no Brasil. Das 27 unidades federadas, cinco notificaram mais de quatro mil casos da doença (Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo) e foram responsáveis por 55% da carga da doença no

País. A taxa de incidência no país, em 2011, foi de 36 casos por 100000 habitantes, sendo Amazonas (62,6/100000 habitantes) e Rio de Janeiro (57,6/100000 habitantes) os estados com maiores taxas de incidência. Já a taxa de mortalidade, em 2010, foi aproximadamente 2,4 por 100000 habitantes, sendo o Rio de Janeiro (5,6/100000 habitantes) e Pernambuco (4,0/100000 habitantes) os estados com as maiores taxas de mortalidade (BRASIL, 2012).

O estado de Pernambuco registrou, em 2011, 4096 casos (46,2 por 100000 habitantes), sendo o 4º estado do Brasil com maior taxa de incidência (BRASIL, 2012). O Recife encontra-se entre os 15 municípios do estado considerados prioritários para as ações de controle da tuberculose (RECIFE, 2010). A capital teve a 4ª maior taxa de incidência de TB no Brasil, em 2011 (BRASIL, 2012).

Considerada como prioridade pelo governo federal do Brasil, desde 2003, a doença sempre esteve contemplada nas principais pactuações nacionais.

3.2 Fisiopatologia

A TB é transmitida por gotículas no ar, que são partículas de 1-5 μm de diâmetro que contêm o *Mycobacterium tuberculosis*. Devido ao seu pequeno tamanho, as partículas podem permanecer no ar por alguns minutos a horas após a expectoração por pessoas com tuberculose pulmonar durante a tosse, espirros, ao falar ou cantar. As gotículas infecciosas são inaladas e se aninham nos alvéolos das vias aéreas. O *M. tuberculosis* é então absorvido pelos macrófagos alveolares, iniciando uma cascata de eventos que resultam em sucesso ou contenção da infecção ou a progressão para doença ativa (tuberculose primária progressiva). Calcula-se que, durante um ano, numa comunidade, um indivíduo bacilífero poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas (BRASIL, 2010).

A infecção pelo *M. tuberculosis*, freqüentemente, se inicia no parênquima dos lobos pulmonares após a inalação de núcleos secos de gotículas (núcleo de Wells) contendo este microrganismo, passando a seguir para os nódulos linfáticos da região hilar, de onde pode ser disseminada para diversos tecidos e orgãos, pela corrente hematogênica ou linfática. A infecção do parênquima pulmonar e dos nódulos linfáticos da região hilar é denominada de infecção

primária Este tipo de infecção pode evoluir de maneira constante, se transformando em tuberculose ativa ou pode ser interrompida, porém, não de maneira completa, uma vez que a bactéria pode permanecer em estado de latência em vários dos focos infecciosos que se estabeleceram. Nesta última situação, o foco de infecção pode ser reativado a qualquer momento da vida do indivíduo e dar origem à tuberculose pós-primária (GRIFFITHS *et al*., 2010).

Após a infecção pelo *M. tuberculosis*, transcorrem, em média, 4 a 12 semanas para a detecção das lesões primárias. A maioria dos novos casos de doença pulmonar ocorre em torno de 12 meses após a infecção inicial.

A probabilidade de o indivíduo vir a ser infectado e de que essa infecção evolua para a doença, a disseminação e a evolução do quadro clínico dependem de múltiplas causas, destacando-se, dentre elas: fonte infectante; idade avançada; condições sócio-econômicas; algumas condições médicas (diabetes *mellitus*, alcoolismo, silicose, uso prolongado de corticóides ou outros imunossupressores, neoplasias, uso de drogas, infecção pelo HIV e pacientes submetidos a gastrectomia ou *bypass* intestinal); resposta imune e características genéticas do indivíduo e; virulência do bacilo. A evolução do quadro clínico dependerá do indivíduo estar sendo infectado pela primeira vez (primo-infeção), ou reinfectado (reifeção exógena) (HUGGETT *et al*, 2003).

Um indivíduo que recebe uma carga infecciosa de bacilos da tuberculose, pela primeira vez (primo-infecção), e que 1 a 2 bacilos alcancem o pulmão, apresentará uma reação inflamatória exudativa de tipo inespecífica. Aproximadamente em 15 dias, depois de ser digerido pelos macrófagos alveolares, os bacilos do *M. tuberculosis* multiplicam-se lentamente e de forma contínua e podem atingir a via linfo-hematogênica, comprometendo os linfonodos e diversos órgãos, principalmente fígado, baço, medula óssea, rins e sistema nervoso. Passa a haver, então, no pulmão, no local da inoculação inicial, um foco pequeno arredondado, de 1 a 2mm, esbranquiçado, de consistência amolecida e constituído, principalmente por material caseoso. Esse foco é circundado por afluxo celular de linfócitos, células epitelióides (macrófagos ativados e modificados) e macrófagos, localizado principalmente no terço médio. O *M. tuberculosis* está no centro do granuloma necrótico característico (necrose caseosa), mas geralmente não está viável. O foco pulmonar regressivo, que pode ser visto nas radiografias, chama-se foco de Gohn. Cerca de 90% da população infectada consegue bloquear o avanço do processo, a partir da

formação do complexo primário de Ranke, permanecendo apenas como infectado (BRASIL, 2010).

Quando a doença atinge os pulmões, o indivíduo pode apresentar dor torácica e tosse produtiva, acompanhada ou não de escarros hemoptoicos. A tosse produtiva é o sintoma mais frequente da forma pulmonar. Nos paciente adultos, maiores de 15 anos, a tuberculose atinge os pulmões em cerca de 80% dos casos. Dos primo-infectados, 5% adoecerão tardiamente, em consequência do recrudescimento de algum foco já existente no seu organismo (reativação endógena). Também pode ocorrer a reinfeção exógena, ou seja, o paciente adoecer por receber nova carga bacilar do exterior (BRASIL, 2010).

3.3 **Tuberculose e imunodepressão**

A história natural da TB mostra que a maioria dos indivíduos é resistente à infecção. Das pessoas expostas ao *M. tuberculosis*, entre 10-30% se tornam infectadas, e em apenas 5 a 10% destes indivíduos a infecção progride, transformando-se em TB ativa. A doença pode ser disseminada ou localizada, sob a forma pulmonar, ganglionar, renal, óssea, ou acometer qualquer outro órgão (NORTH, 2004). O período de infectividade depende de numerosos fatores, tais como estado imunológico, idade, gênero e tipo (p. ex. natureza cavitária) da doença (DOWDY *et al*., 2011).

No entanto, em algumas circunstâncias, onde ocorre desequilíbrio na resposta imune do hospedeiro, há reativação da infecção latente. Este processo pode ocorrer, por exemplo, através de infecção pelo HIV, desnutrição, uso de esteróides ou outras medicações imunossupressoras ou idade avançada. Embora o risco estimado de reativação da doença seja entre 2% e 23%, o risco para indivíduos imunodeprimidos pela infecção pelo HIV é estimado ser alto, 5-10% ao ano (LAWN *et al*., 2005).

Em indivíduos imunocompetentes suscetíveis, a doença envolve exclusivamente o pulmão em 85% dos casos. O envelhecimento da população e o aumento do uso de tratamentos imunossupressores representam fatores de risco de progressão para tuberculose ativa (HORSBURGH, 2004). Nos indivíduos imunocomprometidos a TB pode, frequentemente tornar-se uma doença disseminada, havendo maior freqüência de localizações extrapulmonares (TEIXEIRA, 2007). A TB ganglionar é a segunda forma mais comum de tuberculose

extrapulmonar e compromete, principalmente, a cadeia cervical. As localizações extrapulmonares da tuberculose mais frequentes na infância são a ganglionar, pleural, óssea e meningoencefálica (CAMPOS, 2006).

Tuberculose extrapulmonar é mais comum em pacientes HIV positivos, mas vai ocorrer em cerca de 15% dos pacientes imunocompetentes (REICHEMAN & HOPKIN-TANNE, 2002). Em pacientes transplantados que desenvolvem a tuberculose, cerca de 25-48% dos casos são extrapulmonares ou disseminadas. Estas formas disseminadas também têm sido associadas com a administração de drogas anti-TNF, que deprimem o sistema imunológico. Também deve ser notado que os casos de TB por vezes, são diagnosticados em pacientes assintomáticos durante o acompanhamento de rotina de uma doença imunossupressora. (GONZÁLEZ-MARTÍN *et al*., 2010).

Em indivíduos imunocompetentes, os achados radiológicos são na maioria das vezes característicos de TB, enquanto que em pacientes imunossuprimidos, como ocorre na infecção pelo HIV, os resultados variam consoante o grau de supressão: pacientes com CD4+ normais são semelhantes aos descritos para indivíduos imunocompetentes. Ao contrário de pacientes infectados com HIV, nos transplantados a radiologia mostra resultados mais próximos aos de pacientes imunocompetentes (infiltrados focais ou miliar, nódulos, derrame pleural e, raramente, linfonodomegalia intratorácica) (GONZÁLEZ-MARTÍN *et al*., 2010).

Sinais e sintomas da tuberculose em pacientes infectados pelo HIV são muitas vezes inespecíficos, e é difícil distinguir a doença de outras infecções oportunistas. A febre é um sinal quase constante, muito mais freqüente do que em pacientes imunocompetentes. O paciente pode apresentar um quadro agudo de algumas horas ou dias de evolução, semelhante a uma infecção bacteriana clássica, ou com um período de vários dias ou semanas, caracterizada por febre e sintomas sistêmicos (anorexia, fadiga, perda de peso). A localização mais comum é o trato respiratório, mas também afeta os gânglios linfáticos, sistema urinário, sistema nervoso central e fígado (GONZÁLEZ-MARTÍN *et al*., 2010).

Pessoas imunodeprimidas, como os receptores de órgãos, ou crianças com menos de 2 anos e que recebem quimioterapia, detém um alto risco de complicações infecciosas. Por exemplo, a incidência de tuberculose entre pacientes transplantados é 20-74 vezes maior que na população em geral, com uma taxa de mortalidade de 21-33% (GAUCHON *et al*., 2008; MUNOZ *et al*., 2005; VERMA, 2000).

Poucos estudos relatam a incidência de TB em pacientes transplantados (BASIRI *et al*., 2008; GUIDA *et al*., 2009; KIM *et al.*, 2010). A incidência da TB em receptores de transplantes de órgãos em todo o mundo varia de 0,35% a 15% (SINGH e PATERSON, 1998). Estima-se que um paciente transplantado possui um risco de desenvolver TB 50 vezes maior do que a população em geral (SINGH e PATERSON, 1998).

O risco de desenvolver TB nos pacientes dialisados é consideravelmente maior, devido à imunossupressão induzida por uremia, esse risco é 10-25 vezes maior nesses pacientes em comparação com a população em geral, e é independente do status do TT (teste tuberculínico) (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; CHOU *et al*., 2001; MOORE *et al*., 2002; NISSENSON, 2005). Além disso, pacientes em diálise são geralmente os candidatos para transplante e a doença latente pode evoluir para a doença durante a imunossupressão imposta durante o transplante de rim, ou seja, pacientes em hemodiálise tem um alto risco de reativação da TB (ROSE, 2000; SESTER *et al*., 2006). Tuberculose nesses pacientes pode ser difícil de diagnosticar e apresenta-se frequentemente na forma extrapulmonar (MALIK *et al*., 2002). Estudos anteriores sugerem que há altas taxas de anergia ao PPD em pacientes em estágio final de doença renal (SMIRNOFF *et al*, 1998; WOELTJE *et al*, 1998) e em dialisados (SESTER *et al*, 2004).

O risco é aumentado entre insuficiência renal crônica (ALADREN *et al*., 2004; ERKOC *et al*., 2004), e sobe ainda mais quando esses pacientes submetidos a transplante são colocados sob terapia imunossupressora (JOHN, *et al*., 2001). A maioria dos casos são encontrados no primeiro ano após o transplante (JOHN, *et al*., 2001), por isso é provável que representem a progressão da infecção latente para doença ativa. Identificar estes casos gera um impacto positivo na morbidade e mortalidade associadas a essa infecção (SHANKAR, 2005).

Transmissão nosocomial da TB também tem sido relatada em pacientes em diálise a longo prazo (HICKSTEIN *et al*., 2003). Estudos relatam um aumento de 8 vezes na incidência de tuberculose em pacientes em diálise em relação à população geral (SIMON, *et al*., 1999). Detecção da ITBL nessa população é, portanto, uma questão importante, para prevenir a progressão para tuberculose ativa e contaminação secundária a outros pacientes e profissionais de saúde.

A TB não se apresenta como uma doença única, ao contrário, suas manifestações variam de acordo com muitos fatores: história da exposição prévia, nutrição, presença de outras

infecções e competência imunológica. Na tuberculose latente, o hospedeiro apresenta uma forte resposta imune que frequentemente detém o bacilo, porém, não elimina à infecção decorrente de alterações nos mecanismos de resistência que levam à reativação da doença (NORTH, 2004). O estado de infecção latente caracteriza-se por ausência de sinais clínicos. Nesse estado, o bacilo de Koch pode manter-se vivo dentro de calcificações e mais frequentemente em focos granulomatosos com pouco ou nenhum oxigênio, impedindo sua multiplicação.

Latência é considerado um evento dinâmico, no qual uma resposta imune ativa mantém as micobactérias persistentes sob controle (SALGAME, 2005; LIN e FLYNN, 2010). Durante o estágio de latência, o *Mycobacterium tuberculosis* tem o metabolismo diminuído e expressa antígenos diferentes dos que expressa quanto apresenta um metabolismo acelerado, durante a tuberculose ativa (GUIO *et al*., 2010). Entretanto estes indivíduos poderão adoecer com uma maior freqüência quando apresentarem uma variação imunológica seja por estresse físico, emocional, desnutrição, imunossupressão congênita ou adquirida (BARBOSA, 2002). O tratamento das formas latentes reduz a incidência da doença ativa em 75%, diminuindo assim sua morbimortalidade (CORBETT *et al*., 2003).

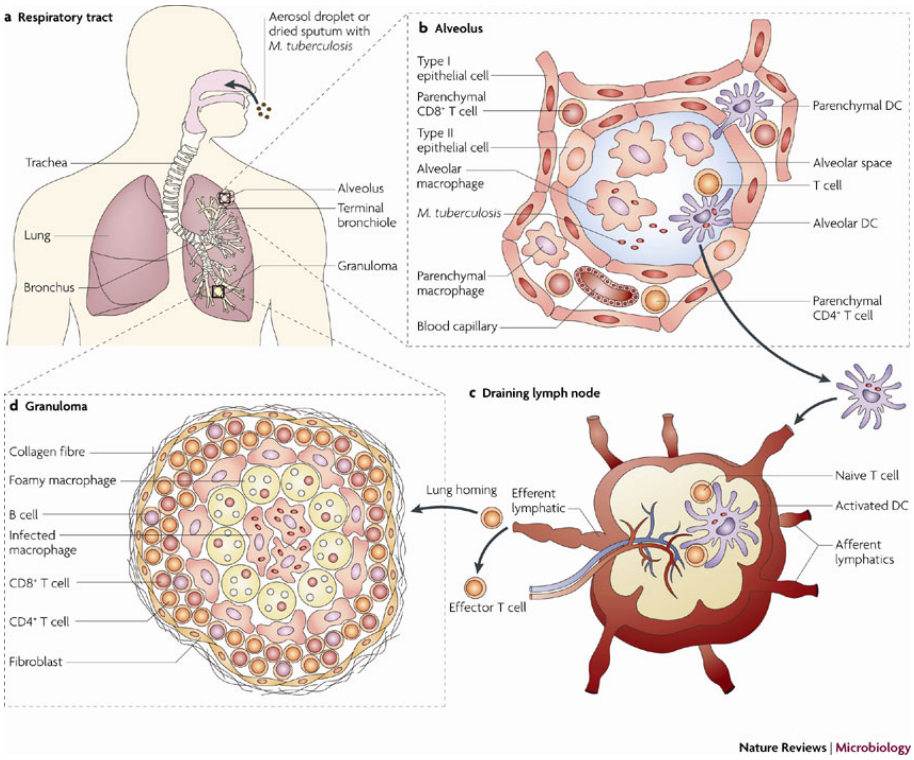
3.4 Imunologia da Tuberculose

A imunidade para tuberculose é, fundamentalmente, mediada pelo sistema imunológico celular, timo-dependente, através da interação entre linfócitos T *helper* ativados e macrófagos, com a liberação de citocinas específicas, relacionadas com a ativação do mecanismo de imunidade celular do tipo Th1 (COOPER *et al*, 2009).

Nos seres humanos, a TB é predominantemente uma doença dos pulmões. A infecção por *M. tuberculosis* é iniciada com a inalação de bactérias infecciosas e sua deposição no espaço alveolar dos pulmões (figura 3) (GRIFFITHS *et al.*, 2010). As bactérias são absorvidos por fagócitos no pulmão, em particular por células dendríticas e macrófagos alveolares. As células dendríticas fagocitam o *M. tuberculosis* e migraram, através do sistema linfático, para os linfonodos de drenagem. Lá ocorre a apresentação de antígenos, derivados do processsamento das micobactérias, às células T *naive* que são ativadas em células T efetoras e retornam aos pulmões, em respostas as quimiocinas produzidas, para controlar a infecção (COOPER *et al*., 2009). A resposta imune ao *M. tuberculosis* é complexa e multifacetada. As células T são um

componente essencial da resposta protetora, e a interação dessas células com os macrófagos infectados é fundamental para o controle da infecção.

Figura 3: Resumo da sequência dinâmica de eventos que regulam a formação do granuloma no curso da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: Griffiths *et al*. (2010): Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis.

Após sofrerem fagocitose, os bacilos induzem macrófagos, células dendríticas e células T a secretarem as citocinas TNF-α (fator de necrose tumoral-α), IFN-γ (interferon-γ), IL-10 (interleucina-10) e TGF-β (fator de transformação do crescimento-β). Em resposta, através de interações de componentes micobacterianos com receptores *Toll-like* (TLR), os macrófagos produzem citocinas inflamatórias e quimiocinas que atuam como sinais de infecção. A ativação de TLR2 ou TLR4 induz a produção precoce de interleucina 12 (IL-12) e TNF-α (VERRECK *et al*., 2004). Posteriormente a IL-12 induz a produção de IFN-γ por células *natural killer* (NK) na fase inicial da resposta imune, tendo também a função de ativação, diferenciação e expansão das células Th1 antígeno específicas (JANEWAY, 2002; SIELING, 2002; TRINCHIERI, 2003).

Estes acontecimentos conduzem à formação do granuloma no local da infecção, o que resulta na contenção da infecção. Este estado de equilíbrio entre hospedeiro e micobactéria é chamado de "latência", durante o qual os sinais clínicos da doença são ausentes e as bactérias persistem em uma forma não-transmissível. No entanto, quando este equilíbrio é perturbado por fatores como a desnutrição, imunossupressão, uso de esteróides, terapia com anti-fator de necrose tumoral ou infecção pelo HIV, pode ocorrer a ativação metabólica da bacteréria e consequente inicio da doença (RUSSEL *et al*., 2010).

A resposta imunológica produzida ao *M. tuberculosis* é mediada por células T que envolve as células T CD4+ (*helper*) e T CD8+ (citotóxico) e desempenha um papel importante na protecção contra a TB. Células T CD4+ aumentam a atividade antibacteriana dos macrófagos, liberando citocinas, tais como interferon-γ (IFN-y) e TNF, enquanto células T CD8+ destroem os macrófagos infectados - e, possivelmente, o *M. tuberculosis* - liberando mediadores citotóxicos tais como perforinas, granzimas e granulosina (COOPER *et al*., 2009).

O IFN-γ é uma citocina chave na resposta imune contra o *M. tuberculosis*. Esta citocina juntamente com o TNF-α (o qual é liberado pelas células T e fagócitos) ativa os macrófagos para matar os bacilos intracelulares (OTTENHOFF *et al*., 2005). O interferon-γ é, no entanto, crucial para o controle do *M. tuberculosis* e também estimula os macrófagos a liberar TNF-α, que é importante na formação do granuloma e controle da extensão da infecção (FLYNN, 2000).

O TNF-α parece ter um papel na manutenção da organização e na integridade do granuloma, o que contribui para a contenção de *M. tuberculosis* como também possui um papel importante na apoptose de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* (KEANE, 2000). Através da sua capacidade de regular a expressão e os receptores de quimiocinas bem como as moléculas de adesão, funciona como um potente modulador da migração celular (MOHAN *et al.*, 2001; SEDGWICK *et al*., 2000).

A migração de macrófagos e células T (bem como as células B) para o local da infecção culmina na formação de um granuloma, um achado característico da tuberculose. O granuloma possui a função de barreira à disseminação do bacilo a outros locais (BOMBARDA *et al*., 2001). Além de linfócitos T e macrófagos, o granuloma é composto por células do hospedeiro, incluindo as células B, células dendríticas, células endoteliais, fibroblastos, e provavelmente, células do estroma. A proporção relativa dos diferentes tipos de célula no granuloma varia de acordo com o tempo de formação. O granuloma engloba os bacilos, que residem no interior de

macrófagos, e serve para isolar as bactérias do resto do pulmão, limitando sua propagação, funcionando também como um microambiente que facilia as interações entre as células T, macrófagos e citocinas (GONZALEZ-JUARRERO *et al*., 2001).

A TB progressiva primária pode se manifestar em qualquer órgão, ocorrendo mais freqüentemente no parênquima pulmonar, nos linfonodos hilares, ou como lesões generalizadas decorrentes de disseminação hematogênea (ISEMAN, 2000).

Apesar da resposta eficaz do sistema imune em poder conter inicialmente o *M. tuberculosis*, vários fatores podem desencadear a reativação de uma infecção remota com subsequente desenvolvimento da doença ativa, o que ocorre geralmente em crianças menores de 5 anos e adultos com imunossupressão avançada. Apesar do vírus HIV ser o maior fator de risco para progressão para doença ativa em adultos, outras condições médicas podem também comprometer o sistema imunológico e predispor ao desenvolvimento de doença ativa como: diabetes mal controlada, insuficiência renal, doença maligna de base, quimioterapia, uso prolongado de corticóides, desnutrição e deficiência de vitaminas (KARYADI, 2002), defeitos na produção de citocinas (IFN-γ e TNF-α) (STERLIN, 2001; KEANE, 2001), ou nos receptores de IFN-γ e β1 da interleucina-12 (ALTARE, 2001).

