



**Carina Manuela Pinto
Ferreira**

**Estudo da aplicabilidade de testes serológicos no
diagnóstico de Tuberculose em Portugal: o caso
particular da Tuberculose latente**



**Carina Manuela Pinto
Ferreira**

Estudo da aplicabilidade de testes serológicos no diagnóstico de Tuberculose em Portugal: o caso particular da Tuberculose latente

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Prof^a. Doutora Margarida Correia-Neves, professora auxiliar da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho; e co-orientação do Professor Doutor António Correia, professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
professora auxiliar do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

orientador

Prof.^a Doutora Margarida Correia-Neves
professora auxiliar da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho

co-orientador

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

Mestre Raquel de Almeida Ferreira Duarte Bessa de Melo
médica pneumologista no Hospital Distrital de Vila Nova de Gaia e no Centro de Diagnóstico
Pneumológico de Vila Nova de Gaia

agradecimentos

Os meus agradecimentos são dirigidos em primeiro lugar e de maneira muito especial à Margarida, minha orientadora, pela proposta do tema de investigação e confiança em mim depositada para a sua concretização, pela amizade e entusiasmo sempre presentes e pelo seu espírito crítico que contribuíram significativamente para a qualidade deste trabalho.

Também gostaria de agradecer:

- À Andrea Afonso, amiga e colega, pela ajuda e disponibilidade constantes durante este trabalho. Obrigado pelo entusiasmo sempre presente que muita força me deu.
- A todos os investigadores do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde pela ajuda constante, em especial à Cláudia Nóbrega pela amizade e partilha de conhecimentos.
- À Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho, por disponibilizarem os meios materiais e humanos, sem os quais esta investigação não seria possível.
- À Andreia Costa e ao Nuno pela disponibilidade demonstrada durante este trabalho.
- A todos os participantes voluntários neste trabalho, sem eles não era possível a sua realização.
- À Dra. Raquel Duarte, médica do Centro Pneumológico de Vila Nova de Gaia, pelo empenho para que este trabalho fosse possível.
- À Dra. Aurora Carvalho pelo contributo essencial para a continuação do banco de amostras.
- A todos os enfermeiros do Centro Pneumológico de Vila Nova de Gaia pela execução e envio das amostras.
- Ao Dr. Ricardo, pela colheita das amostras de tecidos humanos no Instituto de Medicina Legal do Porto. Obrigado pela colaboração.
- À Matilde, amiga e colega, pela amizade sempre presente e incentivo nos momentos mais difíceis.
- Aos meus queridos pais e irmã, pelo estímulo e apoio incondicional sempre demonstrados, pelo inestimável apoio familiar que preencheu as diversas falhas que fui tendo. Obrigado do fundo do coração.
- Ao Rui, meu marido, pela paciência e compreensão reveladas ao longo deste trabalho. Pelo apoio nos momentos mais difíceis e pela sua constante boa disposição que tanto me ajudou a concretizar este trabalho.
- Por último, à luz da minha vida, o meu filho João Pedro, pelo sorriso sempre que chegava a casa, dando-me ânimo para continuar.

palavras-chave

Tuberculose, Tuberculose latente, serodiagnóstico.

resumo

A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de um terço da população mundial (2 biliões de pessoas) esteja infectada com *Mycobacterium tuberculosis*, na sua maioria com Tuberculose (TB) latente, representando um importante reservatório de reactivação da doença. Calcula-se que cerca de 10% das pessoas com TB latente desenvolve TB activa a um dado momento da vida, sendo que na maioria das situações acontece nos dois anos após a infecção. Torna-se portanto imperativo identificar as pessoas infectadas com TB latente, sendo este um passo muito importante para o controlo global da doença.

Há mais de cem anos que o teste cutâneo da tuberculina é utilizado para o diagnóstico da TB latente e activa. Este teste explora a indução da resposta imunitária celular medindo a hipersensibilidade retardada à inoculação intradérmica de *purified protein derivate* (PPD). A combinação dos resultados do exame clínico, radiológico e bacteriológico com o teste PPD permitem em grande número de casos o diagnóstico diferencial entre TB activa ou latente. Infelizmente, este teste pode originar resultados falsos positivos uma vez que a PPD não é específica do *M. tuberculosis* sendo os principais componentes destas proteínas partilhados por micobactérias ambientais e outras estirpes do complexo *M. tuberculosis*, podendo dar origem a reacções cruzadas em pessoas vacinadas com BCG e/ou expostas a micobactérias ambientais. Ocorrem também resultados falsos negativos, principalmente em indivíduos infectados com VIH ou com outro tipo de doença que diminua a eficácia do sistema imunitário. É ainda de salientar que em pessoas curadas de TB no passado mantêm-se frequentemente positivas para o teste PPD. Assim, apesar da sua grande utilidade este teste tem fortes limitações tanto no diagnóstico de TB como na distinção entre TB activa ou latente.

Existem dois testes comerciais que se baseiam na pesquisa de produção de INF- γ por linfócitos T: QTF-TB-Gold® e o T-SPOT-TB® que têm sido estudados para a sua aplicação no diagnóstico da TB latente, e pelo menos teoricamente, podem superar algumas limitações do teste cutâneo da tuberculina. Mas estes novos métodos carecem de condições laborais específicas (nem sempre possíveis nos centros de diagnóstico de TB em Portugal), são mais dispendiosos e exigem formação adequada dos técnicos responsáveis pelo diagnóstico para a realização da metodologia.

Torna-se assim fundamental melhorar o diagnóstico da TB latente e sendo o serodiagnóstico um método simples e rápido de efectuar e interpretar, é urgente avaliar o comportamento da resposta imunitária humoral na infecção latente, de forma a avaliar a utilidade destes testes no diagnóstico da TB latente. Os nossos resultados indicam que embora estes testes possam ser úteis, quando combinados com outras técnicas, na detecção da TB activa, não se adequam à detecção de indivíduos com TB latente.

keywords

Tuberculosis, latent tuberculosis, serodiagnostic

abstract

The World Health Organization estimates that one third of the world's population (2 billion of people) is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. The great majority of infected patients have latent Tuberculosis (TB), which represents an enormous reservoir of the disease. About 10% of the latent TB patients are estimated to develop active TB in their lifetime, the great majority within the first two years after infection. The ability to clearly identify infected individuals with latent TB represents a very important goal on the global TB control strategy.

The tuberculin skin test (TST) evaluates the delayed hypersensitivity response to purified protein derivate (PPD), a set of antigens from *M. tuberculosis*. The combination of the results of the clinical, radiological and bacteriological examination with the TST allows, to a certain extent, to distinguish between active and latent TB. Unfortunately, a major limitation of the TST is the fact that PPD is a crude mixture of several antigens, many of which are shared among *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG and several non-tuberculous mycobacteria. As a result, a positive TST result might be due to a true infection with *M. tuberculosis*, prior vaccination, or due to exposure to non-tuberculous mycobacteria. Negative results may also occur in *M. tuberculosis* individuals, mainly if co-infected with HIV or another type of immune-suppressive disease. Moreover, a certain proportion of individuals with past and cured TB, are still TST positive. Therefore, though it's great utility, this test has important limitations as a tool to diagnose clearly active or latent TB.

There are two commercial tests, for the diagnosis of TB, based on the observation that T cells of individuals sensitized with *M. tuberculosis*, release interferon- γ (INF- γ) upon *in vitro* stimulation with mycobacterial antigens: QFT-TB-Gold® and the T-SPOT-TB®. The applicability of these tests has been evaluated for the diagnosis of the latent TB. Although promising in their potential applicability to identify latent TB patients, these methods require specific laboratory infrastructure (not always possible in TB diagnosis centres in Portugal), are expensive and required trained personnel to perform them.

It is still at present essential to improve the diagnosis of the latent TB. As tests based on the detection of specific antibodies are frequently of simple and fast execution, we decided to evaluate the applicability of two serodiagnosis test to detect patients with latent TB. Our results indicate that although these tests may be useful, combined with the results of other techniques, to detect patients with active TB, they are not useful to identify latent TB patients.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	A Tuberculose em Portugal e no Mundo	15
1.2	Características gerais das bactérias do género Mycobacterium	18
1.3	Resposta imunitária à infecção por micobactérias.....	19
1.4	TB pulmonar e extrapulmonar.....	20
1.5	Diagnóstico de TB	21
1.5.1	O TCT no diagnóstico da Tuberculose.....	21
1.5.2	Exame directo microscópico	23
1.5.3	Exame cultural.....	24
1.5.4	Métodos de identificação de micobactérias.....	27
1.6	Novos métodos de diagnóstico de TB baseados na resposta imunitária.....	30
1.6.1	Testes de diagnóstico baseados na pesquisa da resposta celular.....	31
1.6.2	Testes de diagnóstico baseados na pesquisa da resposta humoral	35
1.7	Diagnóstico de TB latente	40
2.	OBJECTIVOS DO ESTUDO.....	44
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	Constituição de um conjunto de soros de pacientes com diagnóstico de TB latente	45
3.2	Constituição de um conjunto de soros de pacientes com patologia pulmonar mas sem TB.....	47
3.3	Continuação da constituição do banco de soros de indivíduos com TB activa e controlos	47
3.4	Métodos de serodiagnóstico utilizados	48

3.4.1	Teste TB STAT PAK II	48
3.4.2	MAPIA.....	49
3.5	Detecção de bactérias do complexo M. tuberculosis em tecidos humanos: timo, pulmão e baço	50
4.	RESULTADOS	55
4.1	Constituição do banco de amostras	55
4.1.1	Caracterização da amostra de indivíduos com TB	56
4.1.2	Caracterização do grupo de indivíduos com TB latente	57
4.2	Resultados do TB STAT PAK II e MAPIA	59
4.2.1	Especificidade dos testes de serodiagnóstico.....	59
4.2.2	Sensibilidade dos métodos de serodiagnóstico em indivíduos com TB e sem infecção VIH	61
4.2.3	Sensibilidade dos métodos de serodiagnóstico em indivíduos com co-infecção TB-VIH.	61
4.2.4	Sensibilidade do método TB STAT PAK II ao longo do tratamento.....	62
4.2.5	Sensibilidade do método TB STAT PAK II em indivíduos com TB latente.....	63
4.3	Detecção de bactérias do complexo M. tuberculosis em tecidos humanos: timo, pulmão e baço	64
5.	DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	69
5.1	Continuação da constituição do banco de soros de indivíduos com TB activa e controlos	69
5.2	Avaliação de dois testes de serodiagnóstico na TB latente	72
5.3	Pesquisa de micobactérias nos tecidos humanos	75
6.	CONCLUSÃO	79
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de incidência de casos novos de TB no continente e regiões autónomas. Evolução na década de 1997-2006	17
Figura 2. Esquema representativo da resposta imunitária à infeção por micobactérias.....	20
Figura 3. Representação esquemática do nested PCR	29
Figura 4. Teste imunocromático	39
Figura 5. Representação esquemática do TCT, T-SPOT-TB e QuantiFERON-TB para o diagnóstico de TB latente.	42
Figura 6. Esquema representativo teste TB STAT PAK II.....	48
Figura 7. Esquema representativo da técnica MAPIA.....	49
Figura 8. Esquema de cores das tiras do método MAPIA para um conjunto aleatório de 15 soros testados.....	50
Figura 9. Distribuição do sexo na população de indivíduos com TB.....	56
Figura 10. Distribuição da idade na população de indivíduos com TB.....	56
Figura 11. Distribuição do sexo na amostra de indivíduos com TB latente.	58
Figura 12. Distribuição da idade na amostra de indivíduos com TB latente.....	58
Figura 13. Especificidade dos métodos TB STAT PAK II e MAPIA.....	59
Figura 14. Especificidade do método TB STAT PAK II no grupo de indivíduos com patologia pulmonar (sem TB).....	60
Figura 15. Especificidade do método TB STAT PAK II no grupo de indivíduos saudáveis e com patologia pulmonar (sem TB).....	60
Figura 16. Sensibilidade do teste TB STAT PAK II e MAPIA em indivíduos sem infeção VIH e sem tratamento ou que iniciaram à menos de 15 dias (T0)...	61
Figura 17. Sensibilidade do teste TB STAT PAK II e MAPIA em indivíduos com co-infeção VIH e sem tratamento ou que iniciaram à menos de 15 dias (T0)...	62
Figura 18. Sensibilidade do teste TB STAT PAK II em diferentes fases de tratamento.....	63
Figura 19. Resultados do TB STAT PAK II e MAPIA na amostra de indivíduos com TB latente.....	63

Figura 20. Distribuição do sexo na amostra de cadáveres	64
Figura 21. Distribuição da idade na amostra de cadáveres	65
Figura 22. Causa de morte na amostra de cadáveres	65
Figura 23. Exemplo de um gel do PCR 18s rRNA em DNA de tecidos humanos..	66
Figura 24. Exemplo de um gel do PCR IS6110 em DNA de tecidos humanos.....	66
Figura 25. Cortes histológicos corados pela coloração de Ziehl Neelsen	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Limitações do teste cutâneo da tuberculina.	23
Tabela 2. Meios de cultura mais usados para o crescimento de micobactérias. ..	26
Tabela 3. Comparação entre o teste cutâneo da tuberculina e testes baseados na detecção de INF-•.	33
Tabela 4. Sensibilidade e especificidade do TCT e testes de detecção de INF-• na TB activa.	34
Tabela 5. Sensibilidade e especificidade de antigénios utilizados em métodos de serodiagnóstico de TB.....	36
Tabela 6. Testes comerciais de serodiagnóstico para detecção de anticorpos na TB.....	40
Tabela 7. Sequências dos primers para o nested PCR da sequência IS6110.....	52
Tabela 8. Sequências dos primers para o PCR do gene 18s rRNA.....	52
Tabela 9. Banco de amostras de soros.....	55
Tabela 10. Amostras de indivíduos com TB segundo as diferentes fases de tratamento anti-bacilar.	57
Tabela 11. Banco de amostras de tecidos humanos.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacille Calmette-Guérin
CFP	Culture Filtrate Protein
CDP	Centro de Diagnóstico Pneumológico
DGS	Direcção Geral da Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked Immunospot assay
ESAT	Early Secretory Antigenic Target
ECS	Escola de Ciências da Saúde
FDA	Food and Drug Administration
IBMC	Instituto de Biologia Molecular e Celular
ICVS	Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde
IL	Interleucina
INF	Interferão
INML	Instituto Nacional de Medicina Legal
KDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomano
MAPIA	Multiantigen Print Immunoassay
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
NTM	Non-tuberculous mycobacteria
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNLT	Plano Nacional de Luta Contra a Tuberculose
PPD	Purified Protein Derivate
RNA	Ácido Ribonucleico
TAAN	Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos
TB	Tuberculose
TCT	Teste Cutâneo da Tuberculina
TNF	Factor de Necrose Tumoral

VIH Vírus da Imunodeficiência Humana

VNG Vila Nova de Gaia

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Tuberculose em Portugal e no Mundo

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, que sendo curável, na maioria das situações através do tratamento adequado, é uma das doenças que maior número de mortes causa no mundo anualmente (Dye et al., 2006). A TB resulta, na maioria dos casos, da infecção por bactérias da espécie *Mycobacterium tuberculosis* a partir da inalação de aerossóis contaminados. Em algumas situações a TB pode resultar da infecção por *Mycobacterium bovis*, decorrente essencialmente da ingestão de produtos de origem animal contaminados (Cosivi et al., 1998). A forma mais comum de TB é pulmonar, contudo a infecção pode também afectar uma grande variedade de tecidos tal como o sistema digestivo, a pele, o trato genito-urinário, os ossos e o sistema nervoso central (Pina, 2000; American Thoracic Society, 2000; WHO, 2005). Na maioria das situações em que o hospedeiro entra em contacto com *M. tuberculosis* a resposta imunitária do organismo é suficiente para evitar a doença, podendo ocorrer destruição total das bactérias ou estabelecimento de um estado de latência. Neste caso os indivíduos mantêm-se infectados, apresentam na maioria dos casos um Teste Cutâneo da Tuberculina (TCT) positivo mas não apresentam sinais clínicos e microbiologicamente os exames para pesquisa de micobactérias são negativos (Stead et al., 1983). Ocasionalmente, a resposta imunitária não é eficaz, resultando em TB activa, decorrente de uma primeira infecção ou da reactivação de um estado de latência (Flynn et al., 2001).

Estima-se que cerca de um terço da população mundial (2 biliões de pessoas) esteja infectada com *M. tuberculosis*, na sua maioria com TB latente, representando um importante reservatório de reactivação da doença (Dye et al., 2006). Calcula-se que cerca de 10% das pessoas com TB latente virá a desenvolver TB activa, sendo que na maioria das situações a forma activa da

doença se desenvolve nos dois anos após a infecção (WHO, 2007). Torna-se portanto imperativo identificar as pessoas infectadas com TB latente, sendo este um passo muito importante para o controlo global da doença. A prevalência da TB latente é alta em países onde a TB é endémica, embora existam algumas discrepâncias. Um estudo sugere 80% de prevalência de TB latente na Índia (Lalvani et al., 2001a), enquanto que outro refere 56% de prevalência desta doença na África do Sul (Mahomed et al., 2006). O rastreio de contactos, de forma a diagnosticar a TB latente em países com elevada incidência de TB não é uma prioridade, mas em países de baixa incidência, o estudo de contactos é recomendado como sendo um ponto chave para os programas de controlo da TB (CDC, 2005).

Em 2006, a Organização Mundial de Saúde (OMS) indicou que se registaram cerca de 9,2 milhões de novos casos da doença no Mundo, incluindo 4,1 milhões de casos com exame directo positivo (44%) e 0,7 milhões de casos de co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (8%) (WHO, 2008). Este número de novos casos devem-se essencialmente ao aumento da prevalência da infecção por VIH, embora outros factores sejam também de enorme relevância, como o crescimento global da população associado a fracos índices sócio-económicos, a toxicoddependência e os surtos de TB multirresistente (Reid et al., 2006).

Em Portugal, durante o ano de 2006, foram notificados 3.092 novos casos de TB, o que corresponde a uma taxa de notificação de 29 novos casos por 100.000 habitantes (Direcção Geral da Saúde, 2007). A distribuição geográfica é bastante heterogénea, destacando-se pela maior incidência, os distritos do Porto (45 novos casos por 100.000 habitantes), Lisboa (39 novos casos por 100.000 habitantes), Viana do Castelo (34 novos casos por 100.000 habitantes) e Setúbal (33 novos casos por 100.000 habitantes) (Direcção Geral da Saúde, 2007). Entre as razões para a elevada incidência de TB em Portugal encontram-se: o elevado número de indivíduos infectados com VIH (representam cerca de 13% do número total de casos), a imigração de países com elevada prevalência de TB (11% dos casos), a

existência de um considerável número de indivíduos que vive em condições socio-económicas desfavoráveis e o aumento de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos anti-bacilares (1,7% do total, entre casos novos e recidivas) (Direcção Geral da Saúde, 2007, Hannan et al., 2001).

Entre os países da União Europeia, Portugal permanece numa situação intermédia entre a dos países com muito baixa incidência (menos de 10 novos casos por 100.000 habitantes por ano): Chipre, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Grécia, Irlanda, Itália Malta, Holanda e Suécia; e a dos países com alta incidência (igual ou superior a 50 novos casos por 100.000 habitantes por ano): Letónia e Lituânia (Direcção Geral da Saúde, 2005). Tem-se registado uma diminuição gradual da incidência de TB em Portugal nos últimos anos (em 2006 registaram-se menos 6% de novos casos em relação ao ano de 2004 e menos de 31% de novos casos nos últimos 10 anos) (Figura 1). Esta redução da prevalência de TB está muito provavelmente associada à melhoria do desempenho do Plano Nacional de Luta Contra a Tuberculose (PNLT). É de salientar que simultaneamente se observa uma evidente redução da prevalência da resistência aos antibióticos específicos, de 17,7% observado num estudo realizado pela DGS/OMS entre 1994-1997, para 11,9% em 2003 (Direcção Geral da Saúde, 2005).