3.5 Diagnóstico da Tuberculose

Os métodos de diagnóstico utilizados atualmente para a confirmação da TB compreendem a baciloscopia, cultura, radiografia do tórax e o teste tuberculínico. A detecção rápida e acurada de casos de TB é um dos elementos mais importantes no controle da doença. O padrão-ouro para o diagnóstico continua sendo o exame microscópico direto (baciloscopia) e cultura do escarro, associados aos quadros clínico e epidemiológico do paciente. Apesar da baciloscopia do escarro possuir baixa sensibilidade (40% a 60%), permanece como um dos exames mais importantes para o diagnóstico de TB, pois detecta os pacientes que apresentam maior chance de infectar a comunidade.

O diagnóstico preciso de TB em adultos e crianças, ainda é difícil, e, em muitos casos, o agente etiológico *Mycobacterium tuberculosi*s não é detectado por microscopia convencional ou cultura, iniciado-se o tratamento muitas vezes, de forma empírica, baseado apenas em dados

clínicos e epidemiológicos. Os pacientes infectados pelo HIV com tuberculose pulmonar apresentam a forma paucibacilar da doença por terem uma menor carga de bacilos circulantes no organismo (ELLIOTT *et al*., 1993), apresentando dessa forma, uma maior dificuldade diagnóstica. Neste contexto, a dificuldade para confirmação de TB nestes pacientes aumenta devido a vários fatores como: exames de baciloscopia e cultura geralmente negativos, ausência ou diminuição da reatividade à tuberculina, imagens radiográficas atípicas e quadro clínico inespecífico (SHARP, 1993).

Devido à maior frequência de formas extrapulmonares e disseminadas da TB em pessoas portadoras de HIV/AIDS, a investigação adequada requer, muitas vezes, procedimentos invasivos a nível hospitalar, para coleta de espécimes clínicos (tecidos, líquido pleural, aspirado de linfonodos, entre outros) a serem submetidos a biópsia e estudo histopatológico (BRASIL, 2011).

Grupos com imunossupressão são, indiscutivelmente, o alvo mais importante para a triagem e tratamento da TB, devido a morbidade da doença nesses indivíduos (HORSBURGH, 2004). Desta forma, há um grande interesse da comunidade científica em desenvolver novos testes, que sejam eficazes para detectar o estado de infecção/doença, na triagem de indivíduos imunodeprimidos (PAI *et al*., 2005).

Algumas ressalvas na interpretação de um teste com a finalidade de triagem deverão ser consideradas como a obtenção de resultados negativos em contatos recentes ou logo após a exposição do paciente com a doença ativa (LEE *et al*., 2010). Nestes casos, recomenda-se que, o teste deva ser repetido 8-10 semanas após a última exposição conhecida do paciente (JENSEN *et al*., 2005). Além disso, o julgamento clínico sempre deverá ser priorizado, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos com alto risco de tuberculose, devendo fortemente ser considerada a possibilidade de ser feito tratamento profilático, independente do resultado do teste.

A prevenção da tuberculose depende em grande parte da identificação de pessoas com infecção latente através da reatividade ao teste de tuberculina (TT). No entanto, a sua capacidade para diagnosticar ITBL em pacientes imunodeprimidos como nos infectados pelo HIV é bastante limitada pela baixa sensibilidade resultante da anergia associada com doença avançada (MARKOWITZ *et al*., 1993). Não existe um padrão-ouro para o diagnóstico de ITBL, desta forma as indicações para a terapia profilática são baseadas em uma associação de fatores

epidemiológicos, clínicos e laboratoriais do paciente (ATS, 2000). O tratamento preventivo de pessoas infectadas de forma latente diminui o risco de desenvolvimento subseqüente de TB ativa em cerca de 90% (FEREBEE, 1969).

O desenvolvimento de testes alternativos para identificação de TB tem sido alvo de inúmeras pesquisas. Um teste ideal para diagnóstico de TB deveria ter alta especificidade, independentemente da vacinação prévia com BCG ou infecção por outras micobactérias, ser seguro, estável ao longo tempo, ter baixo custo e ser de fácil realização (WHALEN, 2005).

3.5.1 Teste Tuberculínico (TT) ou Teste de Mantoux

O teste tuberculínico de Mantoux, utilizado desde 1930 avalia *in vivo* a resposta celular imune contra a proteína purificada derivada do *M. tuberculosis*, resultando em uma reação clássica de hipersensibilidade cutânea tardia. Apesar de suas conhecidas limitações na sensibilidade e especificidade, continua sendo utilizado como o método de escolha para a detecção de infecção por *M. tuberculosis* na maioria dos países em desenvolvimento (FURIN e JOHNSON, 2005).

O método se baseia na reação celular desenvolvida na pele, após a inoculação intradérmica de um Derivado Protéico Purificado (PPD), preparado de uma cultura de sete cepas selecionadas do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. É aplicado por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1 ml, equivalente a 2 UT (Unidades de Tuberculina). A leitura é realizada após 48-72 horas da aplicação, podendo esse prazo ser estendido até 96 horas. O maior diâmetro tranverso da área de endurecimento palpável é medido com régua milimetrada, e o resultado, registrado em milímetros (BRASIL, 2010).

Em indivíduos imunocompetentes, o TT é altamente sensível, sobretudo naqueles que vivem em regiões sem TB ou onde a doença não é endêmica, porém, em pessoas com imunidade comprometida, há redução de sensibilidade do teste relacionada com a deficiência da imunidade celular (PASSALENT *et al*., 2006).

Uma das principais desvantagens do uso clínico do TT é a falta de especificidade, devido à reatividade cruzada com as cepas da BCG com o *Mycobacterium bovis* (*Calmette-bacilo Guerin* - BCG) e cepas vacinais de várias micobactérias não-tuberculosas (AMERICAN

THORACIC SOCIETY, 2000). Além disso, 10-25% dos pacientes com tuberculose não reagem ao PPD, diminuindo a especificidade para menos de 50% em pacientes com doença avançada (ANDERSEN *et al*., 2000).

Em indivíduos previamente vacinados com BCG, existe dificuldade na interpretação da prova tuberculínica em distinguir se a reação do teste é devido à vacina, a TB infecção ou doença. Em pessoas com imunossupressão por condições diversas (portadores de HIV/AIDS, câncer, doenças consumptivas, desnutrição transplantados, uso prolongado de corticosteróides, gravidez; crianças abaixo de dois anos e idosos acima de 65 anos entre outras), uma enduração ≥5mm deve ser considerada como resultado positivo, refletindo infecção latente, e a quimioprofilaxia deverá ser iniciada após ser afastada TB doença (BRASIL, 2010)

Anergia causada por um estado imunocomprometido (especialmente com a infecção pelo HIV, imunossupressão induzida por medicação ou pacientes transplantados) pode levar a resultados falso-negativos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; BENITO *et al*., 2002; MUNOZ *et al*., 2005), pois existe uma diminuição da responsividade de células mononucleares periféricas, o que acarreta prejuízo para hipersensibilidade cutânea tardia e para o reconhecimento de antígenos, como é o caso do PPD (PANAYI *et al*., 2001). Os resultados falso-negativos também podem ocorrer até 10 semanas após a infecção com ***M. Tuberculosis*** (HUEBNER, 1993). Os falsos negativos, particularmente na população HIV onde as implicações da doença ativa são mais prementes pode limitar grandemente a utilidade deste teste (MARKOWITZ, 1993).

Neste contexto, um teste tuberculínico positivo pode sugerir tuberculose ativa, infecção passada, vacinação com BCG ou sensibilização por micobactérias ambientais. Por outro lado, um resultado negativo pode não excluir necessariamente a tuberculose (TIWARI *et al*., 2007). Desta forma,o teste cutâneo da tuberculina não é um teste de *screening* (triagem) ideal em pacientes imunodeprimidos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999).

3.5.2 Radiografia de Tórax

A radiografia de tórax é indicada como método auxiliar no diagnóstico da TB em pacientes sintomáticos e negativos à baciloscopia, em familiares de pacientes bacilíferos, e mesmo em suspeitos de TB extrapulmonar. O método se baseia na presença de opacidades

radiológicas características (SBPT, 2004). A análise radiológica não é, entretanto, um exame específico para detectar pacientes com TB, visto que lesões pulmonares semelhantes às causadas pelo *M. tuberculosis* podem ocorrer em outras doenças.

Esse exame fornece alguns indícios da doença, mas a análise radiográfica é frequentemente inespecífica para a TB paucibacilar (SAO *et al*., 1992) . A presença de infecção pelo HIV pode ainda, complicar a análise radiográfica das lesões clássicas da tuberculose pulmonar. A interpretação dos achados radiológicos geralmente é propenso a variações inter observador. As formas extrapulmonares e disseminadas da tuberculose são geralmente diagnosticado por exame histopatológico. A falta de achados radiológicos específicos para TB, na maioria dos casos, faz da radiografia do tórax um exame, quando analisado isoladamente, sujeito a erros no diagnóstico da tuberculose pulmonar (KOPPAKA e BOCK, 2004).

A radiografia do tórax continua sendo utilizado para uma avaliação inicial dos pacientes com TB pulmonar (ANDREU *et al*., 2004; HOPEWELL *et al*., 2006), e muitos pacientes podem ser diagnosticados sem tomografia computadorizada (TC) de tórax. No entanto, em casos TB pulmonar com baciloscopia negativa, a TC pode permitir um diagnóstico presuntivo de TB pulmonar ativa e permitir um diagnóstico mais precoce, porque a precisão da TC para o diagnóstico de TB pulmonar é sabidamente elevada (LEE *et al*., 1996; NAKANISHI *et al* 2010).

3.5.3 Baciloscopia

Atualmente, a técnica mais rápida, mais fácil e mais acessível para o diagnóstico da tuberculose é a baciloscopia ou exame microscópico, que é a pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado com metodologia padronizada (OMS, 2008). Os procedimentos de coloração mais utilizados são a de Ziehl-Neelsen (figura 4) e a fluorescência da rodamina auramina. Tem sido demonstrado que a especificidade de ambos é semelhante, embora a coloração fluorescente tenha a vantagem de ser examinada com objetiva de menor aumento, resultando em um menor tempo para avaliar cada amostra (FERNÁNDEZ DE VEGA *et al*., 2005).

Em uma recente revisão sistemática a sensibilidade da baciloscopia, encontrada foi em torno de 70%. Através da baciloscopia pode-se detectar todos os membros do gênero

Mycobacterium em amostras clínicas e se executado corretamente, permite identificar cerca de 70-80% dos casos de TB pulmonar em uma comunidade, sendo considerado o método prioritário para o diagnóstico desta forma da doença (STEINGART *et al*., 2006).

Figura 4: Baciloscopia corada pela técnica de Ziehl-Neelsen

Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

No Brasil, a baciloscopia está indicada para todos os sintomáticos respiratórios (indivíduos com tosse e expectoração por três semanas ou mais) e também para acompanhar a evolução bacteriológica, redução bacilar e/ou negativação no escarro nos exames mensais, independentemente do volume da secreção, do paciente com TB pulmonar durante o tratamento (BRASIL, 2010).

A principal desvantagem, porém, da baciloscopia é a baixa sensibilidade estimada em aproximadamente, 35%, em lugares com altas taxas de TB com co-infecção pelo HIV (CORBETT *et al*., 2003). Isso significa que um percentual variável dos casos de TB são baciloscopia negativa, portanto, um resultado negativo não exclui a doença (REICHEMAN & HOPKIN-TANNE, 2002).

A ausência de baciloscopia positiva em indivíduos com evidência clínica e epidemiológica de TB, por falha na sensibilidade do teste, é um problema diagnóstico, especialmente quando não há outros testes disponíveis. Em invíduos infectados pelo HIV, geralmente as baciloscopias são negativas (ELLIOTT *et al*, 1993) e imagens alteradas na radiografia pulmonar e os sintomas clínicos são muitas vezes escassos ou ausentes. Assim, o

diagnóstico da doença ativa é feito com muita dificuldade e demora, levando ao tratamento frequentemente tardio. Estes fatores relacionados à confirmação diagnóstica e início do tratamento específico, geralmente contribuem para o mau prognóstico observado entre os pacientes infectados pelo HIV com baciloscpias negativas (HARGREAVES *et al*., 2001).

O escarro de pacientes com tuberculose pulmonar – particularmente aqueles com lesão cavitária – muitas vezes contém um grande número de BAAR que é facilmente detectado pela microscopia direta. O número mínimo de bacilos necessário para produzir um esfregaço com resultado positivo tem sido estimado entre 5000 a 10000 por mililitro da amostra (tabela 1) (BRASIL, 2001). Recomenda-se, para o diagnóstico, a coleta de duas amostras de escarro: uma por ocasião da primeira consulta, e a segunda na manhã do dia seguinte, ao despertar (BRASIL, 2010).

Tabela 1: Número de BAAR observados nas baciloscopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos.

Número de bacilos observados	Concentração estimada de bacilos por mL de escarro	Probabilidade de um resultado positivo
0 em 100 ou mais campos	Menos do que 1000	Menos do que 10%
1-2 em 300 campos	5000-10000	50%
1-9 em 100 campos	Aproximadamente 30000	80%
1-9 em 10 campos	Aproximadamente 50000	90%
1-9 por campos	Aproximadamente 100000	96,2%
10 ou mais por campo	Aproximadamente 500000	99,95%

Fonte: Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculosee Outras Micobactérias, 2008. Modificado de David HL. Bacteriology of mycobacterioses. US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Centre, Atlanta, USA, 1996.

3.5.4 Cultura

O método de cultura micobacteriana é aproximadamente 100 vezes mais sensível que a baciloscopia de escarro para a detecção de *M. tuberculosis* (BRODIE e SCHLUGER, 2005), e em decorrência de sua alta especificidade, continua sendo o "padrão ouro" para o diagnóstico definitivo (BRASIL, 2008).

A Cultura pode ser realizada em vários tipos de espécimes, incluindo escarro e lavado brônquico como também amostras extrapulmonares como sangue, urina, lavado gástrico, LCR, entre outras (DSCTAC, 2000). No entanto, a cultura de micobactérias é um método demorado, podendo levar de 3-8 semanas para produzir resultados (SOINI e MUSSER, 2001). Esse método é tecnicamente difícil, pois exige equipamentos de biossegurança e pessoal capacitado, ficando restrita aos centros de referência e aos laboratórios de pesquisa, possui relativamente, altos custos e os espécimes clínicos paucibacilares podem algumas vezes produzir resultados falsos negativos (OMS, 2009).

Deve ser indicada, sobretudo em suspeitos de tuberculose pulmonar com baciloscopia do escarro negativa, para o diagnóstico de formas extrapulmonares, como meníngea, renal, pleural, óssea e ganglionar, e também para o diagnóstico de tuberculose em pacientes HIV positivo.

O limite de detcção de bacilos através da cultura é de 100 bacilos por mililitro de escarro, mas quando realizada com alta qualidade técnica pode ser capaz de detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis (RIEDER *et al*., 2007; OMS, 2004).

Quando realizada no escarro, pode, em geral, adicionar 20% de casos ao total daqueles de TB pulmonar, não confirmados pela baciloscopia. Permite também a posterior identificação da espécie de micobactéria isolada, realização de teste de sensibilidade às drogas antituberculose, assim como a realização de várias técnicas moleculares. A especificidade da cultura para o diagnóstico da TB é maior do que 99% (OMS, 2004).

3.5.5 Histopatológico

É um método empregado na investigação das formas extrapulmonares ou nas formas pulmonares que se apresentam radiologicamente como doença difusa, por exemplo, na TB miliar ou em indivíduos imunossuprimidos. Nos pacientes imunocompetentes, a baciloscopia do tecido usualmente é negativa e a presença de um granuloma, com necrose de caseificação, é compatível com o diagnóstico de TB. Nos pacientes imunossuprimidos é menos frequente a presença de granuloma com necrose caseosa, mas é mais frequente a positividade da baciloscopia no material de biópsia. No entanto, o único método diagnóstico de certeza de TB é a cultura seguida da confirmação da espécie *M. tuberculosis* por testes bioquímicos ou moleculares e, por isso, todo o

material coletado por biópsia deve também ser armazenado em água destilada ou em soro fisiológico 0,9% e enviado para cultura em meio específico (BRASIL, 2011).

As formas extrapulmonares e disseminadas da tuberculose são geralmente diagnosticadas por exame histopatológico. As deficiências deste método podem incluir dificuldade na obtenção de amostras representativas. Para amostras clínicas extrapulmonares obtidas por biópsia, o desempenho da histopatologia é alto (> 70-80%), já em fluidos biológicos este método não é tão sensível (5-20%) (FERNÁNDEZ DE VEGA *et al*., 2005).

3.5.6 Métodos Imunológicos

A descoberta de antígenos específicos do *M. tuberculosis* abriu o caminho para melhorar a especificidade do ensaio. Em 1986, Harboe e colaboradores relataram o primeiro antígeno *M. tuberculosis*, MPB-64 (mais tarde conhecido como MPT-64). Em 1995, Andersen e *cols.* relataram um antígeno altamente imunogênico da resposta imune celular à tuberculose em camundongos, conhecido como *early secretory antigen target* 6 (ESAT-6). Posteriormente, em 1998, Berthet e colegas descreveram a *culture filtrate protein* 10 (CFP-10), um outro antígeno altamente imunogênico. ESAT-6 e CFP-10 (DILLON *et al.*, 2000; BROCK *et al*., 2001; van PINXTEREN *et al*, 2007) tem sido amplamente estudado, demonstrando um grande potencial.

Estabelecer o diagnóstico de tuberculose, particularmente a infecção tuberculosa latente em pacientes imunodeprimidos, muitas vezes pode ser um grande desafio para os médicos e profissionais de laboratório. Testes baseados na detecção de IFN-γ *in vitro* e métodos moleculares baseados na detecção de fragmentos micobacterianos específicos tem sido estudados. Ensaios baseados na detecção da produção de IFN-γ *in vitro* por células mononucleares periféricas estimuladas por antígenos específicos (ESAT-6 e CFP-10), bem como, técnicas de amplificação de pequenos fragmentos do DNA micobacteriano tem sido utilizados como métodos mais sensíveis e específicos na detecção de infecção tuberculosa latente (MARQUES, 2008).

O desenvolvimento de testes imunológicos para o diagnóstico da infecção pelo *M. tuberculosis* está diretamente relacionada com a resposta imunológica do hospedeiro. Desta forma, poderia ser útil para identificar uma infecção por TB sem a necessidade de detecção do

bacilo no escarro ou qualquer outra amostra biológica do paciente e identificar a infecção tuberculosa latente, principalmente em casos de imunossupressão, onde o paciente apresenta grande risco de evoluir para caso de doença ativa, onde poderá propor estratégias terapêuticas para o controle da morbi-mortalidade.

Estudos recentes têm avaliado ensaios com interferon-γ para diversas aplicações, tais como: teste auxiliar no diagnóstico de tuberculose ativa; a distinção entre micobactéias não tuberculosas (MNT) e infecção por *M. tuberculosis*; a diferenciação entre *M. tuberculosis* e vacina BCG prévia; correlacionar a imunidade protetora com a eficácia da vacina; a previsão de reativação da doença entre as pessoas com tuberculose latente; acompanhamento da resposta ao tratamento; triagem para ITBL em pessoas imunodeprimidas; e confirmar os resultados positivos do TT (MAZUREK, 2005; NCCCC, 2006; PAI *et al*., 2004).

Atualmente, dois testes estão disponíveis comercialmente em vários países (Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, França, Itália, Alemanha, Suíça e Austrália): QuantiFERON®-TB Gold (QFT®), que utiliza como princípio o ELISA, e T-SPOT-TB, com base na técnica ELISPOT. Ambos são aprovadas pela Food and Drug Administration EUA e recomendado pelo Controle de Doenças e Prevenção (CDC), como auxílio na detecção de ITBL (MAZUREK *et al*. 2010). O IGRA não está disponível na rotina dos serviços no Brasil (BRASIL, 2011).

A sensibilidade desses ensaios para diagnosticar TB ativa tem sido estimada entre 64-90% (PAI *et al*., 2008; MORI *et al*., 2004; Van PINXTEREN *et al*., 2000). Em países com baixa incidência de TB os IGRAs apresentam uma alta sensibilidade (>85%) para detecção de TB ativa e também uma ótima especificidade (97-100%) (BROCK *et al*., 2004; CHAPMAN *et al*., 2002; JONES *et al*., 2007; MENZIES *et al*., 2007; RANGAKA *et al*., 2007).

Em uma abrangente revisão dos estudos que compararam a sensibilidade de IGRAs e TT em pacientes com TB confirmada por cultura, a sensibilidade para T-SPOT, QFT-GIT e TT foi calculada em 90%, 83% e 89%, respectivamente (MAZUREK, *et al*., 2010). No mesmo estudo, a especificidade foi de 88%, 99% e 85%, respectivamente. No entanto, os estudos publicados nesta área são muito variáveis em relação ao tamanho da amostra, a população de estudo, etc. (PAI *et al*., 2008). Há uma variação significativa nas estimativas de desempenho para QFT-GIT e TT, dependendo do tipo de estudo e da população testada (DIEL *et al*., 2009). Os IGRAs possuem superioridade ao TT sobre a especificidade em populações vacinadas com BCG, devido ao uso de antígenos específicos de MTB (BROCK *et al*., 2004).

Na Europa e no Canadá, diretrizes recomendam que o IGRA deve ser utilizado em duas situações (NCCCC, 2006; PHAC, 2007):

1. Como teste confirmatório nos indivíduos que já apresentaram um TT positivo.
2. Como uma substituição direta para o TT naqueles indivíduos em que o resultado do teste não é confiável, como no caso dos pacientes imunodeprimidos.

Embora os IGRAs sejam mais caros do que o TT, análises econômicas da saúde descobriram que eles são eficientes, pois reduzem o número de pessoas que necessitam de quimioprofilaxia desnecessárias e monitoramento clínico e laboratorial durante o tratamento com drogas (WRIGHTON-SMITH *et al*., 2006; DIEL *et al*., 2007). Ao reduzir os resultados falso-positivos, ensaios que dosam interferon podem ajudar a evitar o tratamento desnecessário de tuberculose latente e seus efeitos adversos.

3.5.6.1 QuantiFERON –TB Gold In Tube (QFT-GIT)

O QuantiFERON®-TB Gold (Cellestis Limited, St. Kilda, Australia) é um teste de diagnóstico *in vitro* que utiliza os antígenos ESAT-6 e CFP-10 e TB 7.7 (p4) do *M. tuberculosis*, os quais tem a função de estimular as células T do sangue. Estas proteínas estão ausentes em todas as cepas de BCG e na maioria das micobactérias não-tuberculosas (com exceção do *M. kansasii, M. szulgai e M. marinum*). Indivíduos infectados com micobactérias do complexo *M. tuberculosis* costumam ter linfócitos que reconhecem esses e outros antígenos micobacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a produção e a secreção da citocina interferon-γ (IFN-γ). A detecção e quantificação do IFN-γ é o princípio do teste.

O teste envolve duas etapas, a incubação de sangue total com antígenos e a quantificação da produção IFN-γ por ELISA. Após 16-24 horas de incubação, a quantidade de IFN-γ secretada pelos linfócitos em resposta à estimulação com os antígenos (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(P4)) é mensurada (PAI *et al*., 2005) (figura 5). Os resultados são expressos em ρg/mL ou UI/mL. O teste apresenta elevada especificidade (acima de 98%, contra 35,4% do PPD, usando um ponto de corte de 10 mm) em indivíduos saudáveis vacinados com BCG (MORI *et al*., 2004).

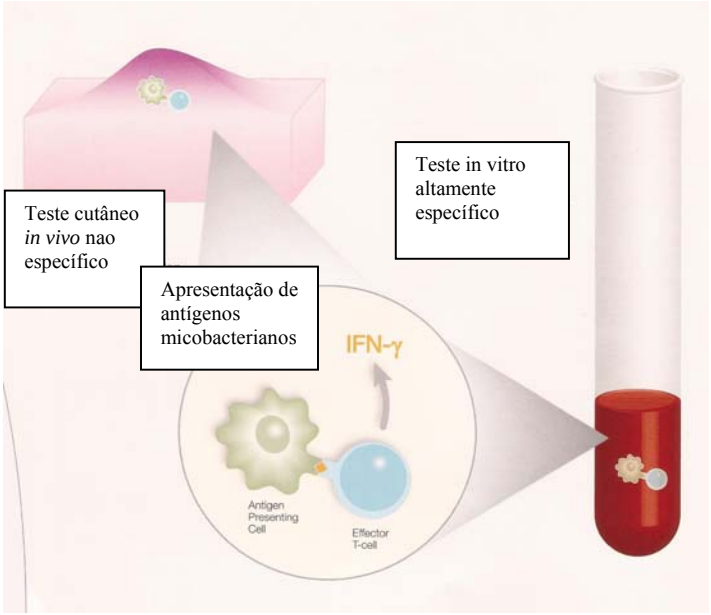
Estudos prévios relatam a sensibilidade do QFT-GIT variando entre 58% a 100%, dependendo da região geográfica e população; nos países em desenvolvimento a média global é

70% (MENZIES; PAI, 2008; DIEL *et al*., 2010). Uma estudo de meta-análise recente estimou a especificidade média e sensibilidade do QFT-IT, que foi de 97,7% e 67%, respectivamente (MENZIES *et al*., 2007). Em países de alta prevalência o QFT-GIT apresenta baixa sensibilidade no diagnóstico de TB, demonstrada por um estudo de metanálise realizado por Diel e cols. (2010)

Resultados de desempenho diagnóstico do QFT-GIT em imunodeprimidos ainda são discordantes. Aichelburg e cols. (2009) e Tsiouris e cols. (2005) observaram uma sensibilidade de 90,9% e 81%, respectivamente, para tuberculose ativa em pacientes infectados com HIV. Já em outros relatos ocorre um mau desempenho do teste, com sensibilidades que variam 65-78%, com especificidades variando 54-61%, quando são avaliados em imunodeprimidos (p. ex. HIV e hemodialisados) (AABYE *et al*., 2009; KOBASHI, 2007; PETRESCU *et al*., 2010).

O teste oferece algumas vantagens, como visita única do paciente, resultados em 24 horas, ausência de um novo desafio ao sistema imune do indivíduo, e não sofre interferência de vacinação prévia com o BCG, pois os antígenos utilizados não estão presentes nas cepas utilizadas na BCG (RICHELDI, 2006; DOMINGUEZ, 2008; PAI, 2008).

Figura 5: Princípio do QFT-GIT.



Fonte: Modificado de QuantiFERON-TB Gold – Cellestis

3.5.7 Teste Molecular – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica que permite a síntese enzimática *in vitro*, de sequências específicas de DNA através do uso de dois iniciadores (oligonucleotídeos) que hibridizam fitas opostas de DNA. PCR é o teste de amplificação de ácido nucleico mais explorado atualmente, é rápido, mas sua acurácia é muita heterogênea (FLORES *et al*., 2005).

Em 1998, a seqüência completa do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv foi publicada e pode ser constatado que o genoma, com 4.4 milhões de pares de base, com cerca de 4000 genes, é rico em elementos de inserção, seqüências repetidas e famílias conservadas de multigenes. Diferente de outras bactérias, a maior parte da capacidade codificadora está relacionada com a produção de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios, refletindo a dependência da micobactéria na degradação de lipídios do hospedeiro para a obtenção de nutrientes e síntese da parede celular (COLE *et al*., 1998).

O alvo mais comum usado na PCR é IS6110. Essa seqüência é específica para o complexo *M. tuberculosis* e está presente até 20 vezes no genoma, oferecendo múltiplos alvos para amplificação (SHAW, 1998). Entretanto, atualmente alguns estudos já demonstram algumas micobactérias atípicas que apresentam regiões do DNA homólogas ao IS6110 presente no complexo *M. tuberculosis* (MONTENEGRO *et al*., 2004; NOVAIS *et al*., 2008). Apesar de alguns estudos já demonstrarem que o IS6110 não faz parte exclusivamente do genoma do complexo *M. tuberculosis*, esta região continua sendo vastamente utilizada como marcador molecular para diagnóstico de TB, uma vez que, se os experimentos com IS6110 forem realizados por pessoal devidamente qualificado num laboratório convenientemente equipado, a sensibilidade e especificidade da PCR podem ser altas.

Em geral, os testes AAN tem apresentado um baixo desempenho no diagnóstico da TB, com sensibilidade média de 45,5% (28-55%) (ALMEDA *et al*., 2000; LIMA *et al*., 2009; LING *et al*., 2008; TORREA *et al*. 2005; KAFWABULULA *et al*., 2002; CHENG *et al*., 2004). Já a especificidade desses testes costuma ser alta, acima de 90%. Sarmiento e cols (2003) em sua meta-análise encontrou sensibilidade que variou de 9-100% e especificidade variando de 25-100% para PCR no diagnóstico de TB pulmonar com baciloscopia negativa, demonstrando uma alta variação e imprecisão desses resultados. Em pacientes com baciloscopia positiva apresentam

sensibilidade de 84 a 92% (KIVIHYA-NDUGGA *et al*., 2004; YAM *et al*., 2004) com uma especificidade geral de 96 a 99% (NACHEGA e CHAISSON, 2003).

Em relação aos fatores clínicos, o grau de suspeição tem um efeito direto sobre a utilidade da técnica. A maioria dos estudos considera a baciloscopia e cultura como os métodos de referência, de modo que, na prática o valor diagnóstico dos resultados dos testes de amplificação deve ser decidido após uma análise conjunta dos dados clínicos, epidemiológicos, exames convencionais e outros elementos disponíveis (DINNES, 2007).

Testes comerciais de amplificação de ácidos nucléicos apresentam 57-71% de sensibilidade nos casos onde a baciloscopia é negativa (GRECO *et al*., 2006). Essa variabilidade ocorre de acordo com a forma da TB, espécime biológico e a metodologia utilizados. Contudo, há também estudos que demonstram um desempenho melhor, sensibilidade maior que 85%, da técnica de PCR quando realizada pelo sistema em único tubo, utilizando o escarro como amostra biológica para confirmação de TB (KAHLA *et al*., 2009; SOO *et al*., 2006).

A eficácia da PCR no diagnóstico da tuberculose está relacionada com concentração de DNA na amostra clínica, o tamanho da seqüência do DNA alvo, o método de extração de DNA, técnica de amplificação, escolha dos *primers* e qualificação das pessoas responsáveis pela realização do ensaio (RATTAN, 2000; GARG *et al*., 2003).

Embora a PCR simples seja bastante útil para a detecção do *M. tuberculosis*, um procedimento que associa duas PCRs (Nested-PCR) concilia maiores sensibilidade e especificidade (MIYAZAKI *et al*., 1993). A reamplificação de produtos de PCR com um segundo par de oligonucleotídeos que se ligam internamente ao local de anelamento do primeiro par, deu origem à Nested-PCR. Diversos estudos já descreveram a utilização deste tipo de PCR em duas etapas na detecção de organismos infecciosos a partir de espécimes clínicos (ABATH *et al*., 2002). Este método aumenta a sensibilidade da técnica, porém apresenta problemas de contaminação, pois os tubos precisam ser abertos para a tranferência do produto amplificado na 1ª reação para o microtubo onde acontecerá a 2ª reação (LIMA *et al*., 2009).

Miyazaki e colaboradores (1993), ao analisarem a técnica de diagnóstico da TB por nested-PCR, relataram um limite de detecção para a primeira PCR de 10^2 unidades formadoras de colônias (UFC), com aumento de mil vezes após a segunda reação e sensibilidade de até 0,1 UFC (ASSIS *et al*, 2007).

Numerosos ensaios de PCR foram descritos utilizando seqüências conservadas de DNA como alvo da amplificação, para a detecção do complexo *M. tuberculosis* em espécimes clínicos de indivíduos adultos, mostrando a sua utilidade para o diagnóstico precoce da doença (LIMA *et al*., 2007; LIMA *et al*., 2009; PANDURO *et al*., 2000; PORTILLO-GÓMEZ; REBOLLO *et al*., 2006; LIRA, 2012; FULCO, 2012).

Atualmente, a PCR pode ser utilizada com confiança para excluir a tuberculose em pacientes com baciloscopia positiva, mas a sua baixa especificidade pode levar a iniciação errônea de terapia (GRECO *et al*., 2009).

A Nested-PCR em único tubo ou Single tube Nested-PCR (STNPCR) é mais rápida do que as técnicas de Nested-PCR convencionais e com menor possibilidade de contaminação, pois as duas reações de PCR ocorrem seguidamente, ou seja, os produtos amplificados na primeira servem de molde para a segunda reação, sem haver abertura nem troca de tubos ou adição de novos reagentes (LIMA *et al*., 2009). As maiores vantagens da STNPCR em relação à PCR convencional é a rapidez, a reprodutibilidade e um menor risco de contaminação cruzada por não haver abertura dos tubos entre a 1ª e a 2ª reação. Portanto, a STNPCR enquadra-se num tipo de diagnóstico rápido, com possibilidade de maior sensibilidade e especificidade.

Atualmente, dois ensaios de amplificação de ácidos nucléicos (AAN) estão aprovados pelo FDA e disponíveis para uso comercial: o AMPLICOR *M. tuberculosis* (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ) e o *Enhanced Mycobacterium tuberculose Direct*, E-MTD (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA). Ambos utilizam PCR para amplificar as sequências alvo de interesse.

A sensibilidade geral do teste Amplicor (em comparação com a cultura) para amostras respiratórias, de acordo com o fabricante é de 79,4-91,9%, a especificidade é de 99,6-99,8%. Portanto, o teste Amplicor foi aprovada pelo FDA apenas para a detecção direta do *M. tuberculosis* em espécimes respiratórios com baciloscopia positiva, enquanto que o teste de E-MTD é aprovado pelo FDA para detecção do *M. tuberculosis* em amostras com baciloscopia positiva e com baciloscopia negativa (SOINI e MUSSER, 2001).

A sensibilidade do ensaios de amplificação de ácidos nucléicos comerciais atualmente em uso, gira em torno de 80% na maioria dos estudos, e esses ensaios requerem apenas 10 bacilos por amostra (SCARPARO *et al*, 2000).

A American Thoracic Society (1999) recomenda a utilização da PCR como teste confirmatório adicional para amostras clínicas que possuem baciloscopia positiva. Em 2000, o CDC atualizou suas recomendações para o uso de testes de amplificação de ácidos nucléicos para o diagnóstico da doença ativa.

O CDC recomenda que a baciloscopia e os ensaios de amplificação de ácidos nucléicos, AAN (PCR), sejam realizados na primeira amostra de escarro coletada. Se a baciloscopia e a PCR forem ambos positivos, o diagnóstico é dado como tuberculose pulmonar. No entanto, se a baciloscopia for positiva mas a PCR for negativa, o CDC recomenda o teste para os inibidores (ácido p-nitrobenzóico, PNB e p-nitro-acetilamine-hidroxipropiofenona, NAP) que inibe o crescimento de MNT. Se os inibidores não são detectados, o processo é repetido em exemplares adicionais. Se o escarro permanece com baciloscopia positiva sem inibidores e PCR negativa, o paciente pode ser considerado portador de micobactérias não tuberculosas. Porém, se os inibidores são detectados, o teste AAN não oferece qualquer ajuda. Se uma amostra é baciloscopia negativa e AAN positivo e o mesmo resultado é obtido com uma amostra adicional, pode-se presumir TB. No caso em que todas as amostras de escarro permanecem baciloscopia negativa e AAN negativo, não se pode excluir a possibilidade de TB ativa, e um julgamento clínico devem ser utilizados nas decisões relativas à terapia contra a tuberculose.

3.6 Tratamento

A tuberculose é uma doença grave porém curável, na maioria dos casos. O tratamento dos bacilíferos é a atividade prioritária de controle da tuberculose, uma vez que permite anular rapidamente as maiores fontes de infecção. Poucos dias (aproximadamente 15 dias) após o início da quimioterapia correta, os bacilos praticamente perdem seu poder infectante (MS, 2010).

As drogas usadas, nos esquemas padronizados são: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etaambutol. O tratamento da tuberculose deve ser feito em regime ambulatorial, supervisionado, no serviço de saúde mais próximo da residência ou do trabalho do doente (MS, 2010).

Com o objetivo de detectar 70% dos casos de TB e curar 85% daqueles identificados, modelos variados de tratamento supervisionado (DOTS) incluídos na estratégia DOTS proposta pela OMS em 1993 foram mundialmente adotados na última década. A estratégia DOTS

proporcionou a elevação das taxas de cura em diversos lugares, entretanto, ela tem obtido variável e limitado sucesso em reduzir as taxas de incidência da TB e de resistência aos fármacos anti-TB, nos países em desenvolvimento, principalmente em grandes metrópoles e em locais com elevada prevalência de infecção pelo HIV (CONDE *et al*., 2002).

Quimioprofilaxia secundária é a administração de isoniazida a uma pessoa infectada pelo bacilo de Koch com a finalidade de evitar que ela adoeça (BRASIL, 2002a). O tratamento da infecção latente com isoniazida (na dose de 5 mg/kg a 10 mg/kg de peso, até a dose máxima de 300 mg/dia) reduz em 60% a 90% o risco de adoecimento (SMIEJA *et al*., 1999). Essa variação se deve à duração e à adesão ao tratamento. O tratamento deve ser reaalizado por um período mínimo de 6 meses (MS, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População e local de estudo

Foram selecionados para o grupo imunodeprimido 88 pacientes com diversos tipos de imunodepressão (HIV positivo, pré e pós-transplantados, portadores de doenças auto-imunes, desnutridos, etilistas, entre outros) com e sem sintomas clínicos de tuberculose, de ambos os sexos, de faixa etária variada, oriundos da enfermaria da DIP (doenças infecto parasitárias) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Para os indivíduos com HIV, a carga viral e o tratamento com antiretrovirais não influenciou na seleção desses pacientes. No grupo controle foram selecionados 12 indivíduos saudáveis, que não possuíam nenhuma desordem que levasse a imunodepressão.

Os participantes de ambos os grupos (n = 100) foram esclarecidos sobre a proposta da pesquisa e posteriormente convidados a participar do estudo. Após concordância, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1), em duas vias, referente à sua participação na pesquisa. Após a coleta do material biológico foi preenchida uma ficha com dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de cada paciente participante do estudo (anexo 2). Todas as amostras biológicas obtidas foram enviadas ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento da Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz/MS para serem realizados os procedimentos técnicos. O diagnóstico confirmatório da tuberculose foi realizado pelo médico acompanhante do serviço de saúde, segundo normas do Ministério da Saúde do Brasil (MS), 2010. O projeto de pesquisa foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (N^{o} 445/11) (anexo 3) e somente teve início após sua aprovação.

O diagnóstico de TB foi feito através de critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil: 2 das 3 baciloscopias positivas ou cultura positiva ou por sinais clínicos com raio X alterado com resposta ao tratamento terapêutico. Esses creitérios foram utilizados como padrão ouro para a confirmação de TB nos pacientes do estudo. O início da terapia anti-TB dos pacientes foi decidido pelo médico responsável pelo paciente independentemente do resultado dos testes QFT-GIT e STNPCR.

4.2 Casuística

a) **Grupo imunodeprimidos:** pacientes que possuíam condições que levaram a imunossupressão seja por, medicações imunossupressoras, doenças auto-imunes, infecção pelo HIV, entre outras, com suspeita ou não de TB.

b) **Grupo controle**: indivíduos saudáveis, sem manifestações clínicas da TB ou doenças e sem contato com adulto tuberculoso.

Critérios de exclusão:

- pacientes que já tinham iniciado o tratamento específico para tuberculose;
- pacientes em estado grave que necessitaram de cuidados de terapia intensiva.

4.3 Critérios de definição de caso de TB: Padrão-ouro

Para o estudo foi estabelecido como definição de caso de TB a presença do *M. tuberculosis* na cultura em meio específico e/ou melhora clínica evidente após 15 dias do início do tratamento específico, segundo o médico acompanhante do serviço de saúde.

4.4 Teste Tuberculínico

Em todos os participantes da pesquisa foi realizado o teste tuberculínico de Mantoux (TT) que utiliza o Derivado Protéico Purificado (PPD Rt 23), aplicado por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1 ml, equivalente a 2 UT (Unidades de Tuberculina). Os resultados foram obtidos após 72 horas (3 dias) seguindo as normas do MS(BRASIL, 2010). A aplicação e leitura do teste foram realizadas por profissional treinado para tal.

Para análise do TT foram considerados dois limites de acordo com cada grupo: para os imunodeprimidos foi considerado como reator todo paciente que apresentava uma indução ≥5mm; já para o grupo controle a reatividade foi considerada quando a indução era ≥10mm (BRASIL, 2010).

4.5 Coleta de amostras biológicas

4.5.1 Sangue

Foram coletados de cada indivíduo 7,5 mL de sangue, por punção venosa, que foram posteriormente distribuídos da seguinte forma: 4,5mL para o tubo contendo o anticoagulante EDTA (Vacutainer®, Becton and Dickson, England), utilizado na PCR em único tubo e 3mL para o teste imunológico (QuantiFERON®-TB GOLD), distribuídos igualmente (1 mL) em cada tubo (Nil, TB Antigen e Mitogen) (figura 6). Os tubos Nil e Mitogen funcionam como controles negativo e positivo, respectivamente, do teste.

4.5.2 Urina e outros fluidos biológicos

Além de sangue, três amostras de urina (a primeira da manhã), em dias consecutivos, foram solicitadas para cada paciente. Em 2 pacientes, além do sangue e urina, foram obtidas outras amostras (escarro ou líquido cefalorraquidiano-LCR). Para a utilização do kit QuantiFERON-TB Gold *in tube* foram empregadas apenas amostras de sangue. Sangue e outras amostras disponibilizadas foram utilizadas na STNPCR e para cultura.

Figura 6: Tubos para coleta sanguínea utilizados na dosagem do interferon-γ.

Fonte: www.cellestis.com

4.6 Isolamento de células mononucleares

As células mononucleares do sangue foram separadas, seguindo o protocolo para amostras de sangue que dão entrada no laboratório de Imunoepidemiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da seguinte maneira: a amostra de sangue foi transferida para um tubo tipo Falcon® (15 mL) e foi diluída na mesma proporção (4 mL) em PBS (pH = 7,2). Em outro tubo tipo Falcon® (15 mL), adicionou-se 3mL de Ficoll Histopaque® (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). O sangue previamente homogeneizado com PBS foi adicionado lentamente pela parede do recepiente, ao tubo contendo Ficoll e centrifugado a 2000g por 30 min.

Após esse procedimento, o plasma e os leucócitos (células mononucleares) obtidos foram congelados separadamente a -70°C para posterior extração de DNA. O concentrado de hemácias gerado foi desprezado de acordo com normas de biossegurança.

Esse isolamento ocorre com o intuito de aumentar a sensibilidade da amostra, uma vez que por serem intracelulares facultativos, os bacilos *M. tuberculosis*, normamente se encontram no interior de algumas células pertencentes à série branca do sangue.

4.7 Descontaminação e cultura da urina e outras amostras

Três amostras de urina (a primeira da manhã), em dias consecutivos, foram solicitadas para cada paciente. O LCR não recebeu tratamento de descontaminação por ser considerado uma amostra estéril sendo diretamente semeado em meio de cultura apropriado para o cultivo do *M. Tuberculosis*. A cultura das amostras obtidas (urina, escarro e LCR) foi considerada como um dos "padrões ouro" para o diagnóstico da TB.

Para a identificação das micobactérias, as amostra de urina e escarro, foram descontaminadas pelo método de Petroff (NaOH 4%) e semeada em quatro tubos contendo o meio Löwenstein-Jensen (LJ): 1) dois tubos de meio Löwenstein-Jensen (simples – sem drogas) que identifica o gênero *Mycobacterium*; 2) um tubo de meio LJ com PNB (ácido para-nitrobenzóico) que identifica cepas de Micobactérias atípicas; 3) um tubo de meio LJ com TCH (hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico) para identificar a espécie *Mycobacterium tuberculosis*. Os tubos foram colocados em estufa a 37ºC e avaliados uma vez por semana até a 8ª semana, ou antes, desde que apresentassem positividade (crescimento de colônias em algum tubo (figura 7). Os meios de LJ foram preparados pela equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Todos os meios preparados passaram por testes de esterilidade (estufa a 37ºC sem inoculação de amostra), de controle de qualidade do meio (inoculação de cepa de referência H37Rv de *M. tuberculosis*), e os procedimentos seguiram o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

Figura 7: Meio Löwenstein-Jensen contendo culturas de *M. tubeculosis*.