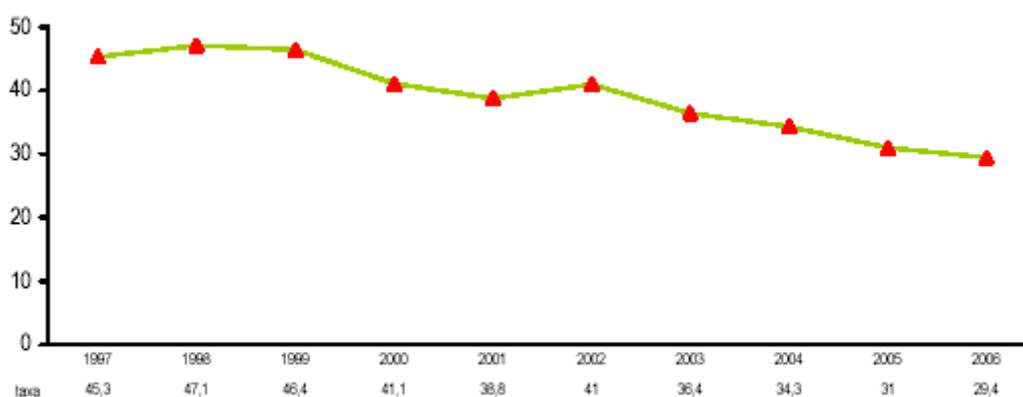


Figura 1. Taxa de incidência de casos novos de TB no Continente e Regiões Autónomas. Evolução na década de 1997-2006 (Retirado de: Direcção Geral da Saúde, 2007).

1.2 Características gerais das bactérias do género *Mycobacterium*

No género *Mycobacterium* são reconhecidas cerca de 71 espécies. Estas estão associadas a um largo espectro de infecções quer no Homem quer nos animais, podendo causar apenas uma lesão bem localizada ou infecção disseminada pelo organismo. As micobactérias que mais frequentemente causam doença no Homem são as responsáveis pela TB (*M. tuberculosis* e *M. bovis*), as micobactérias que causam a lepra (*Mycobacterium leprae*), o agente responsável pela úlcera do Buruli (*Mycobacterium ulcerans*) e ainda a espécie *Mycobacterium avium*, responsável por infecções disseminadas, essencialmente em indivíduos imunodeprimidos. As espécies bacterianas *M. tuberculosis* e *M. bovis* fazem parte do complexo *M. tuberculosis* que inclui ainda as espécies *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium africanum*. Existem ainda outras micobactérias capazes de provocar doenças semelhantes à TB, em humanos e animais, sendo estas denominadas por “micobactérias atípicas” ou non-tuberculous mycobacteria (NTM). As micobactérias não associadas a doença são consideradas ambientais. (Forbes et al., 2002)

As bactérias do complexo *M. tuberculosis* são caracterizadas por serem bactérias aeróbias, em forma de bastonete, imóveis e não formadoras de esporos. São de crescimento lento, necessitando de cerca de 3-4 semanas para se obter uma cultura positiva em meios apropriados (Li et al., 2000). A virulência e patogenezidade das micobactérias estão associadas essencialmente aos lípidos que constituem a parede celular, nomeadamente ácidos micólicos e ceras. As características da parede celular destas bactérias são ainda responsáveis pela coloração de Ziehl Neelsen. Esta coloração baseia-se na característica única da parede das micobactérias de resistir à descoloração com soluções álcool-ácidas e mesmo alcalinas (Ulrichs et al., 2005). Devido também à natureza hidrofóbica da superfície celular, as micobactérias tendem a ser mais resistentes a agentes químicos (corantes, antibióticos e desinfetantes) do que a maioria das outras bactérias (Forbes et al., 2002).

1.3 Resposta imunitária à infecção por micobactérias

A capacidade de um indivíduo infectado destruir as bactérias depende essencialmente da virulência da estirpe de *M. tuberculosis* e da resposta imunitária desencadeada. Como já foi referido, quando um indivíduo entra em contacto com a bactéria *M. tuberculosis* podem ocorrer as seguintes situações: eliminação das micobactérias pelo sistema imunitário; progressão para doença activa (TB doença com sintomatologia característica e com resultados bacteriológicos positivos) ou estabelecimento de um estado de latência (sem sintomatologia, resultados bacteriológicos negativos e TCT positivo) (Flynn et al., 2001).

Sendo o aparelho respiratório a principal porta de entrada do *M. tuberculosis* no organismo, bacilos presentes em aerossóis contaminados são essencialmente capturados por macrófagos alveolares mas também por células dendríticas locais (Kaufmann, 2001). Na fase precoce da infecção estas células são incapazes de eliminar os bacilos, necessitando da ajuda de outras células para conter a infecção, essencialmente linfócitos T CD4⁺. Os macrófagos infectados segregam citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-12 (IL-12) e o factor de necrose tumoral (TNF), assim como quimiocinas que são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos T para o local da infecção (Kaufmann, 2001; Raja, 2004, Yew & Leung, 2006). Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ reconhecem antígenos específicos de *M. tuberculosis* apresentados pelas moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) das células infectadas. Linfócitos T activados, especialmente os CD4⁺ produzem Interferon- γ (IFN- γ) uma citocina essencial para a activação de mecanismos de combate aos patógenos intracelulares nos macrófagos infectados. A importância das células T CD4⁺ torna-se mais evidente em indivíduos com SIDA, já que a TB é uma das doenças mais frequente em indivíduos com um número baixo de linfócitos T CD4⁺. Outra citocina fundamental neste processo é o TNF, o qual é produzido essencialmente por macrófagos infectados (Manabe et al., 2000) (Figura 2).

Trabalhos de investigação indicam que os anticorpos produzidos durante uma infecção por micobactérias não apresentam uma função importante no combate à infecção, no entanto, qualquer indivíduo infectado produz anticorpos específicos contra o agente causal (Raja, 2004).

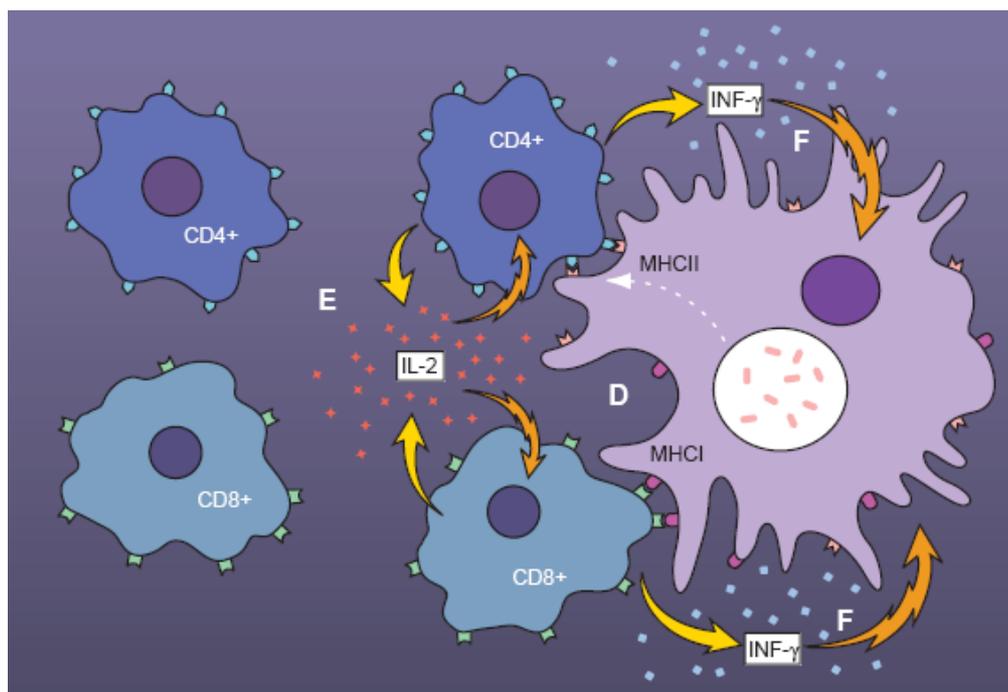


Figura 2. Esquema representativo da resposta imunitária à infecção por micobactérias (Retirado de: Long & Gardam , 2003).

1.4 TB pulmonar e extrapulmonar

A TB pulmonar é a forma mais frequente da doença constituindo cerca de 74% dos casos registados em Portugal, sendo que, em mais de metade, os bacilos ácido-álcool resistentes são detectados por exame directo na expectoração (Direcção Geral da Saúde 2007).

A OMS considera como TB extrapulmonar todas as formas de TB que se localizam fora do pulmão, sendo os principais órgãos infectados: pleura, nódulos linfáticos, abdómen, trato genito-urinário, pele, articulações, ossos, sistema nervoso central

e meninges. Segundo a OMS, qualquer indivíduo em que seja diagnosticada TB extrapulmonar e pulmonar deve ser considerado como TB pulmonar (WHO, 2005).

Na TB extrapulmonar, a presença de bacilos álcool-ácido resistentes é normalmente escassa e os locais onde estão presentes são por vezes de acesso difícil ou mesmo inacessíveis. O diagnóstico definitivo de TB extrapulmonar é assim complicado pois além de ter de se recorrer frequentemente a técnicas invasivas, as amostras são na maioria dos casos paucibacilares. A associação deste tipo de TB com indivíduos infectados com VIH é grande, presumivelmente devido à falência da resposta imunitária que sendo incapaz de conter a infecção, facilita a disseminação dos bacilos para outros locais fora do pulmão (American Thoracic Society, 2000).

1.5 Diagnóstico de TB

As manifestações clínicas da TB são, por um lado pouco específicas desta doença e, por outro lado, muito variáveis, dependendo de vários factores relacionados com o hospedeiro, destacando-se a idade, competência do sistema imunitário e coexistência de outras infecções, tornando-se da maior importância o apoio laboratorial no diagnóstico definitivo desta doença. Assim o diagnóstico de TB é efectuado com base em dados clínicos, radiológicos, epidemiológicos, da resposta do hospedeiro ao TCT e em dados laboratoriais (WHO, 2005; Palomino et al., 2007).

1.5.1 O TCT no diagnóstico da Tuberculose

O TCT é usado para identificar doentes com TB e avaliar a prevalência da infecção na comunidade. Este teste baseia-se na indução de uma resposta de hipersensibilidade retardada após administração intradérmica de PPD (purified protein derivate) que consiste numa mistura de antígenos de *M. tuberculosis*. Esta

resposta ocorre apenas em indivíduos com sensibilização prévia a esta bactéria. Neste caso, linfócitos T de memória específicos para o *M. tuberculosis*, desencadeiam uma resposta de hipersensibilidade retardada aos antígenos presentes na PPD resultando na formação de um edema e induração no local da administração da PPD. O diâmetro desta induração é medido após 48-72 horas e interpretado, existindo para tal critérios próprios dependendo da população em estudo (tem de se ter em conta se o indivíduo é ou não vacinado, se é imunodeficiente e se tem história prévia de TB) (Forbes et al., 2002; Palomino et al., 2007; Huebner et al., 1993; Andersen et al., 2000).

Em Portugal, as reacções ao TCT de indivíduos com diâmetro superior a 10 mm (ou superior a 5 mm em certas situações) devem ser considerados como positivas e deverão estes ser avaliados radiologicamente e observados pelo médico. No entanto, é importante ter em conta que este método apresenta algumas limitações (Tabela 1), uma vez que uma reacção positiva não indica necessariamente a presença da doença. O TCT pode originar resultados falsos positivos uma vez que a PPD não é específica do *M. tuberculosis* sendo os principais componentes destas proteínas partilhados por micobactérias ambientais e outras estirpes do complexo *M. tuberculosis*, podendo dar origem a reacções cruzadas em pessoas vacinadas com BCG e/ ou expostas a micobactérias ambientais (Huebner et al., 1993, Andersen et al., 2000). Esta característica é responsável pela baixa especificidade do teste, especialmente em populações vacinadas com BCG e/ou expostas a micobactérias ambientais. Ocorrem também resultados falsos negativos, associados à anergia das células T principalmente em indivíduos infectados com VIH/SIDA ou com outro tipo de doença que diminua a eficácia do sistema imunitário (Huebner et al., 1993).

Tabela 1. Limitações do teste cutâneo da tuberculina.

Causas para resultados falsos negativos	Causas para resultados falsos positivos
Má execução da técnica	Vacinação pelo BCG
Défice imunitário por idade avançada, terapêutica imunossupressora (corticosteróides e citostáticos) e infecção por VIH	Infecção por micobactérias não tuberculosas (menos de 5% de todas as reacções superiores a 10 mm)
Desnutrição, sobretudo se associada a uma perda de peso recente	Pessoas vacinadas com BCG e/ou expostas a micobactérias ambientais
Presença de uma infecção vírica ou vacinação com vírus vivo (vacina da papeira ou rubéola) há menos de um mês	

Retirado de: Duarte et al., 2007

1.5.2 Exame directo microscópico

O exame directo permite a detecção dos bacilos álcool-ácido resistentes através da observação microscópica após coloração apropriada. Este exame é o primeiro a ser realizado pois pode evidenciar rapidamente a presença das micobactérias nas amostras clínicas. Uma vez que estas bactérias apresentam um crescimento lento, o resultado da cultura demora várias semanas. O exame directo, pelo contrário é um teste rápido e de fácil execução, permitindo também, ainda que de forma grosseira, estimar a infecciosidade do doente pela avaliação da quantidade de bacilos que estão a ser excretados pelo hospedeiro. As colorações mais frequentemente utilizadas são a coloração de Ziehl Neelsen e a coloração fluorescente Auramina/Rodamina (Forbes et al., 2002; American Thoracic Society, 2000; Palomino et al., 2007).

Até ao final dos anos 80, o diagnóstico microbiológico de TB era realizado somente com base no exame directo microscópico (coloração de Ziehl Neelsen ou Auramina/Rodamina) e na cultura (Johansen et al., 2004). Contudo, apesar de ser uma técnica de execução rápida e de baixo custo, apresenta algumas

desvantagens, tais como, não ser específica para micobactérias já que bactérias do género *Nocardia* e parasitas como *Schistosoma* spp e *Cryptosporidium* spp também coram com esta técnica (Henriksen et al., 1981 e Muller et al., 1972); apresentar baixa sensibilidade, não detectando micobactérias em amostras paucibacilares (número de bacilos inferior a 10^4), como é frequente nos indivíduos infectados com VIH e TB extrapulmonar; e não distingue as espécies dentro das micobactérias (Ulrichs et al., 2005; Therese et al., 2005; Johansen et al., 2004; Li Jackson et al., 2000; Chakravorty et al., 2005; Amand et al., 2005).

1.5.3 Exame cultural

A contribuição do laboratório de microbiologia no diagnóstico de TB envolve a detecção e isolamento das micobactérias, identificação da espécie ou complexo (por métodos bioquímicos e/ou moleculares) e a determinação da susceptibilidade a antibióticos anti-bacilares. (American Thoracic Society, 2000; WHO, 2005). O exame cultural apresenta sensibilidade superior à do exame directo, sendo apenas necessários 10 a 100 bacilos para obter uma cultura positiva (Ulrichs et al., 2005; Therese et al., 2005; WHO, 1998). A principal desvantagem é o facto de ser muito mais demorado do que o exame directo (de 2 a 8 semanas dependendo da amostra e do tipo de meio de cultura) (American Thoracic Society, 2000; WHO, 1998; Forbes et al., 2002; Palomino et al., 2007).

O exame cultural é o único exame que até à data permite o diagnóstico definitivo da TB (gold standard test). Todas as amostras com suspeita de possuírem micobactérias devem ser inoculadas em meios de cultura pois a cultura apresenta uma sensibilidade superior à do exame directo e permite, a partir do material obtido, a identificação das espécies e respectivas susceptibilidades aos antibióticos anti-bacilares (American Thoracic Society, 2000; Palomino et al., 2007).

As amostras colhidas assepticamente de locais considerados estéreis podem ser inoculadas directamente nos meios de cultura, no entanto, a maioria das amostras biológicas enviadas ao laboratório para pesquisa de micobactérias encontra-se contaminada com flora bacteriana comensal. Dado que o crescimento dessa flora, em meios de cultura, é muito mais rápido do que as micobactérias, a sua presença impediria o crescimento das micobactérias. Além do mais dificultaria a detecção de bacilos ácido-álcool resistentes nas amostras através do exame microscópico directo (coloração de Ziehl Neelsen ou Auramina/Rodamina), e iria inviabilizar a obtenção de culturas puras de micobactérias para posterior identificação e antibiograma. Para evitar todas estas interferências procede-se, numa primeira fase, à descontaminação das amostras para eliminar a flora comensal. Para o seu sucesso, o processo de descontaminação deverá estar associado a uma técnica de fluidificação das amostras, para uma melhor actuação do descontaminante (WHO, 1998, Forbes et al., 2002).

Existem essencialmente dois métodos de descontaminação das amostras. O método N-acetyl-L-cysteína hidróxido de sódio é o método mais usado, onde a enzima actua como fluidificante da amostra e o hidróxido de sódio como agente descontaminante. Estes agentes químicos são tóxicos quer para os microrganismos contaminantes quer para as micobactérias, e embora estas sejam mais resistentes, é muito importante respeitar todas as indicações do processo de descontaminação no que se refere ao tempo de exposição a esses agentes e à percentagem da solução descontaminante de forma a não eliminar também as micobactérias. O outro método comumente usado é do ácido oxálico, que está recomendado para amostras clínicas que estejam contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* (amostras de urina e pulmonares de indivíduos com fibrose quística) (American Thoracic Society, 2000; CDC, 1997).

Existem dois tipos de meios de cultura para o diagnóstico de TB, os meios sólidos e líquidos (Tabela 2).

Tabela 2. Meios de cultura mais usados para o crescimento de micobactérias.

Tipo de Meio de cultura	Composição	Tempo de incubação	
Sólido	<u>Lowenstein-Jensen</u>	Meio à base de ovo, com glicerol que favorece o crescimento de <i>M. tuberculosis</i> . O inibidor presente é o verde de malaquite. As colónias apresentam-se rugosas e com aparência de "couve-flor".	Até 8 semanas a 37°C (geralmente cultura positiva após 3-4 semanas de incubação)
	<u>Middlebrook</u> 7H10 e 7H11	Meio à base de agar, com albumina, glicerol e ácido oleico, essenciais ao metabolismo <i>M. tuberculosis</i> . O inibidor presente é o verde de malaquite.	Até 8 semanas a 37°C (geralmente cultura positiva após 2-4 semanas de incubação)
Líquido	<u>BACTEC 460 TB</u> (Becton Dickinson Diagnostic systems)	Método semi-automático que contém meio líquido Middlebrook 7H12 com ácido palmítico marcado com C ¹⁴ . Se houver crescimento o ácido palmítico é consumido e há produção de CO ₂ marcado que é transformado num sinal detectado pelo equipamento.	Até 42 dias a 37°C (em culturas positivas é necessário confirmar a presença de micobactérias pelo exame microscópico directo)
	<u>MGIT</u> (Mycobacteria Growth Indicator Tube - Becton Dickinson Diagnostic systems)	Método semi-automático que contém meio líquido Middlebrook 7H9 com um composto fluorescente embebido num sensor de silicone no fundo do tubo. Quando o oxigénio dissolvido no meio é consumido há emissão de fluorescência que é detectada pelo equipamento.	

Retirado de: American Thoracic Society, 2000; WHO Report, 1998; Forbes et al., 2002; Palomino et al., 2007.

Os meios sólidos são os mais utilizados devido à possibilidade de se observar as colónias características das micobactérias e porque permitem um bom crescimento a partir de pouco inóculo (Palomino et al., 2007). Associado a estes dois factores, também pesa o facto de serem mais baratos e não necessitarem de equipamento próprio. Os meios líquidos permitem uma detecção mais rápida das micobactérias (1-3 semanas) comparando com os meios sólidos (3-8 semanas) mas apresentam a desvantagem de, para além de não ser possível observar as colónias características, ter a necessidade de equipamento próprio dispendioso (American Thoracic Society, 2000).

1.5.4 Métodos de identificação de micobactérias

A identificação das espécies de micobactérias é baseada em características como crescimento lento, morfologia das colónias, testes bioquímicos e moleculares, sendo de enorme importância fazer a distinção entre bactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* das restantes micobactérias, uma vez que a patogénecidade e tratamento são diferentes.