4.8 Extração de DNA

Todas as amostras obtidas de cada paciente foram submetidas ao processo de extração de DNA seguindo o protocolo do fabricante do *kit* QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). O primeiro passo foi pipetar 20µl de proteinase k em um microtubo de 1,5ml. Em seguida, adicionou-se 200µl da amostra e 200µl do Buffer AL. Os microtubos foram agitado no vórtex por 15 segundos. Em seguida, os mesmos foram incubados em banho-maria a 56ºC por 10 minutos e então, centrifugados a 13000 RPM por 1 minuto, para retirar as bolhas que foram formadas. Depois, 200µl de etanol (96-100%) foram adicionados e mais uma vez centrifugado a 13000 RPM por 1 minuto.

Após a conclusão desta etapa, a mistura foi transferida para o QiAmp Mini Spincolumn, sem molhar a parede da coluna, centrifugada a 8000 RPM por 1 minuto, e logo em seguida, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor, o coletor contendo o filtrado foi descartado. Adicionou-se então, na coluna, 500µl do Buffer AW1, levou-o para centrifugação a 8000 RPM por 1 minuto. Ao fim dessa centrifugação, desprezou-se o coletor contendo o filtrado, e um novo tubo coletor foi acoplado à coluna. Em seguida, foram adicionados 500µl do Buffer AW2, a amostra foi centrifugada por 13000 RPM por 3 minutos. Novamente, o tubo coletor com o filtrado foi descartado, e um novo coletor foi acoplado à coluna. A amostra foi centrifugada mais uma vez, a 13000 RPM por 1 minuto. Por fim, a coluna foi tranferida para outro microtubo e o tubo coletor com o filtrado foi descartado. Adicionou-se na coluna 200µl do Buffer AE. A amostra ficou em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente, e foi então centrifugada a 8000 RPM por 1 minuto e logo após congeladas a -70°C.

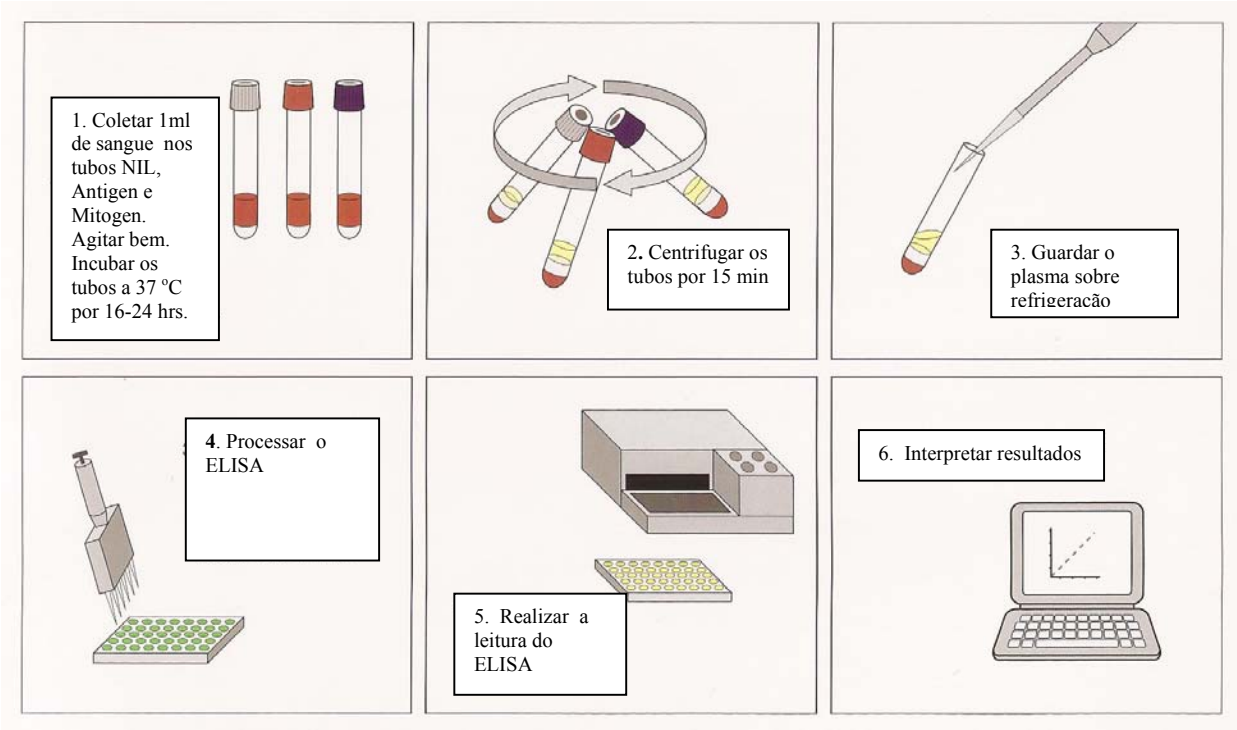
Para as amostras processadas no mesmo momento, foi feito um controle negativo que seguiu todo o protocolo do fabricante, colocando-se tampão TE ou água destilada no lugar da amostra (Qiagen).

4.9 QuantiFERON®-TB Gold *in tube* (QFT-GIT)

As amostras de sangue para o QFT-GIT foram obtidas imediatamente antes da execução do TT. O referido teste comercial foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit QuantiFERON®-TB Gold (Cellestis). Um mililitro de sangue total, foi coletado em cada um dos

três tubos de ensaio separadamente: um sem antígeno (controle nulo), um com antígenos da TB (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7) e um com fitohemaglutinina (mitógeno ou controle positivo). Os três tubos foram incubados por 16-24 horas a 37 ˚C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, entre 2000 a 3000 g, para obtenção do plasma. O plasma removido de cada tubo foi colocado em um criotubo. Esses criotubos foram, então, congelado a -70 ˚C para posterior utilização na segunda fase da técnica (ELISA) (figura 9). A quantificação do IFN-γ foi feita por ELISA também de acordo com as instruções do fabricante.

Figura 8: Estágios de processamento do QFT-TB.

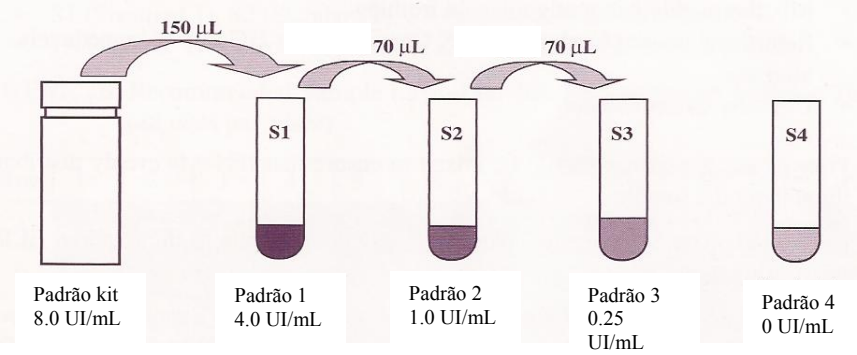


Fonte: Modificado de www.cellestis.com

Para a realização do ELISA todas os regentes, exceto o conjugado 100X concentrado, foram colocados à temperatura ambiente por 60 minutos (min). Durante esse tempo, foram reconstituídos o padrão na concentração 8,0 UI/mL e o conjugado 100X concentrado, ambos em água destilada. Após reconstituído, o padrão sofreu as seguintes diluições, utilizando o diluente disponível no *kit*: 4UI/ml, 1UI/mL, 0,25UI/mL, 0 UI/mL (neste útltimo, só diluente verde) (figura 9). Após realizadas as diluições, 50µL de conjugado foi distribuído em cada poço da

placa de microtitulação, em seguida adicionou-se 50μL de plasma proveniente da primeira etapa do teste em cada poço. Essa mistura foi agitada durante 1 min em um agitador de microplacas. Ao fim desse processo a placa contendo as amostras foi coberta, para evitar exposição à luz, e incubada durante 120 min à temperatura ambiente.

Figura 9: Preparação da curva padrão.



Fonte: Modificado de www.cellestis.com

Na etapa seguinte, os poços foram lavados com 400 μL do tampão de lavagem diluído, disponível no *kit*, esse procedimento foi repetido 6 vezes. Depois, adicionou-se 100 μL de substrato em cada poço e agitou por 1 min no agitador de placas. Novamente a placa foi coberta e incubada por 30 min à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, acrescentou-se 50 μL de solução de parada em todos os poços e homogenizou com o agitador. Em seguida ocorreu a leitura dos resultados a 450nm com o filtro de referência de 620nm.

Os resultados gerados no ELISA foram analisados no *software* QuantiFERON-TB Gold Analysis e interpretados de acordo com a tabela 2.

Tabela 2: Intepretação dos resultados do QFT-GIT

Nil (UI/mL)	TB Antigen – Nil (UI/mL)	Mitogen – Nil (UI/mL)	QuantiFERON-TB (UI/mL)
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	**Negativo**
	≥ 0.35 e < 25% do valor de Nil	≥ 0.5	
	≥ 0.35 e ≥ 25% do valor de Nil	-	**Positivo**
	< 0.35	< 0.5	**Indeterminado**
	≥ 0.35 e < 25% do valor de Nil	< 0.5	
> 8.0	-	-	

4.10 Nested-PCR em único tubo (STNPCR)

A STNPCR utilizada no estudo foi otimizada por Lima e colaboradores (2009): foi feito um gradiente de concentração dos pares dos oligonucleotídeos utilizados mantendo fixa a concentração do par interno e variando-se a do externo. Para tanto, a concentração do par de oligonucleotídeos internos foi fixada em 50pmol em 5 microtubos de reação onde fez-se o gradiente de concentração do par externo, que variou de 50 a 0,005pmol de oligonucleotídeos. Para verificação da especificidade dos oligonucleotídeos foram feitas reações de STNPCR nas mesmas condições já descritas, em diversos tubos contendo genoma de várias espécies de micobactérias (*M. avium, M. smegmatis* e *M. fortuitum*) e DNA humano (de indivíduo sadio). Em um tubo foi colocado como *template* para a reação de PCR, DNA humano; nos outros tubos colocaram-se DNA das micobactérias atípicas (*M. smegmatis*, *M. smegmatis* e *M. fortuitum*) e último tubo, colocou-se apenas água (controle negativo) para avaliar o anelamento inespecífico entre os oligonucleotídeos (formação de dímeros).

A técnica foi otimizada primeiramente com DNA genômico purificado de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* de referência (H37Rv) e posteriormente em amostras biológicas.

Foram feitas curvas com fator 10 de diluição para a verificação do limite de detecção de DNA do *M. tuberculosis* pela técnica de STNPCR (LIMA, 2009).

O alvo escolhido para ser utilizado foi a sequência de inserção IS6110, sendo esta, parte de um transposon de 1350 pb. Os métodos baseados em STNPCR seguiram os princípios propostos por Abath, e colaboradores (2002) e foram otimizados para amostras de sangue e urina humanos (LIMA, 2009). A sequência de inserção IS6110 (GenBank accession Nº. X52471) foi o alvo para PCR. Os oligonucleotídeos externos utilizados foram TJ5 (5' - CCG CAA AGT GTG GCT AAC – 3') e TJ3 (5' – ATC CCC TAT CCG TAT GGT G – 3'), que amplificaram um fragmento de 409pb e os oligonucleotídeos internos foram o OLI5 (5' – AAC GGC TGA TGA CCA AAC – 3') e STAN3 (5' – GTC GAG TAC GCC TTC TTG TT – 3'), amplificando um fragmento de 316pb (RITIS *et al*., 2000).

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador automático (Eppendorf Gradiente). A primeira etapa de PCR consistiu em 15 ciclos executados da seguinte maneira: desnaturação a 94^0C por 1 min; anelamento dos *primers* a 57^0C por 1 min e polimerização das novas cadeias complementares pela ação da enzima Taq polimerase a 72^0C por 1 min; enquanto que a segunda etapa consistiu em 45 ciclos com as mesmas especificações de tempo e temperatura da etapa anterior (94^0C – 1min; 60^0C – 1min e 72^0C – 1min).

Os primeiros 15 ciclos da reação continham apenas 0,5 pmoles de oligonucleotídeos externos em um volume final de 50µl contendo Tris-HCl a 200mM, com pH=8.4, KCl 500mM (Tampão 10x), $MgCl_2$ a 2,5mM, dNTP 2mM x 5µl, e 5U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Os oligonucleotídeos internos, antes do início da PCR, foram diluídos na mesma proporção com água e azul de bromofenol (2µg/ml), contendo 50pmoles de cada oligonucleotídeo e em seguida esta mistura foi fixada na superfície interna da tampa dos microtubos abertos, numa estufa a 37ºC ou temperatura ambiente. Para que os oligonucleotídeos internos passassem a fazer parte dos 45 ciclos finais da PCR, os mesmos foram eluídos da superfície interna do microtubo através de interrupção breve da PCR após o 15º ciclo de reação e feitas repetidas inversões dos tubos para que entrassem em contato com a mistura de reação e passassem a participar dos ciclos subsequentes da PCR.

Todas as reações da STNCPCR tiveram um controle negativo (10µl de TE) e um controle positivo (2µl de DNA de cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e mais 8µl de água milli-Q estéril).

Todas as amostras negativas foram repetidas para confirmação do resultado. Também se utilizou um controle negativo e um controle positivo para cada reação de PCR.

As amostras advindas da PCR foram colocadas na temperatura de 4-8°C por 48 horas, até que fosse realizada a eletroforese para visualização do produto amplificado.

Os amplicons gerados através da Nested-PCR em único tubo foram separados em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (3µl de brometo em 120ml de tampão TE 1x), e visualizados sob luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi o Low Mass Ladder (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA).

4.11 Análise estatística

Os dados obtidos no estudo foram inseridos num banco utilizando o programa SPSS 10.0 for Windows® (Chicago, IL) para posterior análise estatística. A sensibilidade, especificidade, Valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram calculados através do programa Epi-Info 6.04 (CDC-USA/WHO-Switzerland). Foi definido como nível de significância o valor de 5%. ($p<0,05$).

Os índices de concordância dos testes analisados, foram determinados através do cálculo do coeficiente kappa (κ), usando o SPSS 10.0. De acordo com Altman (1991), os padrões utilizados para definir a concordância foram: κ 0,21-0,40, concordância fraca; κ 0,41-0,60, concodânciaa moderada; κ 0,61-0,80, boa concordância.

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas dos participantes

As características clínicas e demográficas são apresentadas na tabela 3. A idade média dos pacientes foi de 38 anos (intervalo 21-68), o sexo prevalente foi o masculino (63%). No grupo dos imunodeprimidos 80 eram portadores do HIV, 1 transplantado, 1 renal crônico, 2 etilistas crônico, 1 com espondilite anquilosante, 1 síndrome mielodisplásica, 1 leucemia e 1 com linfoma de Hodgking. A contagem média de linfócitos T CD4+ do pacientes HIV positivos foi de 215 células/μL (intervalo 5-1157). A descrição do uso de TARV (terapia anti-retroviral) foi retirada da análise, visto que havia muitos pacientes que relataram uso irregular da medicação. Cicatriz vacinal por BCG foi vista em 78% de todos os indivíduos envolvidos na pesquisa, tendo sido observada em todos os indivíduos do grupo controle, porém estando ausente em 25% dos pacientes imunocomprometidos.

Tabela 3: Características clínicas e demográficas dos pacientes do estudo.

	Total	**Pacientes imunodeprimidos**	**Grupo controle**
N	100	88	12
Masculino/Feminino	62/38	58/30	4/8
Idade, média	38 (21-68)	40 (22-68)	26 (21-33)
Imunossupressão			-
HIV	80 (90,90)		
Outros	8 (9,1)		
Média de céls CD4 (céls/μL)	220(5-1157)	220(9-1157)	-
Vacinação BCG, *n* (%)	78 (78)	66 (75)	12 (100)
Tratamento prévio para TB, n (%)	12	12 (13,6)	0 (0)
Cultura positiva, *n* (%)	5	5/83 (6)	0/8 (0)
TT			

Reator, *n* (%)	15 (16,3)	14 (17,5)	1 (8,3)
Não reator, *n* (%)	77 (83,7)	66 (82,5)	11 (91,6)

BCG, bacillus Calmette-Guerin; TB, tuberculose

Entre os imunodeprimidos, a TB ativa foi diagnosticada em 21 (23,9 %) pacientes (14 com doença pulmonar e 7 casos de TB extrapulmonar) e infecção tuberculosa latente (ITBL) em 6 (6,8%). Doze (13,6%) pacientes do grupo imunodeprimido relatava história prévia de tratamento para TB.

5.2 Desempenho dos testes diagnósticos

O TT foi realizado em 92 participantes. Em oito pacientes HIV positivo que relataram ter feito o TT em menos de 3 meses, o mesmo não foi repetido para evitar o possível efeito *booster* (aumento de no mínimo 6mm entre a primeira e a segunda aplicação do TT, de acordo com a SBPT, 2004).

Todos os 100 participantes foram testados com QFT-GIT e TT (figura 10). Apenas 7 pacientes do grupo imunodeprimido apresentaram positividade ao QFT-GIT, desses, 5 tiveram o diagnóstico confirmado: 4 com TB ativa e 1 com ITBL. Apenas 1 paciente do grupo controle apresentou reatividade ao TT, com uma indução de 14mm, porém sem sinais clínicos nem radiológicos compatíveis com doença. No grupo imunodeprimido, 14 apresentaram reatividade, com indução variando entre 6-21mm. A sensibilidade do QFT-GIT e do TT foram respectivamente, 64,3% e 69,2% (tabela 4). Para os cálculos de sensibilidade e especificidade dos testes foram utilizados todos os pacientes: os 27 casos confirmados de TB e os casos verdadeiramente negativos. Para análise do desempenho (sensibilidade e especificidade) do QFT-GIT, os 10 pacientes que obtiveram resultados indeterminados foram excluídos dos cálculos.

Figura 10: Fluxograma que apresenta a distribuição dos resultados QFT-GIT nos pacientes TT reatores e não reatores.

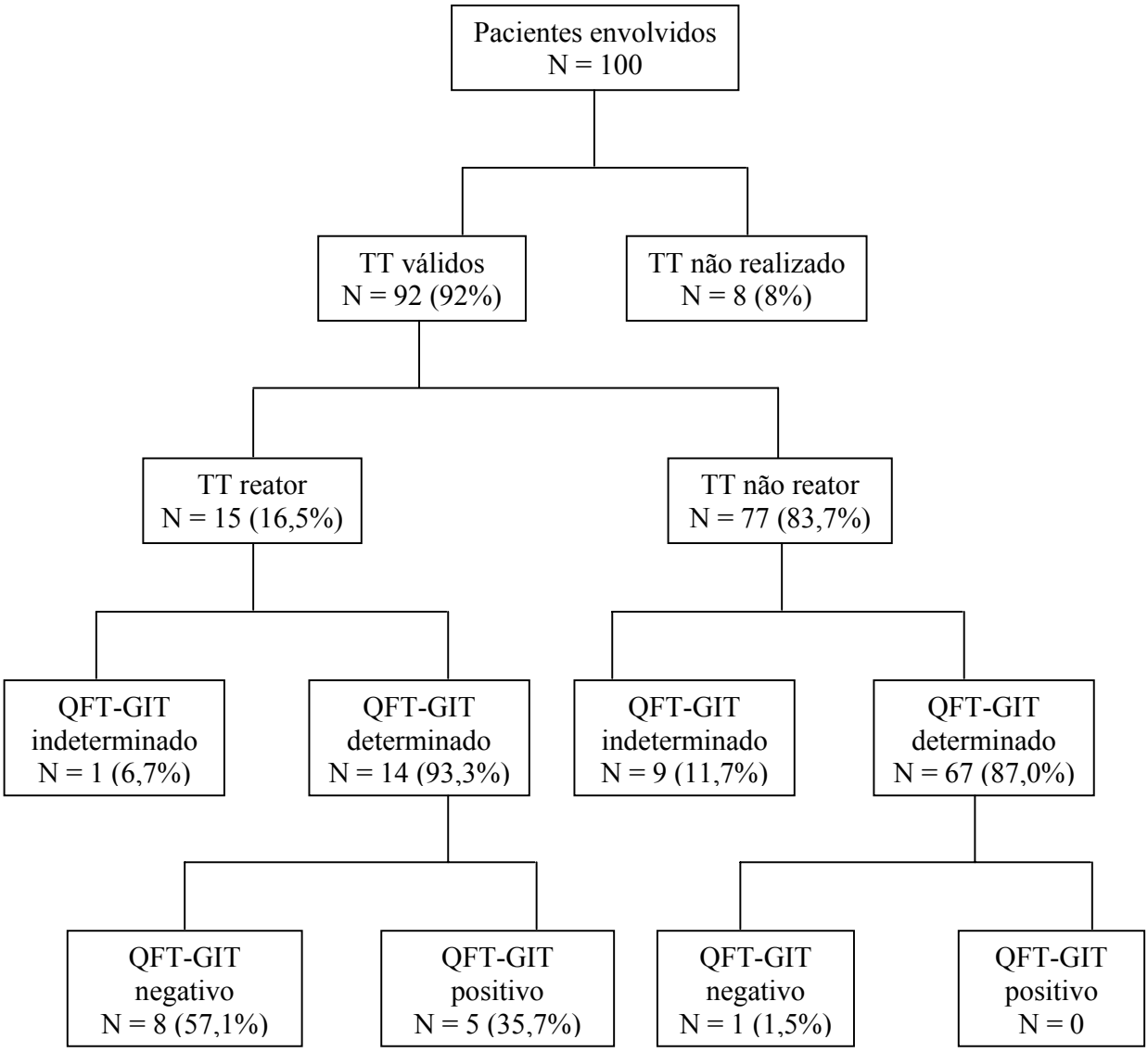


Tabela 4: Desempenho dos testes TT, QFT-GIT e STNPCR de acordo com o estado imunológico dos pacientes.