Os testes bioquímicos são muito importantes na distinção das espécies do complexo *M. tuberculosis*, uma vez que permitem detectar características fenotípicas específicas das diferentes espécies deste complexo, nomeadamente: actividade respiratória (teste catalase), presença da enzima nitrato redutase, acumulação de niacina, susceptibilidade à pirazinamida, cicloserina e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (Palomino et al., 2007; Soini et al., 2001). Contudo, estes testes são muito demorados sendo necessário pelo menos dois meses para obter um resultado definitivo e por vezes existe a dificuldade da correcta identificação da espécie devido a alterações da própria bactéria (mutações que levam por exemplo à perda de virulência e/ou aumento da resistência a determinados princípios activos) (Parsons et al., 2002).

Os testes que se baseiam na amplificação dos ácidos nucleicos [Polymerase Chain Reaction (PCR)], são testes que permitem a amplificação de uma sequência determinada de ácidos nucleicos que é detectada em poucas horas usando primers específicos, sendo uma ferramenta importante no diagnóstico precoce de TB (American Thoracic Society, 2000). Estes testes moleculares usados em laboratório de diagnóstico podem ser testes comercializados ou “caseiros”. Como tal, nos testes “caseiros” as sequências de DNA a amplificar são específicas de vários genes dependendo do utilizador, tais como as que codificam para as proteínas 65 KDa e 38 KDa, para o RNA ribossomal e ainda os elementos IS6110 e o MPB64. A sequência de inserção IS6110 é um elemento genético muito repetitivo nas estirpes bacterianas do complexo *M. tuberculosis* estando aparentemente ausentes nas outras espécies de micobactérias, sendo por isso amplamente usada (Li et al., 2000; Palomino et al., 2007; Zink et al., 2007). De forma a aumentar a sensibilidade do PCR foram desenvolvidas técnicas de nested PCR. Nesta técnica há uma amplificação de uma região de DNA seguida de nova amplificação utilizando primers internos ao fragmento obtido no primeiro PCR. Deste modo aumenta-se a sensibilidade e também a especificidade do PCR (Figura 3).

Nos últimos anos têm surgido vários testes comerciais de amplificação de DNA para pesquisa das micobactérias quer directamente da amostra biológica (detecção rápida das micobactérias), quer da cultura para identificação da espécie (American Thoracic Society, 2000; Soini et al., 2001; Palomino et al., 2007; Ling et al., 2008). Estes testes incluem: GenProbe Amplified *M. tuberculosis* Direct (AMTD), Roche Amplicor MTB, Cobas Amplicor e o BD-ProbeTec-ET (SDA). Recentemente um novo teste surgiu no mercado (Loop-mediated Isothermal Amplification - LAMP), mas a sua utilização ainda não está muito estudada. Estes testes foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) mas só para amostras do aparelho respiratório (Ling et al., 2008).

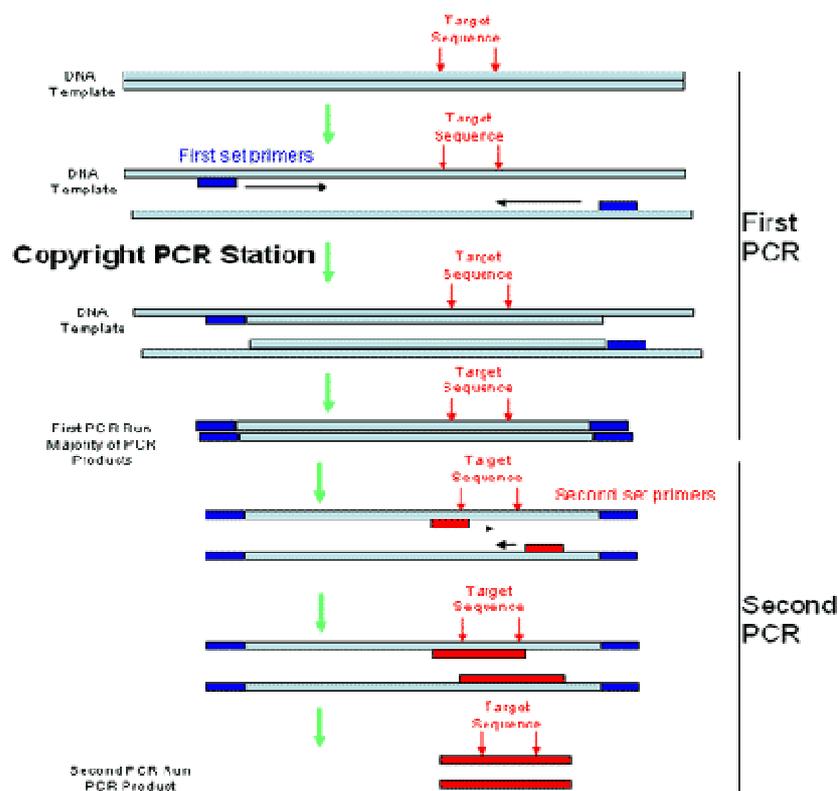


Figura 3. Representação esquemática do nested PCR (Retirado de: <http://www.pcrstation.com/nested-pcr/>).

A principal vantagem na utilização de métodos moleculares é a rapidez nos resultados, possibilitando em doentes com exame directo positivo a confirmação da suspeita de TB. Ling e colaboradores (Ling et al., 2008), numa meta-análise recente sobre testes comerciais de amplificação de ácidos nucleicos para diagnóstico da TB pulmonar, mostraram que a sensibilidade destes testes varia entre 36 a 100%, o que faz com que a sua utilização, tal como todos os outros testes, deva ser sempre interpretada em conjunto com o resultado de outros testes com o exame clínico do doente (Hale et al., 2001).

1.6 Novos métodos de diagnóstico de TB baseados na resposta imunitária

Apesar de existirem vários métodos rápidos de diagnóstico de TB (exame directo, PCR e TCT), nenhum oferece ainda segurança para se obter o diagnóstico definitivo de TB, o qual só é obtido através do isolamento da bactéria *M. tuberculosis* em meio de cultura. Assim, além de existirem casos difíceis de diagnosticar, como por exemplo, TB extrapulmonar e pacientes co-infectados com TB-VIH, o exame cultural é muito demorado. Existe assim uma grande necessidade na utilização de novos métodos de diagnóstico, que em conjunto com os testes laboratoriais de rotina, permitam um diagnóstico definitivo de TB rápido.

Nos últimos anos, novos métodos de detecção das micobactérias têm vindo a ser investigados para melhorar o diagnóstico da TB. Estes métodos incluem para além da detecção das bactérias em amostras clínicas por biologia molecular, como referido anteriormente, a pesquisa da resposta imunológica adquirida dos pacientes a antígenos de *M. tuberculosis* (resposta humoral ou resposta celular). Os testes baseados na pesquisa da resposta humoral detectam anticorpos produzidos pelos linfócitos B em resposta à infecção por micobactérias; os testes baseados na resposta celular detectam INF- γ produzido por linfócitos T em resposta à estimulação *in vitro* por antígenos específicos (Tessema et al., 2001; Janeway et al., 2005). Estes testes possuem em comum as seguintes vantagens: ser apenas necessária uma visita do paciente ao local de execução do teste; não ser necessária qualquer inoculação de material biológico no doente (o que não acontece no TCT); tornar possível o diagnóstico na impossibilidade de colheita de expectoração (uma vez que esta é a amostra biológica mais comum para diagnóstico de TB pulmonar) e de serem específicos do *M. tuberculosis* (que ao contrário do TCT, parecem não serem afectados pela vacinação prévia com BCG nem pela exposição a micobactérias ambientais) (Diel et al., 2006). Já estão disponíveis no mercado testes baseados na detecção de INF- γ produzido por

linfócitos T em resposta à estimulação in vitro por antigénios específicos (Cho et al., 2007).

1.6.1 Testes de diagnóstico baseados na pesquisa da resposta celular – detecção de INF- γ produzido por linfócitos T em resposta à estimulação in vitro por antigénios específicos

Testes imunológicos que se baseiam na pesquisa da resposta celular, ou seja, na produção de INF- γ pelos linfócitos T em resposta a antigénios específicos de *M. tuberculosis* (e ausentes no *M. bovis* BCG) têm sido desenvolvidos. Estes métodos de diagnóstico de TB são baseados no facto de que as células T específicas para antigénios de micobactérias, que expandem num indivíduo infectado, quando estimuladas in vitro com antigénios específicos de *M. tuberculosis* libertarem INF- γ . Quando se verifica uma elevada detecção de INF- γ é indicativo da prévia sensibilização do indivíduo com *M. tuberculosis*. Apesar de ser um teste mais específico do que o TCT, tem em comum o facto de não permitir a distinção entre infecção passada ou presente, e nesta, entre infecção activa ou latente. (Pai et al., 2005). A resposta imunitária celular avaliada por estes métodos pode variar de acordo com determinados factores, tais como, prevalência de TB, exposição a micobactérias ambientais, vacinação por BCG, má nutrição e infecções por parasitas (Chapman et al., 2002; Lalvani et al., 2001; Ravn et al., 1999; Pai et al., 2006). A indução da produção de INF- γ varia também de acordo com a fase de tratamento anti-bacilar. Alguns estudos mostram que existe um declínio de resposta pelas células T ao longo do tratamento anti-bacilar, enquanto que outros mostram um aumento dessa mesma resposta (Pai et al., 2004a), o que demonstra que estes testes não podem ser usados para monitorização do tratamento da TB activa e TB latente.

De modo a aumentar a especificidade relativamente ao TCT, no qual a mistura antigénica usada é comum a diferentes espécies de micobactérias, incluindo

micobactérias ambientais, *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* (Andersen et al., 2000) utilizam-se nos testes de pesquisa de INF-• antigénios específicos de *M. tuberculosis*, tais como o 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) e 10 kDa (CFP-10). Estes antigénios são muito imunogénicos e são codificados na região de diferença RD1 de *M. tuberculosis*, o que os torna específicos, pois esta região está presente no complexo *M. tuberculosis* e ausente em todas as estirpes de BCG e nas micobactérias ambientais (Mahairas et al., 1996), com excepção de *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium flavescens* e *Mycobacterium marinum*, que também possuem estes antigénios na sua constituição (Chapman et al., 2002).

Existem poucos estudos a avaliar a eficácia de testes imunológicos que se baseiam na detecção de INF-• em determinados grupos, nomeadamente, em indivíduos imunocomprometidos (com co-infecção TB-VIH), com TB extra-pulmonar, crianças e profissionais de saúde. Pai e colaboradores (Pai et al., 2005) verificaram que em indivíduos imunocomprometidos existe um elevado número de resultados indeterminados na detecção de INF-•, devido a uma forte diminuição das células T.

Existem dois testes comerciais baseados na detecção de INF-• produzido por linfócitos T: o QuantiFERON-TB® (Cellestis Limited, Carnegie, Australia) e o T-SPOT-TB® (Oxford Immunotec Ltd, Oxford, UK) (Pai et al., 2006). O QuantiFERON-TB® foi aprovado pela FDA em 2001, sendo que a 1ª geração deste teste utilizava PPD como antigénios específicos de *M. tuberculosis*, apresentando os mesmos problemas de especificidade que o TCT. Sendo assim foi substituído pelo teste QuantiFERON-TB-Gold® (QTF-TB-G®) que utiliza os antigénios ESAT-6 e CFP-10 em vez da PPD. Este novo teste foi aprovado pela FDA em Dezembro de 2004. O teste T-SPOT-TB® está concebido para contar o número de células T produtoras de INF-• após estimulação *in vitro* das mesmas com ESAT-6 e CFP-10 (Lalvani et al., 1998). A produção de INF-• em resposta aos referidos antigénios é

medida no QTF-TB-G® por enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e no T-SPOT-TB® por enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) (Pai et al., 2006).

Para além das possíveis vantagens destes testes, como referido anteriormente, também apresentam algumas desvantagens, como o facto de exigirem condições laboratoriais específicas (nem sempre possíveis nos centros de diagnóstico de TB em Portugal), serem mais dispendiosos e exigirem formação adequada dos técnicos responsáveis pelo diagnóstico para a realização da metodologia (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre o Teste Cutâneo da Tuberculina e testes baseados na detecção de INF-•.

Características principais	Teste Cutâneo da Tuberculina	Testes de detecção de INF-•
Reacção cruzada com vacinação por BCG	Sim	Não
Reacção cruzada com micobactérias ambientais	Sim	Muito menos provável (podendo reagir com algumas espécies)
Correlação com a exposição ao M. tuberculosis	Sim	Sim, mas correlaciona-se melhor que o TCT
Fenómeno de “boosting”	Sim pode ocorrer após repetição do teste	Não
Antígenos usados	PPD	ESAT-6 e CFP-10
Técnica usada	Teste cutâneo in vivo	Testes in vitro (ELISA ou ELISPOT)
Custos material	Baixos	Moderados a altos
Visita do doente	Duas	Uma
Necessidade de equipamento laboratorial próprio	Não	Sim
Tempo até à obtenção do resultado	2-3 dias	1-2 dias

Os estudos que avaliaram a eficácia destes testes no diagnóstico de TB activa, usando como população indivíduos com cultura positiva, verificaram que estes testes são mais específicos que o TCT, pois não são influenciados pela vacinação com BCG nem, na grande maioria dos casos, pela sensibilização com micobactérias ambientais. A sensibilidade também é mais elevada que no TCT. Estes mesmos trabalhos apresentam o T-SPOT-TB® com valores de sensibilidade que variam entre 83-96% e o QuantiFERON-TB® com valores que variam entre 70-89% (Tabela 4).

Tabela 4. Sensibilidade e especificidade do TCT e testes de detecção de INF-• na TB activa.

	Indivíduos com ou sem vacinação por BCG	Sensibilidade	Especificidade	Referências	
		%	%		
TCT	<u>vacinados</u>	67	79	Lee et al., 2006	
		78	51	Kang et al., 2005	
		66	35	Mori et al., 2004	
		78	47	Brock et al., 2001	
	<u>não vacinados</u>			96	Taggart et al., 2006
				100	Brock et al., 2001
			70	92	Lee et al., 2006
			81	96	Kang et al., 2005
QTF-TB-G®	<u>vacinados</u>	89	98	Mori et al., 2004	
		89	78	Brock et al., 2001	
		85	97	Ravn et al., 2005	
		74		Ferrara et al., 2006	
	<u>não vacinados</u>			100	Taggart et al., 2006
				100	Brock et al., 2001
			95	97	Lee et al., 2006
			92	100	Pathan et al., 2001
T-SPOT-TB®	<u>vacinados</u>	96	100	Lalvani et al., 2001a	
		96	100	Lalvani et al., 2001b	
		83		Ferrara et al., 2006	

Em Portugal os testes para a detecção de INF-• não estão, por enquanto, disponíveis na rede de laboratórios, mas a curto prazo, pensa-se que a DGS

procederá à implementação da sua utilização no âmbito do Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose (Circular Informativa DGS, 2007).

1.6.2 Testes de diagnóstico baseados na pesquisa da resposta humoral – detecção de anticorpos específicos para *M. tuberculosis*

Os trabalhos de investigação realizados até à data indicam que os anticorpos produzidos durante uma infecção por micobactérias não apresentam uma função importante no combate à infecção, no entanto, qualquer indivíduo infectado produz anticorpos específicos contra o agente causal (Raja, 2004). Têm sido estudados vários métodos de serodiagnóstico de TB, onde são apresentadas as potencialidades de diferentes antigénios específicos de *M. tuberculosis* na detecção de anticorpos em indivíduos infectados (Tabela 5).

Entre os antigénios usados na determinação da resposta humoral à infecção por micobactérias encontram-se: ESAT-6, CFP-10, Lipoarabinomano (LAM), o factor corda, Mtb81 (88 kDa), 16 kDa e 38 kDa. O antigénio 38 kDa é dos antigénios o mais imunogénico de *M. tuberculosis* (Houghton et al., 2002; Wilkinson et al., 1997). A expressão de anti-38 kDa está associada com a fase de replicação bacteriana num estado de TB activa (Laal et al., 1997; Palomino et al., 2007). O antigénio 16 kDa é classificado como proteína alfa-cristalina de choque térmico, e encontra-se apenas presente em estirpes de crescimento lento pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Este antigénio tem um papel importante na capacidade de sobrevivência dos bacilos num ambiente intracelular hostil (estado de persistência não replicativa) (Yuan et al., 1996).

Os testes de serodiagnóstico detectam anticorpos específicos de *M. tuberculosis* em amostras de sangue, e são um método atractivo de diagnóstico de TB, por serem de execução fácil e rápida, quando comparados com outros métodos de

diagnóstico (ex: pesquisa de INF-• e cultura). Estas características adicionadas à não exigência de equipamento laboratorial específico e dispendioso, tornam esta técnica muito interessante e aplicável a países com menos recursos económicos (Brock et al., 2001).

Tabela 5. Sensibilidade e especificidade de antígenos utilizados em métodos de serodiagnóstico de TB.

Antígeno (s)	Tipo TB	Sensibilidade		Especificidade	Referência
		VIH-	VIH+		
ESAT-6	TP	36%		100	
	NTP	34%			
CFP-10	TP	78%		96%	Zhang et al., 2007
	NTP	66%			
Rv3425 (PPE)	TP	70%		100%	
	NTP	59%			
38 kDa + 16 kDa	TP	55%-63%		93%	Senol et al., 2007
	NTP	25%			
TbF6 + DPEP1 + Mtb 81	TP	70-80%	47%	98%	Houghton et al., 2002
	NTP	85%	84%		
38 kDa + LAM (IgG)	TP	0-41%		98%	Júlian et al., 2004
	NTP	0%			
Rv3872	TP	92%		95%	Mukherjee et al., 2007
	NTP	89%			
Rv3878	TP	88%		91%	
	NTP	84%			
TB16.3	TP	46-98%		97%	
TB9.7	TP	79%	91%		Weldingh et al., 2005
	NTP	37%			

TP – Tuberculose pulmonar; NTP – Tuberculose não pulmonar; DPEP1 – prolin rich protein; TbF6 – 38 kDa+Mtb8+CFP10+Mtb48.

O serodiagnóstico para TB apresenta uma grande variabilidade de resultados a nível da sensibilidade e especificidade. Factos que explicam esta diversidade são a grande heterogeneidade na produção de anticorpos pelos doentes com TB

(Lyashchenko et al., 1998), uma vez que a resposta humoral na infecção por *M. tuberculosis* varia muito de indivíduo para indivíduo e também com diferenças na população (prevalência TB e outras doenças como infecção por VIH e vacinação prévia por BCG) que condicionam o perfil de anticorpos dos indivíduos infectados, sendo responsável por uma resposta humoral heterogénea à doença. Weldingh e colaboradores (Weldingh et al., 2005) estudaram um conjunto de 35 antígenos específicos do *M. tuberculosis*, que estão ausentes nas estirpes de *M. bovis* BCG, e verificaram que anticorpos específicos para um determinado antígeno eram mais frequentes nas amostras de soro de doentes com TB que viviam em Uganda (país com elevada prevalência de TB) do que nos doentes com TB que viviam na Dinamarca (país com prevalência muito baixa de TB). Os resultados também variam com os diferentes estágios da infecção (disseminação da bactéria das lesões pulmonares e duração da estimulação antigénica) e do tratamento da doença e exposição a micobactérias ambientais (Dye et al., 1999; Singh et al., 2001; Samanich et al., 2001; Senol et al., 2007). Steingart e colaboradores (Steingart et al., 2007) mostraram que a sensibilidade de vários testes baseados na detecção de anticorpos para o diagnóstico de TB é maior em indivíduos com exame directo positivo que nos que apresentam exame directo negativo e a especificidade é maior em voluntários saudáveis do que em doentes com suspeita de TB e que posteriormente foi excluída. Por todos estes factores se depreende a necessidade de desenvolver métodos de serodiagnóstico que utilizem uma combinação de antígenos específicos de *M. tuberculosis* adaptado à população em estudo, para que os resultados sejam conclusivos (Lyashchenko et al., 1998; Lyashchenko et al., 2000; Houghton et al., 2002; Singh et al., 2001; Samanich et al., 2001).