	Sensibilidade % (%95% IC)	Especificidade % (%95% IC)	VPP %	VPN %	Acurácia %
TT	69,2 (54,7-83,7)	98,1 (94,5-101,8)	96,4 (89,6-130,3)	81,3 (71,7-90,8)	85,9 (78,8-93,0)
QFT-GIT	57,4 (43,3-71,6)	95,3 (89,1-101,6)	93,1 (83,9-102,3)	67,2 (55,4-79,0)	75,6 (66,7-84,4)
STNPCR	64,3 (49,8-78.8)	91,4 (84,2-98,6)	84,4 (71,8-97,0)	77,9 (68,1-87,8)	80,0 (72,2-87,8)

TT, teste tuberculínico; QFT-GIT, QuantiFERON-TB GOLD In Tube; STNPCR, PCR em único tubo; 95% IC, 95% intervalo de confiança; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo.

Todas as amostras biológicas (sangue, urina e escarro) disponíveis de cada paciente foram amplificadas por nested-PCR em único tubo para detecção do *M. tuberculosis*. A positividade desse ensaio foi vista em 17 pacientes imunodeprimidos. Destes, 12 (70,6%) pacientes tiveram o diagnóstico confirmado pelos padrões-ouro utilizados na pesquisa (cultura e diagnóstico clínico), sendo 11 TB ativa (9 com padrão pulmonar e 2 TB óssea) e apenas 1 ITBL. A sensibilidade e especificidade da STNPCR foi de 64,3% (95% IC 49,8-78,8) e 91,4% (95% IC 84,2-98,6) respectivamente. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia dos testes utilizados estão apresentados na tabela 4.

Os coeficientes de concordância estão apresentados na tabela 5. A concordância global entre os testes diagnósticos QFT-GIT e TT foi considerada moderada com o valor de κ 0,41 ($p<0,001$), entre o STNPCR e o TT a concordância obtida foi fraca, κ 0,22 ($p = 0,03$). Não houve concordância significativa entre a STNPCR e o QFT-GIT. Quando se avaliou a correlação dos testes TT e QFT-GIT em pacientes com TB confirmada, o resultado encontrado foi uma fraca concordância ($\kappa = 0,36$).

A cultura da urina foi realizada em 82 pacientes, 2 pacientes tiveram também outras amostras semeadas (LCR e escarro). Em apenas 23,8% (5/21) dos casos de TB, confirmados por resposta ao tratamento clínico houve crescimento bacteriano em cultura. Nenhum dos pacientes do grupo controle (imunocompetente) apresentou positividade nos testes QFT e STNPCR e nem na cultura.

5.3 Níveis de células T CD4+

Os indivíduos infectados pelo HIV foram estratificados de acordo com a contagem de linfócitos T CD4+ em <100, 100-350 e >350 céls/µL (tabela 6, figura 11). Dos 80 pacientes HIV positivos, foram obtidos os níveis de T CD4+ em 68. A frequência de resultados indeterminados declinou com o aumento do número de células CD4+ circulantes, 14,3%, 13,0% e 5,9%.

Tabela 6: Resultados positivo, negativo e indeterminado para QFT e TT em pacientes HIV, estratificado pela contagem de células T CD4+.

Contagem de CD4 (Céls/µl)	No. de pacientes	QuantiFERON-TB GOLD In Tube			Teste tuberculínico (TT)		
		Positivo	Negativo	Indeterminado	0 mm	>5 mm	>15 mm
< 100	28	2	22	4	27	1	0
100 – 350	23	3	17	3	19	0	4
>350	17	1	15	1	14	1	2
Total	68	6	54	8	60	2	6

Figura 11: Frequência dos resultados positivos aos testes QFT-GIT e TT nos pacientes HIV positivos, estratificados pelo número de células T CD4+ circulantes.

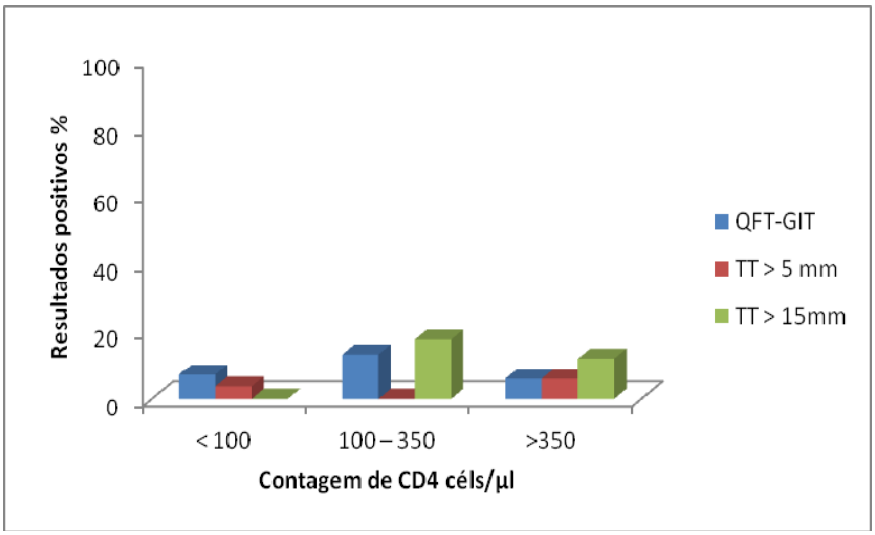


Tabela 5: Concordância (κ) entre os testes TT, QFT-GIT e STNPCR, aplicados em todos os indivíduos envolvidos no estudo.

	TT e QFT-GIT		TT e STNPCR		QFT-GIT e STNPCR	
	Concordância, %	**Valor κ**	**Concordância, %**	**Valor κ**	**Concordância, %**	**Valor κ**
Todos os indivíduos envolvidos	87,8	0,41	78,3	0,22	80,0	0.16
Pacientes com imunodeprimidos TB confirmada	58,3	0,36	46,15	-0,16	48,0	-0,05

TT, teste tuberculínico; QFT-GIT, QuantiFERON-TB GOLD *In Tube*; STNPCR, PCR em único tubo; TB, tuberculose.

6. DISCUSSÃO

Os testes diagnósticos IGRA vêm sendo testados em diferentes condições que levam à imunossupressão. Ainda não se chegou a um consenso sobre a verdadeira sensibilidade e especificidade desses testes em relação aos pacientes imunodeprimidos que apresentam respostas imunológicas variadas, dependo do grau e do tipo de morbidade que levaram a imunossupressão.

Menos da metade dos casos de TB em pacientes infectados pelo HIV são diagnosticados antes da morte. Apesar do aumento do número de pacientes HIV co-infectados com TB, ainda não há um teste confiável para confirmar infecção ativa por *M. tuberculosis*, ou para detectar infecções latentes em indivíduos assintomáticos (HOFFMAN et al., 2007). Dessa forma, esse estudo teve como foco avaliar o desempenho do QFT-GIT e da STNPCR no diagnóstico de TB em pacientes imunodeprimidos residentes em uma área endêmica para a doença.

Para análise de desempenho das técnicas utilizadas no atual estudo foram calculados os coeficientes de sensibilidade e especificidade. Ao analisar as sensibilidades dos testes QFT-GIT (57,4%) e TT (69,2%), observamos que o desempenho de ambos foi baixo, sem que houvesse diferença significativa entre os testes comparados. Esse achado pode ser justificado pela deficiência de resposta imunológica que os pacientes imunodeprimidos, em sua maioria HIV positivos, apresentam. Esses resultados são comparáveis a estudos prévios que avaliam pequenos grupos de pacientes imunodeprimidos (n <200), em sua maioria HIV, em locais com altas taxa de incidência de TB (CATTAMANCHI *et al*., 2011; DHEDA *et al*., 2009). Jung e colaboradores (2012) avaliaram o TT e o QFT-GIT no diagnóstico de TB em pacientes imunodeprimidos. Esse estudo, realizado na Coréia do Sul, local de incidência moderada de TB, envolveu 119 pacientes imunodeprimidos com suspeita de TB, porém com baciloscopia negativa, que foram divididos em 4 grupos de acordo com o tipo de imunossupressão: diabetes *mellitus*, uso de medicamentos imunossupressores, renais crônicos e portadores de doenças malignas. Nessa avaliação, foi demonstrada uma sensibilidade de 59% (95% IC 44,9-72,0) e uma especificidade de 61,3% (95% IC 54,4-67,6) do QFT-GIT nos pacientes imunodeprimidos. O TT também não apresentou um bom desempenho a nível de sensibilidade, 41,2% (95% IC 28,3-50,8). Diante disso, Jung e cols. concluíram que nem o QFT-GIT, nem o TT podem ser utilizados como única ferramenta diagnóstica de TB, em pacientes imunodeprimidos, residentes em países com moderada incidência da doença.

Veldsman e cols (2009) também demonstraram baixas sensibilidade (30%) e especificidade (63%) do ensaio QFT-GIT quando comparados com os resultados da cultura, que foi considerada como padrão ouro, em seu estudo realizado na África do Sul em 60 pacientes com HIV. Em áreas onde a TB e o HIV são prevalentes, a sensibilidade do IGRA tem sido baixa (DIEL *et al*., 2010). O valor diagnóstico do teste é significativamente diminuido pelas altas proporções de resultados indeterminados em individuos HIV positivo (CHUNG *et al*, 2011).

Aabye e cols. (2009) compararam o desempenho do QFT-GIT em 161 pacientes, divididos em 2 grupos: HIV positivos com 68 indivíduos e HIV negativos com 93 participantes. Os pacientes foram provenientes da África, país endêmico para TB e HIV e foram diagnosticados para TB pulmonar através da cultura do escarro. Nesse estudo, foi observada uma sensibilidade maior do teste nos pacientes HIV negativos (81%) que a encontrada no grupo HIV positivo (65%).

Por outro lado, existem também estudos que verificaram um bom desempenho do teste imunológico, onde a sensibilidade encontrada está acima de 70% (TSIOURIS *et al*., 2005; RABY *et al*., 2008) e outros que demonstraram um bom desempenho dos IGRA com sensibilidade acima de 80% (RICHELDI *et al*., 2009; CHUNG *et al*., 2011; KANG *et al*., 2005; MENZIES *et al*., 2007, CHO *et al*., 2007; BORGSTROM *et al*., 2011; GAO *et al*., 2012). Esses resultados promissores geralmente ocorrem em pacientes sem patologias imunossupressoras e em locais de baixa incidência de TB.

Poucos são os relatos (TSIOURIS *et al*., 2005) que conseguem associar um bom desempenho diagnóstico dos IGRA em pacientes com estado imunológico deficiente em locais de alta prevalência da TB. Richeldi e cols. (2009) estudaram o desempenho do QFT-GIT em 331 pacientes imunodeprimidos que foram categorizados em 3 grandes grupos, de acordo com o tipo de imunossupressão: hepatopatas crônicos, HIV positivos e pacientes com malignidades hematológicas. Os bons resultados encontrados sugerem que o QFT-GIT (15,1% resultados positivos) é capaz de identificar um maior número de casos de TB que o TT (10,9% resultados reatores). Assim como Richeldi e cols., Tsiouris e cols (2005) também obtiveram boas taxas de positividade do QFT-GIT em relação ao TT. Esses resultados poderiam ser explicados pelo maior número de pacientes avaliados que já tinham diagnóstico confirmado para TB. Diferentemente, em nosso estudo os pacientes imunodeprimidos foram avaliados independente

de ter ou não a TB confirmada, o que justificou ao final, a obtenção de um pequeno número de casos confirmados para a doença.

A proporção de resultados indeterminados obtidos neste estudo através do teste QFT-GIT, está de acordo com alguns trabalhos realizados com indivíduos imunodeprimidos. Manuel e cols. (2007) observou 7,8% de indeterminados em pacientes hepatopatas crônico, Pratt *et al*, encontrou 10% de resultados indeterminados ao avaliar pacientes com artrite reumatóide, enquanto Ravn e cols. (2004) e Miranda e cols. (2009) encontram 12% e 11%, de resultados indeterminados, respectivamente, em HIV positivos. Similar a esses dados, a maioria (87,5%) dos resultados indeterminados encontrados neste estudo foi observado em pacientes com uma baixa contagem de T CD4+ (< 350 células/μL). Esse achado pode ser explicado pela anergia resultante da diminuição de linfócitos T os quais são responsáveis por produzir respostas positivas no QFT-GIT como também no TT (RANGAKA *et al*., 2007).

No entanto, existem trabalhos que utilizam diferentes populações de estudo, incluindo indivíduos com e sem imunossupressão que observaram um maior índice (>17%) de resultados indeterminados (BABA *et al*, 2008; MORI *et al*., 2004; FERRARA *et al*., 2006; BROCK *et al.,* 2006; CONNEL *et al*., 2006; DHEDA et al., 2009). Apenas 1 paciente com resultado indeterminado no QFT-GIT apresentou reatividade ao TT, com indução de 15 mm, dado semelhante ao encontrado por Kim e cols (2009).

Apesar do pequeno número de pacientes (8) com resultados indeterminados ao QFT-GIT que possuíam a quantificação de células T CD4+, observou-se que quanto menor a quantidade de células maior a possibilidade de se encontrar um resultado indeterminado (tabela 6). O número de resultados negativos (40,7%) e indeterminados (50%) foi maior nos pacientes que apresentaram menos de 100 células T CD4+ circulantes. Essa razão inversa entre o número de T CD4+ e resultados indeterminados também foi observada por Balcells e colaboradores (2008), Aabye e cols. (2009) e Leidl e cols (2010).

Alguns estudos relatam que o uso potencial dos IGRAs em áreas endêmicas para TB e HIV, pode ser útil na exclusão de TB em pacientes com suspeita da doença, bem como no rastreio de ITBL nas populações de risco, como os HIV-positivos, portadores de doenças crônicas, transplatados, entre outros (DOSANJH *et al*., 2008). Em nossa avaliação, assim como em outros estudos (VELDSMAN *et al*., 2009; KABEER *et al*., 2009) esse fato não pode ser confirmado, já que o QFT-GIT apresentou um baixo desempenho no diagnóstico de TB em

pacientes imunodeprimidos. Este fato provavelmente pode ser justificado por se avaliar o desempenho de um teste imunológico dependente, sobretudo da imunidade celular em pacientes que sabidamente possuem condições que levam a um déficit das células T. Nesta pesquisa pode ser observado que a maioria dos pacientes imunodeprimidos com suspeita de TB não reagiram ao TT, o qual é considerado uma técnica que reflete a condição da imunidade celular do indivíduo.

O TT é utilizado em todo o mundo há mais de um século, como um auxiliar no diagnóstico de infecção por tuberculose, mesmo possuindo algumas conhecidas limitações (reação cruzada com BCG, dificuldade no retorno do pacientes para leitura do mesmo; baixa sensibilidade nos imunodeprimidos) (TIWARI *et al*., 2007). Na Índia (um país com alta incidência de TB e poucos recursos, assim como o Brasil), um estudo de 15 anos de acompanhamento de 280.000 indivíduos sugeriu que o TT continua a ser um teste útil para auxiliar no diagnóstico da TB na população em geral (PAI, 2005).

Nesta pesquisa, a sensibilidade do TT (69,2%) foi maior em relação a vários trabalhos descritos (LUETKEMEYER *et al*., 2007; BALCELLS *et al*., 2008). Em um estudo realizado em Zambia, apenas 30% dos pacientes HIV positivos apresentam reatividade ao TT (DUNCAN *et al*., 1995).

Tsiouris e *cols* (2005) observou uma maior sensibilidade do TT (90%), nos casos de TB, em relação ao IGRA (76%). Esse estudo teve como objetivo a análise da sensibilidade do QFT-GIT e foi realizado na África do Sul com 154 pacientes HIV positivos que posuíam culturas positivas para *M. tuberculosis*.

Como estava-se avaliando o TT em pacientes imunodeprimidos, cuja resposta imunológica encontra-se sabidamente alterada por apresentarem diminuição de linfócitos T CD4+, os quais são fundamentais na resposta celular tardia desencadeada pelo antígeno da tuberculina injetada nesse teste, esperava-se uma maior anergia nesses pacientes a esse teste. Porém, 51,8% dos pacientes confirmados para TB foram reatores ao TT, com uma indução média de 15mm. Apenas 1 paciente com menos de 100 células T CD4/µl foi reator ao TT, apresentando indução de 6 mm. A maior frequência de TT reatores ocorreu nos indivíduos com contagem de T CD4+ >350 céls/µL.

Entre os pacientes com TT reator, 60% possuíam vacina BCG, confirmada através da cicatriz vacinal e 46,7% relataram história prévia de TB. Porém, nem sempre pode-se atribuir a reatividade ao TT à associação com a BCG (PANAYI *et al*., 2001; MARTINS *et al*., 2007), visto

que, a resposta imune desencadeada pela vacina é mais fraca e menos duradoura do que a gerada pela infeccção tuberculosa natural e pode ser suprimida por qualquer fator que altere o sistema imune do indivíduo, como é o caso dos pacientes portadores de HIV (SANTÍN *et al*., 2011).

Os casos confirmados de TB que foram negativos ao TT, 46,1% (12/26) podem ter ocorrido, devido a uma resposta anérgica ou diminuição do "*homing*" (quimiotaxia) de células T para o local da reação (JAFARI *et al*, 2008). Esse índice de anergia encontrado é similar ao relatado por Balcells e cols (2008), que encontraram 48% (12/25) ao avaliar o TT para diagnóstico de TB em pacientes HIV positivos.

Testes de amplificação de ácidos nucléicos (AAN) têm atraído um interesse considerável com o objetivo de contornar as limitações inerentes aos métodos bacteriológicos convencionais. (KAHLA *et al*., 2011). Sua contribuição para o diagnóstico rápido da TB tem sido amplamente estudada.

Para o bom desempenho da PCR, vários fatores devem ser levados em consideração, sobretudo a descontaminação das amostras e o método de extração de DNA. A desproporção entre a velocidade de crescimento das micobactérias e de outras bactérias torna necessária uma descontaminação das amostras clínicas contendo microbiota associada, que, quando presente, pode impedir a multiplicação dos bacilos levando a um resultado falso-negativo (THORTON *et al*., 1998). O uso de alguns agentes descontaminantes juntamente com agentes mucolíticos (utilizados para liquefazer os restos orgânicos e liberar os bacilos intracelulares do escarro) podem levar a uma perda de viabilidade do bacilo (KENT; KUBICA, 1985). Por isto, optou-se pela descontaminação com o método de Petroff, o qual utiliza hidróxido de sódio a 4%, um dos métodos mais empregados, por destruir grande parte de bactérias contaminantes, além de liquefazer o material, no caso das amostras de escarro. Na etapa de descontaminação, as manipulações da amostra podem causar erros, tais como: diluição inadequada, aspiração acidental do sedimento e contaminação cruzada (LEMAITRE *et al*., 2004; YAJKO *et al*., 1995).

Neste estudo, foi aplicado a Nested-PCR em único tubo para todas as amostras coletadas (plasma, leucócitos, urina, LCR e escarro) com o intuito de avaliar sua utilidade no diagnóstico de TB em área endêmica em pacientes imunodeprimidos. Os valores de sensibilidade e especificidade da STNPCR encontrados em nossa análise foram 64,3% e 91,4%, respectivamente, resultados que estão de acordo com estudos publicados. Torrea e cols. (2005) desenvolveram um estudo com pacientes HIV em um local de alta incidência de TB,

empregando PCR para o diagnóstico de TB. Nesse estudo, a urina foi utilizada como amostra biológica, sendo utilizada técnica de PCR em único tubo com o mesmo alvo genético (IS6110) usado em nossa pesquisa. A sensibilidade encontrada variou de 40,5-66,7%, dependendo do sítio de acometimento da TB, tendo demonstrado uma elevada especificidade (98,2%). Honore´-Bouakline e cols. (2003) avaliaram diferentes técnicas de PCR para o diagnóstico de TB em pacientes imunodeprimidos de uma região com alta prevalência da doença. Amostras pulmonares e extrapulmonares foram utilizadas. Os resultados encontrados foram uma sensibilidade variando de 16-53,8% e especificidade entre 78,8% a 96,5%, dependendo da metodologia de PCR empregada e amostra utilizada.

O baixo desempenho da PCR, encontrado neste estudo, pode ser explicado provavelmente pela utilização de amostras paucibacilares, visto que entre os 27 casos confirmados para TB, apenas em dois pacientes com a forma pulmonar da doença, foram obtidas amostras de escarro, espécime com maior probabilidade de se encontrar o bacilo. Deve-se também levar em consideração as limitações inerentes à técnica, que levam à inibição da amplificação tais como: não homogeneidade das alíquotas levando a distribuição desigual das micobactérias na amostra, presença de proteínas inibidoras ou, mais provavelmente, perda de DNA de *M. tuberculosis* durante as etapas de lavagem da extração (KAHLA *et al*, 2011; HALDAR *et al*., SUN *et al*., 2011; ALMEDA *et al*., 2000).

Porém a PCR quando combinada a outras técnicas, baciloscopia e TT, por exemplo, apresenta utilidade no sentido de auxiliar na confirmação diagnóstica, por se apresentar como um teste rápido e com bons valores de especificidade e VPP.

Ao analisar os índices de concordância entre os testes utilizados encontrou-se uma boa concordância absoluta entre o QFT-GIT e o TT, 87,8%, com um índíce kappa moderado, de 0,411. Tsiouris e cols (2006) também encontraram diferenças entre o valor absoluto (74,6%) e o índice kappa (κ = 0,118), assim como Luetkemeye e cols (2007), (85,2%, κ = 0,37). Pode-se explicar esse fato baseado no princípio imunológico dos testes, visto que não compartilham exatamente o mesmo fenômeno: os IGRA medem principalmente as respostas aos antígenos das células T efetoras (CFP-10, ESAT 6 e TB7.7), ao contrário do TT que mede as respostas tanto das células T efetotas quanto as das células T de memória (DHEDA *et al*., 2005).

Nos países industrializados, com baixa endemia para TB, a concordância entre o TT e o IGRA costuma ser elevada (94% de concordância na Dinamarca [κ = 0,87], 89% no Reino

Unido [κ = 0,72] e 85% nos Estados Unidos [κ = 0,60]) (EWER *et al*., 2003; BROCK *et al*., 2004; MANUEL *et al*, 2007). O mesmo não se pode dizer dos países em desenvolvimento, onde a endemicidade da doença é alta (LEIDL *et al*., 2010; KIM *et al*., 2010), fato confirmado em nossa pesquisa.

De acordo com a literatura existe um elevado número de resultados discordantes entre os testes imunodiagnósticos nos indivíduos HIV positivos, com concordâncias variando de baixa a moderada (RANGAKA *et al*., 2007; RICHELDI *et al*., 2009; TALATI *et al*., 2009; STEPHAN *et al*., 2008; MANDALAKAS *et al*., 2008; BARTALESI *et al*., 2009; FERRARA *et al*., 2006; MATULIS *et al*., 2008).

As concordâncias gerais entre STNPCR e TT e os testes QFT-GIT e STNPCR foram baixas (κ = 0,22 e κ = 0,16, respectivamente) (tabela 5); entre QFT-GIT e STNPCR não houve concordância. Quando se considerou as correlações destes testes nos indivíduos com TB confirmada, a concordância entre eles diminuiu, encontrando-se apenas uma razoável concordância entre os testes QFT-GIT e TT (κ = 0,36). Nossos resultados estão corroborando com Balcells e cols. (2007), Richeldi e cols. (2009) e Ferrara e cols. (2005) que encontraram concordância moderada entre QFT-GIT e TT em pacientes HIV, κ = 0,59, κ = 0,52, κ = 0,40, respectivamente.

Como a cultura é considerada o padrão ouro na maioria dos estudos de diagnóstico de TB, resolveu-se avaliar o seu resultado nos indivíduos da pesquisa. Observou-se um pequeno percentual (20%) de pacientes com TB confirmada por resposta ao tratamento que apresentou cultura bacteriana positiva nas amostras coletadas (urina, LCR ou escarro). Torrea e cols. (2005) só obtiveram crescimento em 6,1% das amostras de urina de pacientes HIV positivos e Mortier e cols. (1998) encontraram uma positividade ainda menor, 5,8% de crescimento do bacilo na urina. As baixas taxas de crescimento micobacteriano em urina pode ser devido a várias razões: nem todos os pacientes com tuberculose pulmonar pode ter micobactérias circulantes ou ter quantidade suficiente de bacilos para serem filtradas através da urina (GOW, 1992); falsos-negativos podem ter ocorrido devido à distribuição não homogênea das micobactérias na amostra (ZAMBARDI *et al*., 1995) e pelo fato da urina não ser um bom espécime biológico para cultivo, por conter muitos inibidores.

Várias diretrizes (Centros de Controle e Prevenção de Doenças nos EUA, Instituto Nacional de Saúde e Excelência Clínica (NICE) do Reino Unido, e as diretrizes da Suíça)

sugerem o uso do IGRA no rastreamento de infecção latente por *M. tuberculosis* e/ou para confirmar um teste tuberculínico positivo. Em indivíduos imunocompetentes, o valor preditivo negativo de IGRA para tuberculose ativa é muito alto, se combinado com um resultado negativo do teste tuberculínico, já nos indivíduos imunodeprimidos o valor preditivo negativo do IGRA ainda precisa ser mais bem estabelecido (MACK *et al*., 2008).

O valor diagnóstico de um determinado exame, na prática clínica, varia de forma significativa com a prevalência da doença em uma comunidade. Os resultados desses novos testes devem ser interpretados com cautela, levando-se sempre em consideração o estado epidemiológico da tuberculose na região estudada e as condições imunológicas individuais que podem interferir na resposta aos testes (LEE *et al*., 2006).

Conforme demonstrado ao longo deste trabalho, adicionado aos divergentes dados encontrados na literatura, os teste STNPCR e QFT, não devem ser utilizados na rotina diagnóstica de TB, em pacientes imunodeprimidos, sobretudo em países em desenvolvimento com alta prevalência da doença. Além da falha no desempenho do QFT GIT, deve ser levado em consideração também o alto custo, em média R$ 106,00 por paciente. O elevado custo e o baixo desempenho, fazem do QFT-GIT um teste sem aplicabilidade diagnóstica. Portanto, novos métodos diagnósticos são necessários para suprir a lacuna dos exames convencionais no diagnóstico de TB em pacientes imunodeprimidos.

Diante do exposto, podemos sugerir uma medida simples, à rotina clínica que envolve os pacientes imunodeprimidos: o uso do teste tuberculínico no rastreamennto de TB nesses pacientes, ao menos enquanto outros testes que apresentem melhores resultados sejam validados. Essa medida se torna extremamente importante quando o Ministério da Saúde (2010) preconiza que qualquer paciente com HIV deve ser submetido ao teste tuberculínico, ao menos 1 vez ao ano, fato que na prática não é observado.

7. CONCLUSÕES

- O QFT-GIT não demonstrou utilidade como teste de triagem para detectar TB em imunodeprimidos, em razão do baixo desempenho e elevado custo;
- A STNPCR não demonstrou ser um teste sensível para o diagnóstico de TB em indivíduos imunodeprimidos;
- Ao comparar os novos testes (STNPCR e QFT-GIT) com o TT não houve diferença estatisticamente significante que pudesse mostrar a superiodade dos mesmos;
- Devido a simplicidade técnica e ao baixo custo, o TT deverá continuar sendo utilizado como teste de triagem inicial para diagnóstico de TB em pacientes imunodeprimidos.
- A baixa contagem de linfócitos T CD4+ (<350 céls/μL) dos pacientes HIV positivo influenciou negativamente o resultado do QFT-GIT.

8. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AAYBE M. G. *et al*. The impact of HIV infection and CD4 cell count on the performance of an interferon gamma release assay in patients with pulmonary tuberculosis. PLoS ONE 4:e4220, 2009.

ABATH F. G. C., WERKHÄUSER R., MELO F. L. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. Biotechniques, Natick, 33(6): 1210-1214, 2002.

ACETI A. *et al*. Identification of HIV patients with active pulmonary tuberculosis using urine based polymerase chain reaction assay. Thorax 54: 145-146, 1999.

AICHELBURG M. C. *et al*. Detection and prediction of active tuberculosis disease by a whole-blood interferon-γ release assay in HIV-1-infected individuals. *Clin Infec Dis* 48, 954-962, 2009.

ALADREN M. J., VIVES P. J., CELORRIO J. M. Diagnosis and prevention of tuberculosis in hemodialysis patients. A new old problem? *Nefrologia* 24, 253-260, 2004.

ALBUQUERQUE M. F. *et al*. Radiographic features of pulmonary tuberculosis in patients infected by HIV: is there an objective indicator of co-infection? *Rev Soc Bras* Med Trop 34, 369-372, 2001.

ALMEDA J. *et al*. Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chai reaction for diagnosis os tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19: 859-867, 2000.

ALTARE F. *et al*. Interleukin-12 receptor beta 1 deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. J Infect Dis 184, 231-236, 2001.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med 161, S221-S247, 2000.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? American Thoracic Society Workshop. Am J Respir Crit Care Med 155: 1804-1814, 1997.

ANDERSEN P. *et al*. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 356: 1099-1104, 2000.

ASSIS N. C. S. *et al*. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. Bras Patol Med Lab, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2007.

BABA K. *et al*. BMC Infect Dis 8, 35, 2008.

BADRI M. *et al*. Association between tuberculosis and HIV disease progression in a high tuberculosis prevalence area. Int J Tuberc Lung Dis 5, 225-232, 2001.

BALCELLS M. E. *et al*. A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *International* Jounal of Infectious Diseases 12: 645-652, 2008.

BARBOSA T. C. Papel de mediadores solúveis na resposta imune em modelos de proteção contra *Mycobacterium tuberculosis*. 2002 136 f. Tese (Doutorado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2002.

BASIRI A. *et al*. The risk factors and laboratory diagnostics for post renal transplant tuberculosis: a case control, country-wide srudy on definitive case. Transplant Infect Dis 10, 231-235, 2008.

BENITO N. *et al*. Diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection in liver transplant recipients in an endemic area. Transplantation 74, 1381-1386, 2002.

BOMBARDA S. *et al*. Imagem tuberculose pulmonar. *J Pneumol* 27(6), 329-340, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão de Pneumologia Sanitária. *2º Informe técnico sobre vacinação, revacinação*

BCG. Brasília: Coordenação de Pneumologia Sanitária, Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, 1994. 56p.

BRASIL. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial de tuberculose e outras micobactérias. 2008.

BRASIL. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Boletim eletrônico epidemiológico. Ano 10, nº 11: dez. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_epi_n11_tb_dez2010_atual2.pdf> . Acesso em: 05 jul. 2011.

BRASIL. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Boletim epidemiológico. Volume 43: mar. 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bolepi_v43_especial_tb_correto.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2012.

BRASIL. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Programa Nacional de Controle da Tuberculose – Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_tb.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2012.

BRASIL. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Caderno 7 – Hanseníase, Paracoccidioidomicose, Tuberculose. In: _ _ _ _ _ _. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed. 2010.

BRASIL. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Departamento de doenças transmissíveis, Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Situação da Tuberculose no Brasil – Dia mundial de mobilização contra a tuberculose. 2012. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dia_mundial_tb_26_03_12.pdf>. Acesso em: 03 maio 2012.

BRITISH THORACIC SOCIETY STANDARDS OF CARE COMMITTEE. BTS recommendatiors for assessing risk and for managing *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease in patients due to start anti-TNF-alpha treatment. Thorax 60(10), 800-805, 2005.

BROCCOLO F. *et al*. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantification of *Mycobacterium tuberculosis* load by two Real-time calibrated PRC assays. J. Clin. Microbiol 41 (10), 4565-4572, 2003.

BROCK I. *et al*. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. Am J Respir Crit Care Med 170, 65-69, 2004.

BROCK I. *et al*. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-γ test. Respir Res 7, 56–64, 2006.

BROCK J. *et al*. Perfomance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Int J Tuberc Lung Dis 5(5), 462-467, 2001.

BRODIE D., SCHLUGER W. The diagnosis of tuberculosis. Clin. Chest Med. 26, 241-271, 2005.

CAMPOS H. S. Diagnóstico da tuberculose 15(2), 92-99, 2006.

CARDOSO F. L. L. *et al*. T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Antigen ESAT-6 in brazilian tuberculosis patients. American Society for Microbiology 70(12), 6707-6714, 2002.

CATTAMANCHI A. *et al*. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals: a systematic review and meta - analysis. J Acquir Immune Defic Syndr 56(3), 230-238, 2011.

CATTAMANCHI A. *et al*. Role of interferon-gamma release assays in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with advanced HIV infection. BMC Infect Dis 10:75, 2010.

CELLESTIS. QuantiFERON-TB gold. http://www.cellestis.com, 2010. Acessado em 02/08/2010.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis; recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, and Guidelines for using the QuantiFERON®-TB Gold test for detection *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. MMWR 2005; 54 (No. RR-15). Disponível em: http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5415.pdf. Acessado em 30/03/2011.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR* Morb Mortal Wkly Rep 49(26): 593-594, 2000.

CHADHA VK. Epidemiological situation of tuberculosis in India. J Indian Med Assoc 101: 144-147, 2003.

CHAPMAN A. L. *et al*. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T-cells. AIDS 16: 2285-2293, 2002.

CHO S. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. Yonsei Med J 48: 347-369, 2007.

CHOU K. J. *et al*. Tuberculosis in maintenance dialysys patients. Nephron 88: 138-143, 2001.

CHUNG J. H. *et al*. Clinical utility of QuantiFERON-TB GOLD In-Tube and tuberculin skin test in patients with tuberculous pleural effusions. Diag Microbiol Infect Dis 71: 263-266, 2011.

CHUNG W. K. *et al*. Serial testing of interferon-γ-release assays for the diagnosis of latent tuberculosis in haemodialysis patients. J Infect 61: 144-149, 2010.

CHUNG W. K. *et al*. Validity of interferon-gamma-release assays for the diagnosis of latent tuberculosis in haemodialysis patients. Clin Microbiol Infect 16, 960-965, 2010.

COLE S. T. *et al*. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 393:537-44, 1998.

CONDE M. B. *et al*. III Brazilian Thoracic Association and clinical management. *Lancet* Infect Dis 3(3): 148-155, 2003.

CONDE M. B., SOUZA G. M., KRITSKI A. L. Tuberculose sem medo. Editora Atheneu. 1ª ed. São Paulo, 2002.

CONVERSE P. J. *et al*. Comparison of a tuberculin interferon-gamma assay with the tuberculin skin test in high-risk adults: effect of human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis 176(1): 144-150, 1997.

CORBETT E.L. *et al*. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med 163: 1009-1021, 2003.

DANIEL T. M. The rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review. J Lab Clin Med 116: 277-282, 1990.

DEWAN P. K., GRINSDALE J., KAWAMURA L. M. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis. Clin Infect Dis 44, 69-73, 2007.

DHEDA K. *et al*. Perfomance of a t-cell based diagnostic test for tuberculosis infection in HIV-infected individuals is dependent of CD4 cell count. AIDS 19: 2038-2041 (2005).

DHEDA K. *et al*. Quantitative lung T cell responses aid the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. Thorax 64, 847-853, 2009.

DIAGNOSTIC STANDARDS AND CLASSIFICATION OF TUBERCULOSIS IN ADULTS AND CHILDREN. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. Am J Respir Crit Care Med 161: 1376-1395, 1999.

DIEL R. *et al*. Predictive value of whole blood IFN-γ assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 177, 1164-1170, 2008.

DIEL R. *et al*. Comparative performance of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB-Gold in tube assay, and T-SpotTB test in contact investigations for tuberculosis. Chest 135: 1010-1018, 2009.

DIEL R., LODDENKEMPER R., NIENHAUS A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. Chest 137: 952-968, 2010.

DIEL R., NIENHAUS A., LANGE C., SCHABERG T. Cost optimization of screening for latent tuberculosis in close contacts. Eur Respir J 28: 35-44, 2006.

DINNERS J. *et al*. A systematic review of rapid diagnostic tests for detection of tuberculosis infection. Health Technol Assess 11: 1-196, 2007.

III DIRETRIZES PARA TUBERCULOSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. J. Bras. Pneumol., São Paulo, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

DOWDY D. W., STEINGART K. R., PAI M. Serological testing versus other strategies for diagnosis of active tuberculosis in India: a cost-effectiveness analysis. Plos Medicine 8, 1-10, 2011.

DUNCAN L. E. *et al*. Tuberculin sensitivity and HIV-1 status of patients attending a sexually transmitted disease clinic in Lusaka, Zambia: a cross-sectional study. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 89: 37-40, 1995.

DUCATI, R. G. *et al*. The resumption of consumption: a review on tuberculosis**.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 101 (7): 697-714, 2006.

ELLIOTT A. M. *et al*. Negative sputum smears results in HIV-positive patients with pulmonary tuberculosis in Lusaka, Zambia. Tuber Lung Dis 74, 191-194, 1993.

ERKOC R. *et al*. Tuberculosis in dialysis patients, single centre experience from na endemic área. *Int J Clin Pract* 58, 1115-1117, 2004.

FEREBEE S. H. Controlled chemoprophylazis trials in tuberculosis: a general review. Adv Tuber Res 17: 29-106, 1969.

FERNÁNDEZ DE VEGA F. A *et al*. Micobactérias. In: Procedimientos em microbiologia clínica. 2ª. Ed, 2005.

FERRARA G. *et al*. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. A prospective study. Lancet 367, 1328-1334, 2006.

FERRARA G. *et al*. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-γ assay for the diagnosis of tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med 172: 631-635, 2005.

FLORES L. L. *et al*. In house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. BMC Microbiology 5: 55-63, 2005.

FLYNN J. L, CHAN J. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 19, 93-129, 2001.

FLYNN J. L., ERNST J. D. Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin Immunol* 12, 432-436, 2000.

FRIEDEN T. R. *et al*. Tuberculosis. The Lancet 362: 887-899, 2003.

FURIN J. J., JOHNSON J. L. Recente advances in the diagnosis and management of tuberculosis. Curr Op Pulm Med 11: 189-194, 2005.

GAO Y. *et al*. Improved diagnostic power by combined interferon-gamma release assay and nested-PCR in tuberculosis pleurisy in high tuberculosis prevalence area. FEMS Immunol Med Microbiol 66, 393-398, 2012.

GARG S. K. *et al*. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations and possibilities. J Clin Labor Anal 17, 155-163, 2003.

GAUCHON A. *et al*. Evaluation of a screening strategy after occurrence of two simultaneous contaminating tuberculosis cases in a pediatric oncology department. Arch Pediatr 15: 236-244, 2008.

GIRARDI E. *et al*. Tuberculosis in HIV-infected persons in the context of wide availability of highly active antiretroviral therapy. Eur Respir J 24: 11-17, 2004.

GONZALEZ-JUARRERO M. *et al*. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 69: 1722-1728, 2001.

GONZÁLEZ-MARTIN J. *et al*. Consensus documento n the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. Arch Bronconeumol 46(5): 255-274, 2010.

GOW J. G. Genitourinary tuberculosis. In: Walsh PC, Ed. Champbell's Urology.Philadelphia, PA: Saunders, 1992: pp 951-981.

GRIFFITHS G. *et al*. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. Nature Reviews Microbiology, 8: 827-834, 2010.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 7ª. edição. Ministério da Saúde. Brasília-DF, 2010.

GUIDA J. P. S. *et al*. Tuberculosis in renal transplant recipients: a brasilian Center registry. Trans Proceed 41: 883-884, 2009.

Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report [serial on the Internet], 2005.

GUIO H., VILAPLANA C., CARDONA P. J. Inmunodiagnóstico y biomarcadores en tuberculosis. Med Clin (Barc), 2010.

HARGREAVES N. J. "Smear-negative"pulmonary tuberculosis in a DOTS programme: poor outcomes in an area of high HIV seroprevalence. In J Tuber Lung Dis 5: 847-854 (2001).

HERRERA V. *et al*. Clinical application and limitations of interferon-γ release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection. *Clinical Infectious Diseases* 52(8): 1031-1037, 2011.

HICKSTEIN L. *et al.* Tuberculosis transmission in a Renal Dyalisis Center – Nevada, 2003. MMWR 53, 873-875, 2004.

HOFFMAN M. *et al*. AIDS 21: 390-392, 2007.

HORSBURGH C. R. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. N Engl J Med 350: 2060-2070, 2004.

HUGGETT J. F., MCHHUGH T. D., ZUMLA A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35: 1407-1412, 2003.

ISEMAN MD. A clinician's guide to tuberculosis. Philadelphia: Lippincott, Williams Wilkins, 2000.

JAMAL L. F., MOHERDAUI F. Tuberculose e infecção pelo HIV no Brasil: magnitude do problema e estratégias para o controle. Rev. Saúde Pública 41(1): 104-110, 2007.

JANEWAY JR. C. A, MEDZHITOV R. Innate imnune recognition. Annu Rev Immunol 13: 251-276, 2002.

JENSEN P. A. *et al*. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005. MMWR Recomm Rep 54: 1-141, 2005.

JOHN G. T. *et al*. Risk factors for post-transplant tuberculosis. Kidney Int 60: 1148-1153, 2001.

JOINT STATEMENT OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS) AND THE CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med 161, S221-S247, 2000.

KABEER B S. A. *et al* .Role of interferon gamma release assay in active TB diagnosis among HIV infected individuals. PLoS ONE 4:e5718, 2009.

KAFWABULULA M. *et al*. Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of tuberculosis by identification of mycobacterial DNA in urine samples. Int J Tuber Lung Dis 6: 732-737, 2002.

KAHLA I. B. *et al*. Evaluation of a simplified IS6110 PCR for the rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in an area with high tuberculosis incidence. Pathologie Biologie 59: 161-165, 2011.

KARYADI E. *et al*. A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: effects on clinical response and nutritional status. Am J Clin Nutr 75, 720-727, 2002.

KEANE J, REMOLD HG, KORNFELD H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. J Immunol 164: 2016-2020, 2000.

KIM S. H. *et al*. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis. Arch Intern Med 167: 2255-2259, 2007.

KIM S. H. *et al*. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis in immunocompromised patients. Am J Med 122: 189-195, 2009.

KIVIHYA-NDUGGA L. *et al*. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis and human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 42(3): 1012-1015, 2004.

KOBASHI Y. *et al*. Clinical evaluation of QuantiFERON TB-2G test for immunocompromised patients. Eur Respir J 30: 945-950, 2007.

KOBASHI Y. *et al*. False negative results of QuantiFERON TB-2G test in patients with active tuberculosis. Jpn J Infect Dis 62: 300-302, 2009.

KOPPAKA R, BOCK N. How reliable is chest radiography? In: Frieden T, editor. Toman's tuberculosis case detection, treatment, and monitoring: questions and answers. Geneva: *World Health Organization*, 51–60, 2004.

LALVANI A. Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control. Thorax 58(11): 916-918, 2003.

LALVANI A. *et al*. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am J Respir Crit Care Med 163: 824-828, 2001.

LALVANI A. *et al*. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Lancet 357: 2017-2021, 2001:

LALVANI A, PREEK M. Interferon gamma release assays: principles and practice. Enferm Infecc Microbiol Clin 28(4): 245-252, 2009.

LEE J. Y. *et al*. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. Eur Respir J 28: 24-30, 2006.

LEE S. W. Time interval to conversion of interferon-γ release assay after exposure to tuberculosis. Eur Respir J, 2010.

LIMA J. F. C. Detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue e urina por meio da *Nested*-PCR em único tubo. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

LIMA J. F. C. *et al*. Desempenho da técnica *nested* PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. *J Bras Pneumol*, São Paulo, vol. 35, p. 690-697, jul. 2009.

LIN PL, FLYNN J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. J Immunol 185: 15-22, 2010.

LIRA L. A. S. Avaliação do desempenho da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

LUETKEMEYER A. F. *et al*. Comparison of an Interferon-c Release Assay to Tuberculin Skin Testing in HIV-Infected Individuals. Am J Respir Crit Care Med; 200608-1088OC, 2007.

MACK U. *et al*. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune response to *Mycobacterium tubercu*losis. A TBNET consensus statement. Eur Respir J 33: 956-973, 2009.

MAGUIRE H. *et al*. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995 to 1997 showing low rate of active transmission. Thorax 57: 617-622, 2002.