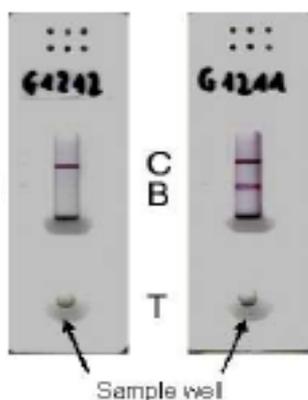
Nos indivíduos infectados com VIH, o serodiagnóstico para TB poderia ser útil, uma vez que o resultado depende da quantidade de anticorpos no soro, os quais são produzidos por linfócitos B. É sabido que estes indivíduos apresentam um número elevado de resultados indeterminados através da detecção de INF- γ . Este facto pode ser explicado pela diminuição da resposta das células T, sendo que

nestes doentes o número de linfócitos T CD4⁺ é geralmente baixo (Ferrara et al., 2006; Pai et al., 2006). Assim estes novos métodos de serodiagnóstico surgem como uma possível solução para estes casos de difícil diagnóstico, embora a sensibilidade demonstrada neste tipo de TB seja ainda baixa (American Thoracic Society, 2000). Singh e colaboradores (Singh et al., 2005) demonstraram a presença de anticorpos anti- 81-kDa e/ou anticorpos anti-MPT51 em cerca de 90% dos indivíduos infectados com VIH que mais tarde desenvolveram TB, e a ausência destes em indivíduos saudáveis. Assim, pensa-se que a presença destes anticorpos correlaciona-se com a replicação de *M. tuberculosis* in vivo, sendo que a sua detecção pode servir como marcador de pré-infecção por *M. tuberculosis* no caso de indivíduos infectados com VIH. Torna-se assim imperativo em países onde a TB é endémica e existe um elevado número de casos de infecção com VIH, iniciarem-se estudos para determinar as sensibilidades e especificidades dos testes de serodiagnóstico para estes dois e outros antígenos (Singh et al., 2005).

A determinação de anticorpos nos métodos de serodiagnóstico pode ser feita por diferentes métodos: pela técnica de ELISA, MAPIA (multiantigen print immunoassay) e por testes rápidos de difusão lateral (imunocromáticos) (Janeway et al., 2005). Os testes de ELISA e MAPIA são ensaios com alguma complexidade pois envolvem vários passos (adesão do antígeno, adição de amostras de soro, vários passos de lavagem) e equipamento específico no caso da ELISA, enquanto que os testes imunocromatográficos são tecnicamente mais simples, sendo que os antígenos já estão aderentes à membrana do teste (ex: nitrocelulose) onde as amostras são aplicadas. Neste caso as reacções antígeno-anticorpo são visualizadas na linha do teste em poucos minutos (Bangs Laboratories, 2008) (Figura 4). A vantagem da técnica de ELISA é a possibilidade de execução de várias amostras ao mesmo tempo com possibilidade de automatização e acima de tudo ser um método quantitativo o que torna a leitura dos resultados absolutamente objectiva. Para países em desenvolvimento com menos recursos, os testes imunocromatográficos são no entanto preferíveis, pois não necessitam de equipamento específico, sendo apenas necessária a visualização do

aparecimento da linha controlo e da amostra. Apresenta no entanto a desvantagem da leitura do teste ser de por vezes subjectiva (Pai et al., 2004 a).

Resultado negativo
Aparecimento de apenas uma banda rosa na zona do controlo (C)



Resultado positivo
Aparecimento de duas bandas rosa, uma na zona do controlo (C) e outra na zona do teste (B)

Figura 4. Teste imunocromático

De acordo com as recomendações da OMS, para substituir o teste gold standard (cultura) no diagnóstico da TB, os testes de serodiagnóstico têm de apresentar uma sensibilidade >80% e especificidade >95%, o que não se verifica nos testes comerciais já existentes (Tabela 6). Apesar da clara evidência de que a utilização de conjuntos antigénicos em serodiagnóstico é vantajosa, pelos factos já mencionados, a combinação destes resultados com o resultado do exame directo faz aumentar a sensibilidade para valores idênticos aos da cultura bacteriológica, sugerindo o seu potencial uso no diagnóstico da TB (Perkins et al., 2003).

Tabela 6. Testes comerciais de serodiagnóstico para detecção de anticorpos na TB (adaptado de Steingart et al., 2007)

Teste	Antigénio (s)	Ig	Método	Laboratório	Sens.	Espec.	Grupo Control o
Anda-TB	Antigénio 60	IgG, IgA e IgM	ELISA	Anda Biologicals	20-95%	62-100%	DPNT e Saudáveis
Detec-TB	5 proteínas diferentes	IgG	ELISA	BioChem ImmunoSystems	42-92%	80-99%	Saudáveis
ICT TB	38 kDa e 4 antigénios próprios	IgG	Imunocro .	ICT Diagnostics	26-94%	69-100%	DPNT
MycoDot	LAM	IgG	ImunoDot rápido	Mossman Associates	13-89%	76-99%	DPNT e Saudáveis
Pathozyme Myco	LAM e 38 kDa	IgG, IgA e IgM	ELISA	Ómega Diagnostics	33-93%	79-100%	DPNT e Saudáveis
Pathozyme TB Complex Plus	38 kDa e 16 kDa	IgG	ELISA	Ómega Diagnostics	15-85%	70-100%	DPNT e Saudáveis
TB enzyme Immunoassay	Componente (antigénico Kp-90)	IgG e IgA	ELISA	kreatech	54-93%	30-96%	DPNT
TB glycopid assay	trehalose 6,6'-dimycolate, trehalose monomycolate, diacyl trehalose, phenolic glycolipid, 2,3,6,6-tetraacyl-trehalose-2-sulfate, e 2,3,6-triacyl-trehalose	IgG	ELISA	Kyowa Medex	48-96%	58-96%	DPNT

Espec. – Especificidade; Sens. – Sensibilidade; DPNT – Doença pulmonar não Tuberculose

1.7 Diagnóstico de TB latente

A condição de TB latente tem sido definida por um TCT positivo, em indivíduos assintomáticos que foram expostos ao *M. tuberculosis* mas que não apresentam anomalias radiológicas características da TB activa (Lalvani et al., 2007). Mas esta exposição pode ser recente (TB infecção) ou aconteceu em momento anterior não determinado (TB latente). Clinicamente estas duas formas são impossíveis de definir. A exposição recente a um paciente bacilífero oferece uma maior segurança para a definição de TB latente. No caso de pacientes sem história recente de

contacto e sem sintomas, o um resultado do TCT positivo é muito limitado para poder concluir que o indivíduo está infectado, sobretudo se são pessoas vacinadas com BCG. A baixa carga bacteriana presente nos indivíduos com TB latente torna impossível a detecção directa de *M. tuberculosis* através de testes microbiológicos, sendo que o diagnóstico da doença terá de ser feito com base em marcadores imunológicos da infecção (Lalvani et al., 2007).

Há mais de cem anos que o TCT tem sido usado para o diagnóstico da TB latente e TB activa (Lee et al., 2002). Infelizmente, devido aos possíveis resultados falsos positivos e falsos negativos explicados anteriormente, este teste é pouco específico e sensível para o diagnóstico de TB latente (Huebner et al., 1993, Andersen et al., 2000).

Os dois testes comerciais de pesquisa de produção de INF- γ por linfócitos T: QFT-TB-Gold® e o T-SPOT-TB® têm sido estudados para a sua aplicação no diagnóstico da TB latente, e pelo menos teoricamente, podem superar algumas limitações do TCT (Ferrara et al., 2006). Existem diferenças na resposta imunológica mediada pelo TCT e testes de detecção de INF- γ . A prova da tuberculina induz uma reacção de hipersensibilidade retardada reflectindo uma resposta de memória enquanto que os outros testes detectam a libertação de INF- γ o que indica uma resposta imune efectiva à doença (Figura 5). Devido a estas diferenças nas respostas imunitárias e também à especificidade dos antígenos utilizados, sugere-se que a detecção de INF- γ detecta mais casos de doença recente e persistente que o TCT (Arend et al., 2007; Pai et al., 2006).

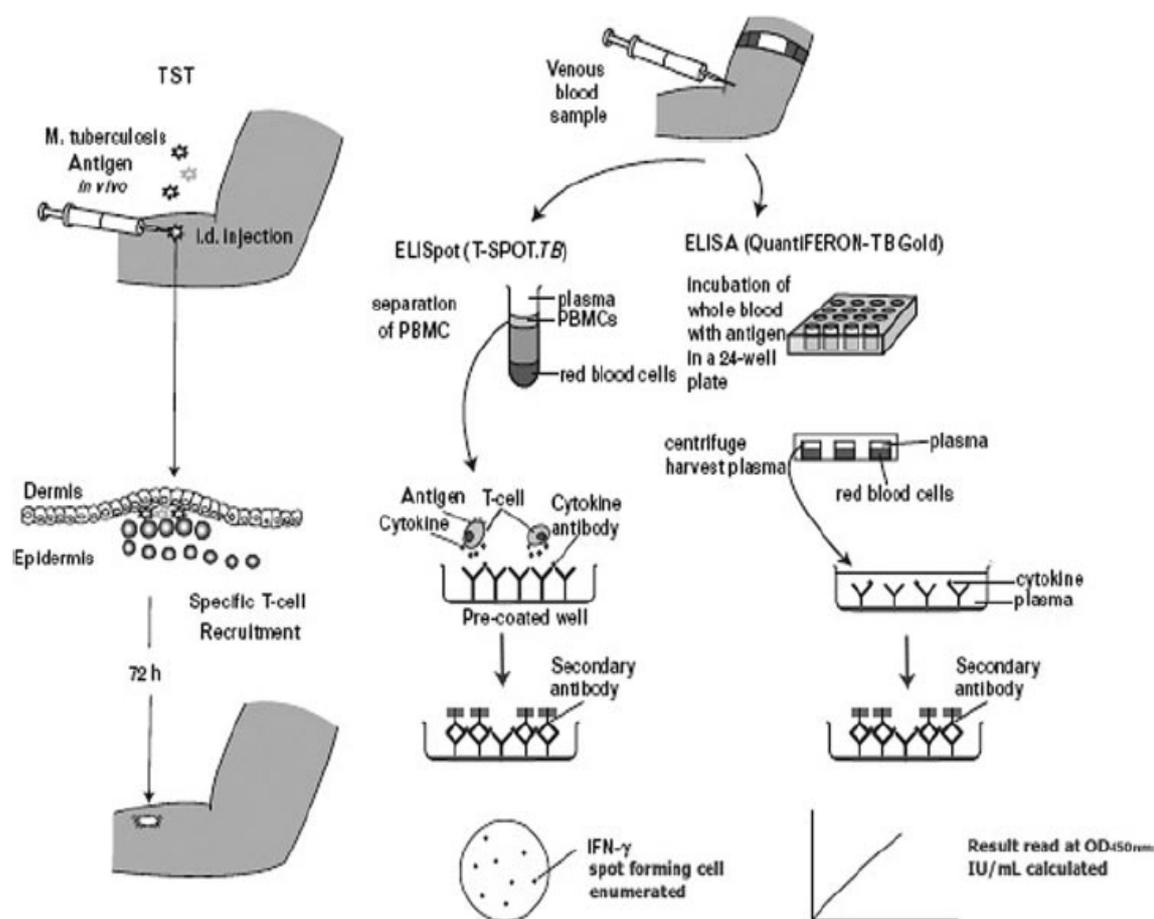


Figura 5. Representação esquemática do TCT, T-SPOT-TB e QuantiFERON-TB para o diagnóstico de TB latente.