MALIK G. H. M. *et al*. Eleven years of experience with dialysis associated tuberculosis. Clin Nephrol 58: 356-362, 2002.

MANUAL NACIONAL DE VIGILÂNCIA LABORATORIAL DA TUBERCULOSE E OUTRAS MICOBACTÉRIAS. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2008.

MARAIS B. J. M. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. Am J Respir Crit Care Med 173, 1078-1090, 2006.

MARQUES C. D. L. Avaliação do teste T-SPOT.TB no diagnostico da infecção tuberculosa latente em pacientes com artrite reumatóide. Tese de doutorado, 2008.

MAZUREK M. *et al*. Up-dated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection - United States, 210. MMWR Recomm Rep 59: 1-25, 2010.

MAZUREK M. *et al*. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis*, United States. MMWR Recommend Rep 54: 49-55, 2005.

MAZUREK G. H. *et al*. Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. JAMA 286(14): 1740-1747, 2001.

MENZIES D., PAI M., COMSTOCK G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. Ann Intern Med 146: 340-354, 2007.

MENZIES D., PAI M., COMSTOCK G. New tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: áreas of uncertainty and recommendations for research. Ann Intern Med 146, 340-354, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Manual TELELAB, 2001. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Brasília, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasil: Ministério da Saúde; 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Tratamento Diretamente Observado (TDO) da Tuberculose na Atenção Básica. Protocolo de Enfermagem. Brasil: Ministério da Saúde; 2011.

MIRANDA C. *et al*. Reducing the rates of indeterminate results of the QuantiFERON-TB GOLD InTube test during routine reemployment screening for latent tuberculosis infection among healthcare personnel. Infect Cont Hosp Ep 30: 194-197, 2009.

MOHAN V. P., *et al*. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in cgronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. Infect Imnun 69: 1847-1855, 2001.

MOORE D. A. *et al*. High rates of tuberculosis in end-stage renal failure: the impact of international migration. Emerg Infect Dis 8: 77-78, 2002.

MORI T. *et al*. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med 170: 59-64, 2004.

MORTIER E. *et al*. Assessment of urine analysis for the diagnosis of tuberculosis. Br Med J 312: 27-128, 1996.

MUNK M. E. *et al*. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 183(1): 175-176, 2003.

MUNOZ P, RODRIGUEZ C, BOUZA E. *Mycobacterium tuberculosis* infection in recipients of solid organ transplants. Clin Infect Dis 40: 581-587, 2005.

NACHEGA JB, CHAISSON RE. Tuberculosis drug resistance: a global threat. Clin Infec Dis 36: S24-S30, 2003.

NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS. TUBERCULOSIS: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. Clin Guidel 33: 1-215, 2006.

NICE: National Institute for Health and Clinical Excellence - Guideline n$^{o.}$ 33. Disponível em http://guidance.nice.org.uk/CG33/guidance/pdf/English. Acessado em 13/05/2011.

NOORDHOEK G. *et al*. Multicenter quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. Clin Microbiol Infect 10: 295-301, 2004.

NORTH R. J., JUNG Y. J. Immunity to tuberculosis. Annual Review of Immunology, Palo Alto 22: 599-623, 2004.

NOVAIS C. M. *et al.* PCR em tempo real**:** uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 33: 10-13, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Toman's Tuberculosis. Case detection, treatment, and monitoring*. Questions and answers. 2nd edition. Edited by T. Frieden. WHO/ HTM/TB2004.334. Genebra, Suíça. 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. WHO Report 2007. *Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing.* WHO/HTM/TB/2007.376.2007

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Tuberculosis Control: Epidemiology, strategy, financing. *WHO report* , 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Guidelines for Intensified Tuberculosis Cas-finding and Isoniazid Preventive Therapy for People living with HIV in resource-Constrained Settings. Genebra, Suíça, 2010. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241500708_eng.pdf. Acessado em 07 de fevereiro, 2013.

OTTENHOFF T. H. M. *et al*. Control of human host immunity to mycobacteria. Tuberculosis 8, 53-64, 2005.

PAI M. *et al*. Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: Comparison of a whole-blood interferon [gamma] assay with tuberculin skin testing. JAMA 293: 2746-2755, 2005.

PAI M., LEWINSOHN D. M. Interferon-γ assays for tuberculosis, is anergy the Achille's heel? Am J Respir Crit Care Med 172; 519-521, 2005.

PAI M, RILEY L. W., COLFORD J. M .Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. Lancet Infec Dis 4(12): 761-776, 2004.

PAI M., ZWERLING A., MENZIES D. Sistematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis in immunocompetent adults. Scand J Infec Dis 149: 177-184, 2008.

PANAYI G., CORRIGAL V., PITZALIS C. Pathogenesis of rheumatois arthritis. The role of cells and others beasts. Rheum Dis Clin North Am 161, 221-247, 2001.

PASSALENT L. *et al*.. Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a head-to-head comparison of the T-SPOT TB test, tuberculin skin test, and an expert physician panel. Clin J Am Soc Nephrol 2: 68-73, 2007.

PATHAN A. A. *et al*. 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, 5217-5225, 2001.

PATHAN A. A. *et al*. High frenquencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC classI-restricted *Mycobacterium tuberculosis* epitope in *M. tuberculosis*-infected subjects without disease. *Eur J Immunol* 30: 2713-2721, 2000.

PETRESCU L. *et al*. Tuberculin skin test, interferon-gamma assay, and T cells subpopulations in hemodialysis patients. Journal of Renal Nutrition 20(5S): S109-S117, 2010.

PIANA F. *et al*. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. Eur Respir J 28(1): 31-34, 2006.

PRATT A, NICHOLL K, KAY L. Use of the Quantiferon TB Gold test as part of a screening programme in patients with RA under consideration for treatment with anti-

TNF-alpha agents: The Newcastle (UK) experience. Reumathology (Oxford), 46: 1035-1036, 2007.

RABY E. *et al*. The effects of HIV on the sensitivity of a whole blood IFN-γ release assay in Zambian adults with active tuberculosis. PLoSONE 6:e2489, 2008.

RANGAKA M. X *et al*. Effect of HIV-1 infection on T-cell-based and skin test detection of tuberculosis infection. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 175: 514-520, 2007.

RATTAN A. PCR for diagnosis of tuberculosis: where are we now? Ind J Tub 47: 79-82, 2000.

RAVN P. *et al*. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 12: 491-496, 2005.

REBOLLO M. J. *et al*. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis 56: 141-146, 2006.

RICHELDI L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med 174: 736-742, 2006.

RICHELDI L. *et al*. Early diagnosis of subclinical multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 140, 709-713, 2004.

RICHELDI L. *et al*. T-cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 288-295 (2004).

RICHELDI L. *et al*. Perfomance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients. *Chest Jounal* 136, 198-204 (2009).

RIEDER H. L. *et al*. Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-Income Countries. Second edition. International Union Agaisnt Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Paris, France. 2007.

ROSE D. N. Benefits of screening for latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Arch Intern Med 160: 1513-1521, 2000.

ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS. Tuberculosis national clinical guidelines for diagnosis, management, prevention, and control. London: Royal College of Physicians, 2006. Acessado www.nice.org.uk.

RUEDA C. M. *et al*.. Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN-γ in human latent and active tuberculosis. *Tuberculosis* 90: 346-353, 2010.

RUIZ-MANZANO J. *et al*. Normativa SEPAR sobre diagnóstico y tratamiento de La tuberculosis. Arch Bronconeumol 44: 551-556, 2008.

SACEANU C. A, PFEIFFER N. C, MCLEAN T. Evaluation of sputum smear concentration by cytocentrifugation for detection of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol 31, 2371, 1993.

SALGAME P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. Curr Opin Immunol 17: 347-380, 2005.

SANTIN M. *et al*. Detection of latent tuberculosis by the tuberculin skin test and a whole-blood interferon-γ release assay, and the development of active tuberculosis in HIV-seropositive persons. Diagnostic Microbiol Infec Dis 69, 59-65, 2011.

SAO T. *et al*. Whole lung tuberculosis – a disease with high mortality which is frequently misdiagnosed. Chest 101: 1309-1311, 1992.

SARMIENTO O. L. *et al*. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 41(7): 3233-3240, 2003.

SAUZULLO I. *et al*. QuantiFERON-TB Gold and selected region of difference 1 peptide-based assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a cohort of patients enrolled with suspected tuberculosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 62: 395-401, 2008.

SCARPARO C. *et al*. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 38: 1559-1562, 2000.

SECHI L. A. *et al*. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis of urine and other clinical samples from AIDS and non-HIV-infected patients. Mol Cell Probes 11: 281-285, 1997.

SEDGWICK J. D. *et al*. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. Immunol Today 21: 110-113, 2000.

SERBINA N. V., FLYNN J. L. Early emergence of CD8+ T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. Infect Immun 67: 3980-3988, 1999.

SESTER M. *et al*. Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. Kidney Int 65: 1826-1834, 2004.

SHANKAR M. S. R. *et al*. The prevalence of tuberculin sensitivity and anergy in chronic renal failure in an endemic area: tuberculin test and the risk of post-transplant tuberculosis. Nephrol Dial Transplant 20: 2720-2724, 2005.

SHARP V. *et al*. Pulmonary tuberculosis with a normal admission chest X-ray: Incidence and clinical characteristics, Abstr. In: Programmes and abstracts of the Internacional Conference on AIDS 332p, 1993.

SHILOH U. M, DIGIUSEPPE C. P. A. To catch a killer. What cam mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis*? Current opinion in Microbiology* 13: 86-92, 2010.

SIELING P. A., MODLIN R. L. Toll-like receptors: mammalian "taste receptors"for a smorgasbord of microbial invaders. Curr Opin Microbiol 5: 70-75, 2002.

SINGH N., PATERSON D. L. *Mycobacterium tuberculosis* infection in solid-organ transplant recipients: Impact and implications for management. Clin Infect Dis 27: 1266-1277, 1998.

SILVA JR. J. B. Tuberculose: Guia de vigilância epidemiológica. J Bras Pneumol 30: S57-S85, 2004.

SIMON T. A. *et al.* Tuberculosis in hemodialysis patients in New Jersey: a statewide study. Infect Control Hosp Epidemiol 20: 607-609, 1999.

SMIRNOFF M. *et al*. Tuberculin and anergy skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. Chest 113: 25-27, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. 11 Consenso Brasileiro de Tuberculose. Diretrizes Brasileiras para tuberculose 2004. J Bras Pneumol 30(Supl1), S1-S55, 2004.

SOINI HM, MUSSER JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chemistry* 47(5), 809-814, 2001.

SONNENBERG P. *et al*. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. J Infect Dis 191, 150-158, 2005.

SOO P. C. *et al*. Direct and simultaneous identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) by rapid multiplex nested PCR-ICT assay. J Microbiol Methods 66: 440-448, 2006.

STEAD W. W. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection? *Am* Rev Respir Dis 95: 729-745, 1967

.

STEINGART K. R. *et al*. Fluorescence versus conventional smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet infect dis 6; 570-581, 2006.

SCHLUGER NW, ROM WN. The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 157: 679-691, 1998.

SUTHERLAND I. Recent studies in the epidemiology of tuberculosis, based on the risk of being infected with tubercle bacilli. Adv Tuber Res 19; 1-63, 1976.

TEIXEIRA HC, ABRAMO C, MUNK ME. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. J Bras Pneumol 33(3): 323-334, 2007.

TIWARI R. P. *et al*. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: Promises and challenges ahead. Tuberculosis 87: 193-201, 2007.

TORREA G. *et al*. PCR-based detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. J Med Microbiol 54: 39-44, 2005.

TRINCHIERI G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 3: 133-146, 2003.

TRIVERIO P. A. *et al*. Interferon-gamma release assays versus tuberculin skin testing for detection of latent tuberculosis in chronic haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 24: 1952-1956, 2009.

TSIOURIS S. J. *et al*. Sensitivity analysis and potencial uses os a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 44(8): 2844-2850.

TUFARIELLO, J. M., CHAN, J., FLYNN, J. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. Lancet Infect Dis 3: 578-590, 2003.

VAN PINXTEREN L. A. *et al*. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Clin Diagn Lab Immunol 7(2): 155-160, 2000.

VARKEY P. *et al*. The epidemiology of tuberculosis among primary refugee arrivals in Minnesota between 1997 and 2001. Travel Med 14: 1-8, 2007.

VELDSMAN C. *et al*. QuantiFERON-TB GOLD ELISA assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in blood specimens of HIV-positive patients in a high-burden country. FEMS Immunol Med Microbiol 57: 269-273, 2009.

VERMA A. *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* infection in pediatric liver transplant recipients. Pediatr Infect Dis J 19, 625-630, 2000.

VERRECK F. A. *et al*. IL-23 producing type-2 human macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 101: 4560-4565, 2004.

WHALEN CC. Diagnosis of latent tuberculosis infection. Measure for measure. JAMA 293: 2785-2787, 2005.

WHALEN C. *et al*. Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. AIDS 11: 455-460, 1997.

WOELTJE K. F. *et al*. Tuberculosis infection and anergy in hemodialysis patients. *Am* J Kidney Dis 31: 848-852, 1998.

WRIGHTON-SMITH P, ZELLWEGER JP. Direct costs of three models for the screening of latent tuberculosis infection. Eur Respir J 28: 499-501, 2006.

9. ANEXOS

9.1 Termo de Consentimento

PACIENTE:_____	IDADE:_____
HOSPITAL:_____	Prontuário: _____
ENDEREÇO DO PACIENTE:_____	Nº:____
BAIRRO:_____CIDADE:_____	ESTADO:_____

TERMO DE CONSENTIMENTO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa - "**ANÁLISE DO DESEMPENHO DE TESTES QUANTIFERON-TB GOLD E NESTED PCR EM ÚNICO TUBO PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM PACIENTES IMUNODEPRIMIDOS**.", após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de nenhuma forma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

Título do Projeto: Análise do desempenho dos testes QuantiFERON-TB Gold e Nested PCR em único tubo para o diagnóstico da tuberculose em pacientes imunodeprimidos.

Pesquisador (a) Responsável: Gabriela de Moraes Rego Guedes (e-mail: gabrielamrg31@uol.com.br)
Telefones para contato: (81) 2101-2569 ou 2126-7825
Pesquisadores Participantes: Dra. Haiana Charifer Schindler, Lílian Maria Lapa Montenegro, Juliana Figueirêdo da Costa Lima, Laís Ariane de Siqueira Lira, André Luiz Alves do Nascimento.
Comitê de ética em pesquisa (CEP): Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP:50670-901. Tel.: 2126-8588

Objetivos: O objetivo da nossa pesquisa é desenvolver um método molecular e imunológico para o diagnóstico de tuberculose pulmonar, extrapulmonar, latente e monitoramento terapêutico em pacientes imunodeprimidos.

Procedimentos do estudo: Quando o Sr(a) for atendido pelo médico(a) assistente do hospital, Sr(a) responderá a um questionário onde irão constar: nome, endereço, telefone para contato, característica do domicílio, escolaridade, queixas principais e tempo de duração, se está tomando algum remédio, exames físico, laboratoriais e tratamento atual. O preenchimento do questionário será feito por um dos integrantes da pesquisa. O Sr(a) será acompanhado por uma equipe multidisciplinar envolvendo os médicos responsáveis do serviço de saúde com experiência reconhecida no manejo da tuberculose, enfermeiras e técnicos que realizarão outros exames necessários e seguirão os procedimentos adequados e de rotina do hospital. O acompanhamento e tratamento serão feitos pelo médico assistente do serviço que é responsável por todos os leitos, cujos pacientes estão sendo investigados quanto à existência ou não de Tuberculose pulmonar. Caso for diagnosticada a doença será utilizado como terapia de primeira escolha o esquema com rifampicina, isonizida, pirazinamida e etambutol e se necessário, um esquema de segunda escolha será oferecido em casos selecionados. Todo o medicamento será fornecido pela rede SUS (fornecido pelo Hospital ou pelo Posto de Saúde).

Para a nossa pesquisa será realizado o teste tuberculínico (teste de Mantoux), que consiste na aplicação de 0,1 ml por via intradérmica no antebraço esquerdo, na dose de 0,1 ml, após 72 horas (3 dias) será realizada a leitura desse teste, também será coletado 7ml de sangue (menos de uma colher de sopa) e 50 ml de urina. As amostras de sangue e urina serão encaminhadas ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de Imunologia do CPqAM para serem analisadas por

profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão encaminhados ao médico responsável pelo atendimento. Todas as amostras (sangue e urina) serão congeladas e armazenadas a -20ºC, caso seja necessário a repetição do exame.

Riscos e Benefícios: O Sr (a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O abandono da pesquisa não trará prejuízo ao seu tratamento ou ao acompanhamento clínico. O benefício deste estudo será contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, específicas, rápidas e menos dolorosas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde, e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar o diagnóstico precoce da tuberculose.

Custo/Reembolso para o paciente: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. O (a) Sr(a) também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

Garantia de Sigilo: Os dados do (a) Sr. (a) serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa.

Caso seja necessário, o Sr (a) poderá entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa no endereço abaixo:

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia

Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.

Campus da UFPE.
Fone: (81) 2101-2569
Contato: Gabriela de Moraes Rego Guedes e André Luiz Alves do Nascimento.

&216(17,0 (172#

Eu, _____,
RG/CPF_____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionado ou constrangido concordo participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o nome do paciente.

Nome do Paciente: _____

_____ _____
Assinatura do paciente ou do responsável Assinatura do médico/pesquisador

_____ _____
Testemunha 1 Testemunha 2

9.2 Ficha Clínica

Ficha Clínica

IDENTIFICAÇÃO

1. Número da ficha na pesquisa

☐☐☐☐☐

2. Data da entre vista

_____/_____/_____

3. Procedência:

1. Ambulatório
2. Enfermaria

☐

4. Hospital de origem: ☐

1. Hospital das Clínicas
2. Hospital Otávio de Freitas
3. IMIP
4. Hospital Barão de Lucena
5. Outro: _____

DADOS DO PACIENTE

7. Nome Completo do Paciente

_____

9. Data de nascimento

_____/_____/_____

10. Idade do paciente

☐☐ anos ☐☐ meses

11. Sexo

1. Feminino
2. Masculino ☐

12. Endereço

_____
_____
_____
_____

Ponto de referência

_____
_____
_____

13. CEP

_____

14. Telefone Res. e Celular

(_____) _____ - _____

(_____) _____ - _____

15. Bairro

_____

16. Cidade

_____

17. UF

☐☐

18. Zona de localização da moradia

1. Urbana
2. Rural ☐

DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS

19. Grau de instrução do paciente

1. Analfabeto
2. Iniciou alfabetização
3. 1º grau
4. 2º grau
5. 3º grau
6. Outro

☐

20. Renda familiar mensal

1. Menor ou igual a 1 salário mínimo
2. De 2 a 4 salários mínimos
3. Mais que 5 salários mínimos
4. Biscate
8. Não sabe informar ☐

21. Quantas pessoas moram na casa do paciente?

1. Até 3
2. De 4 a 6 ☐
3. Mais de 6
8. Não sabe informar

22. Quantos adultos?

1. Até 2 ☐
2. De 3 a 5
3. Mais que 5

23. Quantas crianças?

1. Até 2
2. De 3 a 5 ☐

24. Quantos locais para dormir têm na casa?

1. Um
2. De 2 a 4 ☐
3. Mais de 4

25. O senhor(a) ou algum adulto na casa fuma?

1. Sim ☐
2. Não
8. Não sabe informar

26. O senhor(a) ou alguém na casa bebe?

1. Sim
2. Não ☐
8. Não sabe informar

3. Mais que 5	8. Não sabe informar		

27. Existe algum caso de HIV na família?	**28. Uso de drogas na família**	**29. Existe alguém da família ou do convívio que faz tratamento prolongado para TB?**	**30. Raça/Cor**
1. Sim 2. Não ☐ 8. Não sabe informar	1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar ☐	1. Sim_____ ☐ 2. Não 3. Sim -não sabe informar a doença 8. Não sabe informar	1. Branca 2. Preta 3. Parda ☐ 4. Amarela 5. Indígena

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

31. Sintomas:_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	**32. Fez PPD anterior?** 1. Sim 2. Não 8. Não sabe Data de realização: ____/____/_____ ☐	**33. Resultado de PPD anterior:** 1. Não reator (0-4mm) 2. Reator fraco (5-9mm) 3. Reator forte (10-14mm) 4. Reator muito forte (>15mm) 8. Não sabe informar 9. Inaplicável ☐
34. Fez PPD na Pesquisa? 1. Sim 2. Não 3. Não sabe ☐ Data de realização: ____/____/_____	**35. Resultado de PPD na pesquisa:** 1. Não reator (0-4mm) 2. Reator fraco (5-9mm) 3. Reator forte (10-14mm) 4. Reator muito forte (>15mm) 8. Não sabe informar 9. Inaplicável ☐	**36. Já fez TTO para tuberculose?** 1. Sim ☐ 2. Não Qual: _____ **Caso sim, quanto tempo?** _____ **Caso sim, número de TTO anteriores:** _____
37. Fez pesquisa de BK (Baciloscopia)? 1. Sim ☐ 2. Não **Caso sim, qual o resultado:** _____	**38. Fez cultura para micobacteria?** 3. Sim ☐ 4. Não **Caso sim, qual o resultado:** _____	

ANTECEDENTES DO PACIENTE

39. Já teve alguma doença?
1. Sim
2. Não
8. Não sabe informar

Caso a resposta seja Não, seguir para 41

40. Qual doença?
1. Asma
2. Pneumonia
3. Bronquite
4. Tuberculose
5. Diabetes
6. Fibrose Cística
7. HIV/AIDS
8. Câncer
9. Não sabe
10. Outro: _____

41. Tem cicatriz de BCG? (vista pelo entrevistador no braço direito ou através de cartão)
1. Sim
2. Não
8. Não verificado

42. Toma algum medicamento atualmente?
1. Sim
2. Não

Qual: _____

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (referidos pelo Informante)

43. Há quanto tempo o paciente está doente?

meses **dias**

44. Tem febre?
1. Sim
2. Não
8. Não sabe

Caso sim, há quanto tempo: _____

45. Perda de peso?
1. Sim
2. Não
8. Não sabe

46. Tem tosse?
1. Sim
2. Não
8. Não sabe

Caso sim, há quanto tempo: _____

47. Tem falta de apetite?
1. Sim
2. Não
8. Não sabe

48. Tem fraqueza muscular?
1. Sim
2. Não
8. Não sabe

49. Realizou Raio X de Tórax?
1. Sim
2. Não
3. Não sabe informar

Data:____/_____/_____

50. Resultado do Raio X de admissão:

1. Normal 2. Alterado

- Se alterado:

1. Padrão não sugestivo de TB
2. Forma Pneumônica
3. Forma Pneumoganglionar
4. Forma Pleuropulmonar
5. Forma Miliar
6. Forma Ganglionar
7. Inaplicável
8. Não sabe informar

OBSERVAÇÕES:_____
_____
_____

Responsável pelo preenchimento da ficha: _____
Telefone de contato do responsável pelo paciente (profissional de saúde):_____

9.3 Comitê de ética em pesquisa

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE
Telfax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/cep; e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. Nº. 086/2012 - CEP/CCS

Recife, 02 de fevereiro de 2012

A
Doutoranda Gabriela de Moraes Rego Guedes
Hospital das Clínicas – CCS/UFPE

Registro do SISNEP FR - 463695
CAAE – 0431.0.172.095-11
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 445/11
Título: Análise do desempenho de testes imunológico (QuantiFERON-TB Gold In tube) e molecular (PCR em tempo real) no diagnóstico da tuberculose latente em pacientes imunodeprimidos
Pesquisador Responsável: Gabriela de Moraes Rego Guedes

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início de coleta de dados em 01 de fevereiro 2012.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Coutto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

9.4 Relato de caso

Tuberculose osteoarticular em paciente com HIV: relato de caso

Osteoarticular tuberculosis in patient with HIV: case report

Gabriela de Moraes Rêgo Guedes[I], Juliana Figueirêdo da Costa Lima[II], Fabiana Cristina Fulco Santos[III], Marcela Pereira Salazar[IV], Lílian Maria Lapa Montenegro[V], Haiana Charifker Schindler[VI]

I- Biomédica, estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco

II- Biomédica, estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro

III- Bióloga. Mestre em Ciências da Saúde. Colaborador técnico do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –CPqAM/FIOCRUZ

IV- Biomédica.

V- Tecnologista Júnior do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –CPqAM/FIOCRUZ.

VI- Professora adjunta do Departamento Materno Infantil da Universidade Federal de Pernambuco.

Trabalho realizado no Laboratório de Epidemiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz.
Autor correspondente: Gabriela de Moraes Rêgo Guedes
Endereço para correspôndencia: Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária Recife/PE - Brasil | CEP: 50.670-420 - Telefones: 81 2101.2569 / 2126.7825 | E-mail: gabrielamrg31@uol.com.br
Fontes de Auxílio à pesquisa: CNPq e Facepe

RESUMO

Os autores relatam um caso de uma mulher de 38 anos de idade, portadora do HIV, com nódulos subcutâneos em região torácica com 3 meses de evolução. Foram avaliadas características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais associadas com imagens de dano aparente nas vértebras T11-T12 verificadas por exames de imagem, além da positividade do teste molecular baseado em PCR e reatividade ao teste de Mantoux, com diagnóstico de tuberculose osteoarticular. Paciente recebeu tratamento por um ano e atingiu a cura clínica.

ABSTRACT

The authors report a case of a woman of 38 years old, HIV-positive, with subcutaneous nodules in thoracic region with 3 months of evolution. We evaluated clinical, epidemiological and laboratory features associated with images of apparent damage to vertebrae T11-T12, in addition to the positivity of PCR-based molecular test and reactivity of the Mantoux test, with diagnostic of osteoarticular tuberculosis. Patient received treatment for one year and reached clinical cure.

Descritores: Tuberculose osteoarticular; Reação em cadeia da polimerase; osteomielite; Diagnóstico.

Keywords: Tuberculosis Osteoarticular; Polymerase Chain Reaction; Osteomyelitis; Diagnosis

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) permanece como uma das infecções mais devastadoras e amplamente difundidas no mundo. Em 2010, no Brasil, foram notificados 71 mil casos de TB, sendo a 1ª causa de morte dos pacientes com AIDS[1]. Em imunocompetentes, 15-20% de todos os casos de TB são extrapulmonar, enquanto que em indivíduos infectados pelo HIV corresponde a mais de 50%[2]. A forma óssea acomete 1-3% dos pacientes com diagnóstico de tuberculose extrapulmonar (TBEP), com acometimento da coluna vertebral em 50% dos casos[3].

O diagnóstico de TBEP, em particular, é difícil devido à natureza paucibacilar dos espécimes, à falta de volumes suficientes de amostras clínicas e à distribuição não uniforme de bactérias nestas amostras, assim como a localização da doença em locais de difícil acesso[4].

Ainda hoje, o diagnóstico da TB osteoarticular é feito predominantemente com base em aspectos clínicos e radiológicos. Novas técnicas baseadas na detecção de ácidos nucléicos tem sido desenvolvidas para diagnóstico da TB, principalmente das formas paucibacilares, como a PCR, que detecta sequências de nucleotídeos únicas para o *M. tuberculosis*, permitindo resultado em poucas horas (24-72h) e oferecendo melhor acurácia em relação aos métodos usuais de baciloscopia e cultura[5].

O objetivo dessa descrição foi relatar o caso de uma paciente portadora do HIV com o diagnóstico de tuberculose óssea e mostrar como novas técnicas diagnósticas podem ajudar no diagnóstico final da doença.

RELATO DO CASO

Paciente do sexo feminino, 38 anos, procedente de Vitória (PE), HIV positiva desde 1995, com história prévia de neurotoxoplasmose e TB (ganglionar e pleural) tratada por 1 ano e em uso regular de TARV (Azitromicina + Lamivudina + Efavirenz) desde 2009. Foi admitida no Hospital das Clínicas/PE em novembro de 2011 com história de nódulos subcutâneos na região esternal, há 3 meses, de aparecimento súbito, sem sinais ou sintomas associados. Realizou biópsia do nódulo, cujo resultado histopatológico revelou um processo inflamatório crônico granulomatoso com células gigantes tipo Langhans e corpo estranho; resultado negativo para BAAR e fungos e ausência de neoplasia. Após biópsia do nódulo, evidenciou-se orifício fistuloso com drenagem de secreção seropurulenta, sem cicatrização espontânea.

Realizou tomografia de tórax que, além de linfonodos, evidenciou lesão osteolítica em vértebras na transição tóraco-lombar. A Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de coluna torácica evidenciou lesões ósseas mal delimitadas de aspecto insulflante comprometendo o aspecto látero-direito dos corpos vertebrais torácicos (porção inferior de T11 e superior de T12), com leve hipossinal nas sequências ponderadas em T1 (Figura 1), sinal heterogêneo em T2 (Figura 2), com impregnação pelo meio de contraste endovenoso, delineando-se áreas centrais de necrose/liquefação. A Densitometria Óssea identificou focos de osteopenia em colo do fêmur e em L1-L4. A ultrassonografia da parede torácica apresentou imagem alongada, situada na linha média, abaixo do plano subcutâneo, estendendo-se anteriormente ao esterno e para região medial

da mama esquerda, medindo 8,5 x 2,5 x 0,7 cm, com volume de 7,7 mL apresentando trajeto fistuloso para a pele.

Foi realizada prova tuberculínica (Teste de Mantoux) com reação de 20 mm. A paciente não apresentava cicatriz vacinal BCG. A STN-PCR (*Single Tube Nested*-PCR) foi positiva para *M. tuberculosis* nas amostras de sangue e de urina, embora a cultura da mesma, em meio Lowenstein-Jensen, tenha se apresentado negativa. Também foi realizado o ensaio QuantiFERON–TB Gold *in Tube* que se revelou negativo. A contagem de células T CD4+ foi de 528 céls/μL. Após 2 meses de investigação clínica, diante dos resultados positivos ao Teste de Mantoux e da STN-PCR, foi confirmado o diagnóstico de osteomielite crônica por TB osteoarticular. Iniciou-se o esquema terapêutico COXCIP-4, com duração de 1 ano. A paciente evoluiu para a cura terapêutica ao fim do tratamento.

DISCUSSÃO

Os sinais e sintomas da TB osteoarticular são frequentemente não específicos e coincidem com várias doenças infecciosas e não infecciosas, tais como a artrite reumatóide, artrite séptica, osteomielite crônica e metástase óssea[6]. Pessoas com tuberculose extrapulmonar, muitas vezes, não tem os sintomas clássicos associados à doença pulmonar, como febre, tosse, perda de peso, anorexia e sudorese noturna. Além disso, não apresentam achados físicos associados à doença pulmonar[7]. Em uma série de casos, 31,5% dos pacientes com tuberculose óssea não tinham sintomas sistêmicos[6]. As características de tuberculose associadas à AIDS incluem a doença extrapulmonar, doença disseminada, rápida progressão, linfadenopatia visceral, abscessos de tecido e teste tuberculínico negativo[8]. A referida paciente, HIV positiva, também não apresentou sinais característicos de doença pulmonar tuberculosa, porém foi reagente ao Mantoux e apresentou orifício fistuloso após biópsia de nódulo subcutâneo.

Tuberculose osteoarticular normalmente começa como osteomielite nas placas de crescimento dos ossos, onde o fornecimento de sangue é melhor, e depois evolui localmente para os espaços comuns. Nas vértebras, o segmento mais frequentemente acometido pelo *M. tuberculosis* é a coluna torácica. A infecção inicia-se no aspecto ântero-inferior do corpo vertebral, com destruição do disco intervertebral e das vértebras adjacentes. Abscessos com extensões para a superfície ou tecidos adjacentes podem ser encontrados[8]. Os segmentos

acometidos na paciente do estudo foram as vértebras torácicas T11 e T12, visualizadas através de RNM. O diagnóstico da tuberculose osteoarticular é muitas vezes retardado, em média, de 12 a 19 meses, e pode demorar até 10 anos, provavelmente devido à apresentação insidiosa da doença e um baixo índice de suspeição para o diagnóstico[6]. Comparado à media de tempo para o diagnóstico de TB óssea encontrada na literatura, o diagnóstico dado em apenas 2 meses do caso em questão foi considerado rápido para um caso de TBEP. A equipe médica envolvida associou uma técnica padrão, o teste de Mantoux, considerado uma técnica "falha" em imunodeprimidos, a um ensaio inovador, a STNPCR que foi positiva nas amostras de urina e sangue.

RNM é o exame de imagem de escolha para a tuberculose vertebral, porque permite diferenciar entre tecido de granulação e abscesso, avaliar o grau de destruição óssea e identificar invasão de estruturas adjacentes, tais como a medula espinhal[8]. No entanto, anatomia e anormalidades ósseas, incluindo as calcificações macroscópicas e seqüestro, são melhor evidenciadas na tomografia computadorizada. Por isso a importância da associacão dos dois métodos de imagem para confirmação do diagnóstico.

Recomenda-se que TBEP seja diagnosticada bacteriologicamente, histopatologicamente ou pela avaliação clínica de especialistas. Mas na maioria dos casos, o diagnóstico é geralmente clínico e resposta terapêutica empírica é frequentemente utilizada para confirmar o diagnóstico[9]. A PCR é um método altamente eficiente e rápido para o diagnóstico da doença, tornando seu resultado de grande valor no diagnóstico precoce. Como PCR é uma técnica muito sensível que pode detectar 1-2 micobactérias na amostra, o tratamento pode ser iniciado com base neste resultado, se houver sinais clínicos da doença. Embora estes testes não possam substituir a baciloscopia, a cultura ou observações histopatológicas, podem contribuir significativamente para o diagnóstico precoce de TBEP e exercer um impacto aceitável sobre o manejo clínico da doença[10].

A paciente apresentou história prévia de tuberculose que pode ser o fator causador do novo diagnóstico. Algum foco granulomatoso remanescente que continha uma infecção latente pode ter reativado, por uma diminuição da imunidade, por exemplo. Assim como o caso relatado por nossa equipe, Kakarala e Rajan[11], também descreveram um relato sobre TB osteoarticular que acometia o tornozelo, onde o paciente apresentava história prévia de tuberculose.

Payne e Yang[12] relataram um caso de TB osteoarticular de um paciente de 40 anos de idade, desnutrido, que apresentava uma lesão ulcerativa com cerca de 3x4 cm na face póstero-

lateral do joelho direito que drenava continuamente uma secreção leitosa. Esse paciente realizou PPD apresentando uma indução de 21mm. Esse relato possui características comuns ao caso em questão: um orifício fistuloso que drenava secreção e um PPD reator. Um resultado positivo do teste de Mantoux pode ser útil na confirmação de uma suspeita de tuberculose, porém um resultado negativo não pode descartá-la.

Sabendo que a tuberculose pode afetar diversos órgãos além do pulmão, é fundamental avaliar o acometimento de sítios extrapulmonares[12]. Em primeiro lugar deve-se considerar tuberculose como uma possibilidade de diagnóstico, sobretudo quando o paciente possui alguma imunossupressão e advém de área endêmica, como o Brasil. Para estabelecer o diagnóstico da tuberculose óssea, é fundamental um alto índice de suspeição. Os médicos devem considerar a tuberculose óssea em pacientes com um curso clínico inconclusivo, apresentando osteomielite envolvendo a coluna torácica mesmo apresentando cultura bacteriana negativa. É importante destacar a utilização de outras ferramentas no diagnóstico de TB. No caso apresentado a técnica molecular de STNPCR foi superior à cultura, "padrão-ouro" utilizado para diagnóstico de TB, que apresentou negatividade de crescimento de bacilos na urina semeada. A técnica de amplificação também se demontrou mais sensível que a metodologia histopatológica, uma vez que não foram encontrados BAAR na amostra analisada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Dras. Fabiana Gonzaga e Renata Florêncio, do Serviço de Doenças Infecto-parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e ao Laboratório de Imunepidemiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (Brasil). Tratamento Diretamente Observado (TDO) da Tuberculose na Atenção Básica. Protocolo de Enfermagem. Brasil: Ministério da Saúde; 2011.

2. Cortez MV, Oliveira CM, Monte RL, Araújo JR, Braga BB, Reis DZ, *et al*. HIV associated tuberculous lymphadenitis: the importance of polymerase chain reaction

(PCR) as a complementary tool for the diagnosis of tuberculosis – a study of 104 patients. An Bras Dermatol 2011; 86: 925–931.

3. Sun YS, Lou SQ, Wen JM, Lv WX, Jiao CG, Yang SM, *et al*. Clinical value of polymerase chain reaction in the diagnosis of joint tuberculosis by detecting the DNA of *Mycobacterium tuberculosis*. Orthop Surg 2011; 3: 64–71.

4. Galimi R. Extrapulmonary tuberculosis: tuberculous meningitis new developments. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011; 15: 365–386.

5. Haldar S, Bose M, Chakrabarti P, et al. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis – the Indian experience. Tuberculosis 2011; 91: 414–426.

6. Watts HG, Lifeso RM. Tuberculosis of bones and joints. *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78(2):288-98.

7. Canadian Thoracic Society. *Canadian tuberculosis standards*. 5th ed. Ottawa: Health Canada; 2000. p. 4. Cat no H49-146/2000E.

8. Golden MP & Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. Am Fam Physician 2005; 72: 1761–1768.

9. Ali R, Jalil A, Qureshi A. Extra spinal osteoarticular tuberculosis: a case series of 66 patients from a tertiary care hospital in Karachi. J Pak Med Assoc 2012; 62 (12): 1344-1348.

10. Mehta PK., Raj A, Singh N & Khuller GK. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. FEMS Immunol Med Microbiol 2012; 66: 20-36.

11. Kakarala G, Rajan D. *Acta Orthop. Belg.* 2005; 71: 626-627

12. Payne K, Yang J. Osteoarticular tuberculosis: a case report and discussion. JAMC 2002; 166(5): 628-630.

FIGURAS

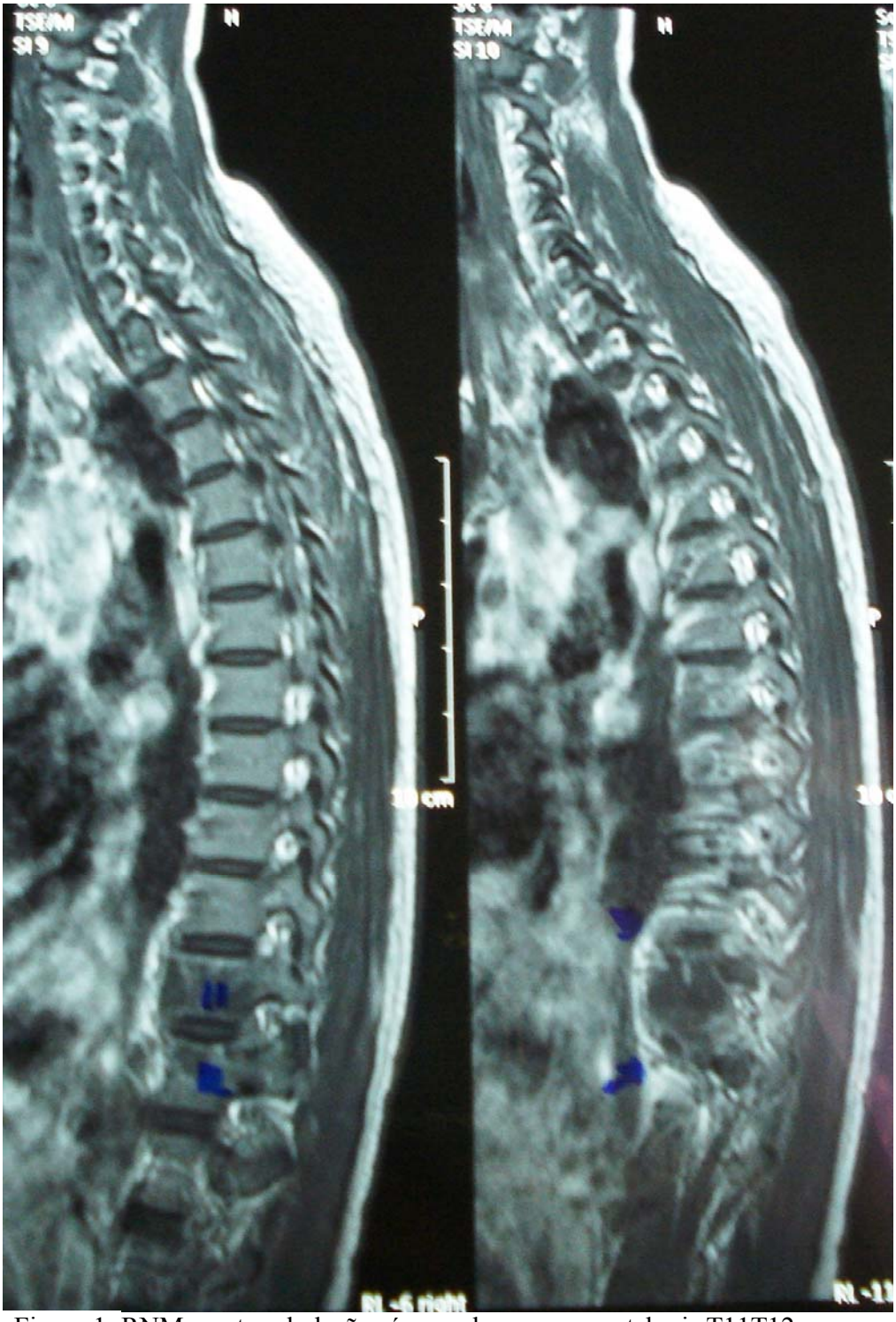


Figura 1: RNM mostrando lesões ósseas dos corpos vertebrais T11T12.

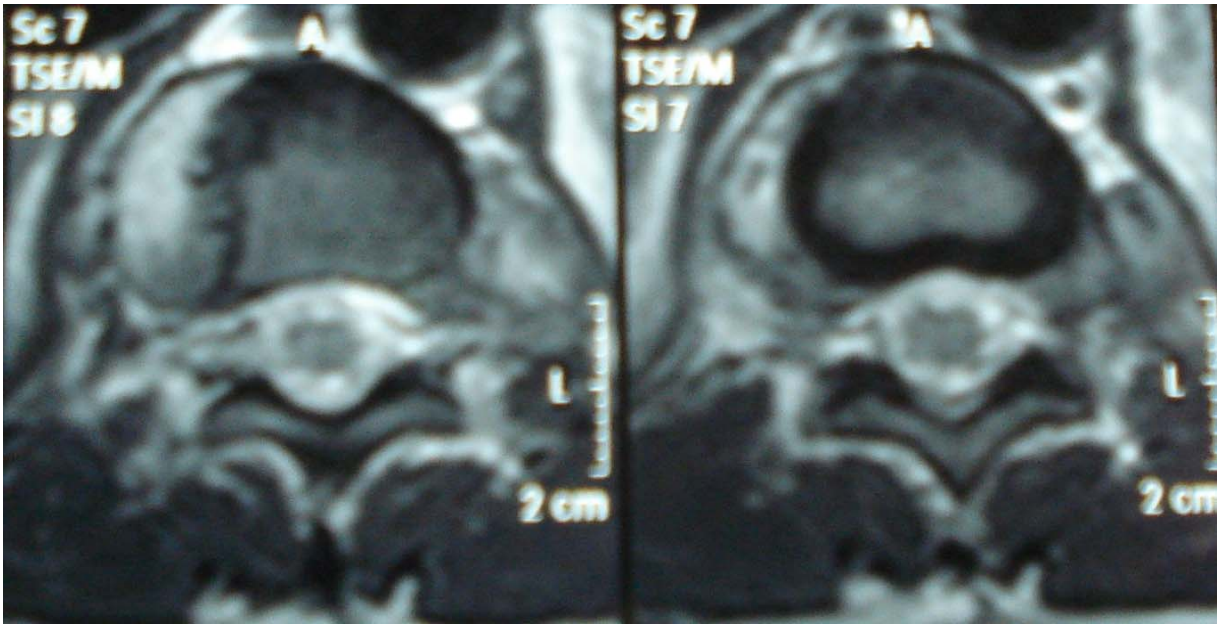


Figura 2: RNM evidenciando áreas de necrose/liquefação.