Um teste de diagnóstico que se correlacione melhor do que o TCT com o nível de exposição ao *M. tuberculosis*, e que seja independente da vacinação por BCG, será mais específico e sensível, pois uma vez que a transmissão do *M. tuberculosis* é feita essencialmente por aerossóis, a proximidade e duração do contacto com uma pessoa infectada é determinante para o surgimento de um novo caso de TB latente (Lalvani et al., 2001b, Morrison et al., 2008). Kang e colaboradores (Kang et al., 2005) compararam o TCT e o QTF-TB-G[®] numa população onde a TB tem uma incidência intermédia e a vacinação por BCG é obrigatória. A população foi dividida em quatro grupos, em função do risco de infecção e verificaram que testes baseados na detecção de INF- γ correlacionam-se melhor do que o TCT com o nível de exposição. Zellweger e colaboradores (Zellweger et al., 2005) também

compararam o TCT e o T-SPOT-TB® numa população de contactos com *M. tuberculosis* com a finalidade de avaliar como se correlacionavam ambos os testes com o grau de exposição à bactéria. Tal como nos estudos anteriores, verificaram que à medida que a exposição à bactéria aumenta, a percentagem de indivíduos com um teste T-SPOT-TB® positivo também aumenta significativamente, enquanto que o TCT não mostrou esta associação.

Não existe um método gold standard para a detecção da TB latente e demonstrar a superioridade de um qualquer teste em relação ao TCT no seu diagnóstico é mais difícil do que na TB activa visto não ser possível medir directamente a sensibilidade e especificidade de um novo teste de diagnóstico (Lalvani et al., 2007). Torna-se assim fundamental melhorar o diagnóstico da TB latente e sendo serodiagnóstico um método simples e rápido de efectuar e interpretar, é urgente avaliar o comportamento da resposta imunitária humoral na infecção latente, de forma a avaliar a utilidade destes testes no diagnóstico da TB latente.

2. OBJECTIVOS DO ESTUDO

A – No contexto do diagnóstico de TB latente pretende-se:

- Criar um conjunto de soros de pacientes com diagnóstico de TB latente, completando assim um banco de soros existentes contendo pacientes com TB activa e controlos.
- Avaliar a eficácia de dois testes de serodiagnóstico, o TB STAT PAK II e MAPIA, com vista a avaliar a sua aplicabilidade no diagnóstico da TB latente em Portugal.
- Pesquisar directamente a presença de bactérias do complexo M. tuberculosis no timo, pulmão e baço humanos por técnicas de PCR com vista a avaliar a possibilidade de detectar por esta técnica micobactérias no tecido da população geral.

B – No contexto do serodiagnóstico em pacientes com TB activa e em tratamento pretende-se:

- Continuar estudos anteriores realizados no laboratório na avaliação da utilidade de dois testes de serodiagnóstico (TB STAT PAK II e MAPIA) para pacientes com TB, especificamente:
 - . Avaliar a sensibilidade dos testes de serodiagnóstico ao longo do tratamento anti-bacilar.
 - . Constituir um conjunto de soros de pacientes com patologia pulmonar (sem TB) de forma a estabelecer mais um grupo de indivíduos controlo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Constituição de um conjunto de soros de pacientes com diagnóstico de TB latente

Os pacientes foram seleccionados pela Dr.^a Raquel Duarte no Centro de Diagnóstico Pneumológico de Vila Nova de Gaia. Todos os voluntários deste estudo assinaram um consentimento informado obrigatório (Anexo I). Foram recolhidas amostras de sangue (para obtenção de soro e plasma) para avaliar os testes de serodiagnóstico na identificação de pacientes com TB latente. Os critérios de selecção dos indivíduos participantes no estudo incluem: contacto recente com pessoa que apresentava exame directo positivo da expectoração, ausência de sintomas de TB (clínicos e radiológicos), resultados do TCT e Quantiferon positivos.

Identificação da amostra e ficha identificativa

Para cada voluntário foi preenchida uma ficha com toda a informação necessária para este estudo (Anexo II). Desta ficha constam informações referentes a: idade, sexo, data da colheita da amostra, infecção por VIH, vacinação com BCG, resultados do TCT e do Quantiferon. A informação de cada ficha foi introduzida numa base de dados de forma a facilitar a sua análise. A cada amostra de soro foi atribuído um código, que foi inscrito no criotubo e na respectiva ficha identificativa. O número atribuído a cada amostra contém as iniciais do local onde está situado o Centro de Diagnóstico Pneumológico (CDP), ou seja, Vila Nova de Gaia (VNG) e começou com o número 1 e sendo sequencialmente numeradas as amostras seguintes (exemplo: VNG#01). Por questões éticas, todas as amostras permanecem anónimas, sendo a ligação código-paciente permitida apenas ao médico.

Transporte, preparação e armazenamento das amostras

As amostras de sangue colhidas no CDP de Vila Nova de Gaia em tubos com e sem anticoagulante, foram transportadas para o Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) no Porto, em contentores de segurança biológica, através de um serviço especial dos CTT. O transporte foi realizado à temperatura ambiente e no mesmo dia da colheita da amostra. Chegadas ao IBMC receberam o seguinte processamento:

1. Verificação de formação e retracção do coágulo.
2. Identificação dos criotubos com o código e data da colheita da amostra (dependendo da quantidade de sangue - 1 a 4 criotubos por amostra).
3. Centrifugação da amostra a 2.500rpm durante 10min e recolha do soro e plasma para os criotubos em câmara de fluxo laminar.
4. Conservação dos soros e plasma por congelação a -80°C.
5. Registo das amostras num ficheiro com o respectivo código de identificação, data da colheita, número de criotubos e volume recolhido em cada criotubo por amostra (exemplo:4 soros x 1000•l).
6. Registo no ficheiro das amostras de qualquer observação adicional relativa à amostra (exemplo: amostra hemolisada ou límpida).

A divisão de cada amostra em várias alíquotas teve por objectivo evitar o descongelamento da totalidade da amostra em cada utilização e também permitir manter um conjunto de amostras em arcas congeladoras distintas (evitando o descongelamento de todo o banco de soros e plasma em caso de avaria de uma arca congeladora). Foi elaborado um mapa onde consta a organização das amostras armazenadas nas diferentes arcas para que se possa saber a localização exacta de cada uma.

3.2 Constituição de um conjunto de soros de pacientes com patologia pulmonar mas sem TB

Os pacientes para este grupo controlo foram também seleccionados pela Dr.^a Raquel Duarte. Todos os voluntários deste estudo assinaram um consentimento informado obrigatório (Anexo I). Foram recolhidas amostras de sangue para obtenção de soro e plasma. Os critérios de selecção dos indivíduos participantes no estudo incluem: informação clínica clara da não existência de TB no presente nem história de TB no passado e presença de outra doença pulmonar. A identificação das amostras e fichas identificativas, transporte, preparação e armazenamento foram executadas de forma similar à constituição do grupo de amostras de pacientes com TB latente.

3.3 Continuação da constituição do banco de soros de indivíduos com TB activa e controlos

O banco de soros de indivíduos com TB activa e em várias fases de tratamento, iniciado em estudos anteriores foi continuado durante este trabalho, muito em particular amostras de doentes em diferentes fases de tratamento. As amostras colhidas nos centros de diagnóstico de TB colaboradores com o estudo (Hospital Joaquim Urbano, Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de S. João e CDP de Vila Nova de Gaia) foram enviadas para o IBMC como especificado anteriormente. Foram igualmente congeladas a -80°C e divididas em várias alíquotas para serem separadas em três arcas congeladoras distintas. Foi anotado no mapa, onde consta a organização das amostras armazenadas nas diferentes arcas, de forma a saber a localização exacta de cada uma.

3.4 Métodos de serodiagnóstico utilizados

3.4.1 Teste TB STAT PAK II

O teste TB STAT PAK II (Chembio Diagnostic Systems, New York, USA) é um teste de serodiagnóstico imunocromatográfico. Este teste utiliza um “cocktail” de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* que estão ligadas a uma membrana de fase sólida (Figura 6). Em cada teste são pipetados 30•l de amostra seguido de um diluente próprio fornecido com o teste. Na presença de anticorpos específicos na amostra, estes ligam-se aos antígenos do *M. tuberculosis* conjugados com partículas azuis de látex formando um complexo que migra ao longo da membrana. Na zona do teste (linha T da figura 6) estão impregnadas as proteínas às quais se ligam aos anticorpos específicos para que estes antígenos de *M. tuberculosis* quando presentes na amostra, e na zona de controlo (linha C da figura 6) estão presentes proteínas que se ligam a partículas de látex conjugadas com antígenos específicos do teste. Para que o resultado do teste seja validado, terá de obrigatoriamente aparecer a linha na zona do controlo. Num resultado positivo observa-se uma banda azul na zona teste e uma banda idêntica na zona controlo, enquanto que num teste negativo só se visualiza uma banda azul na zona controlo.

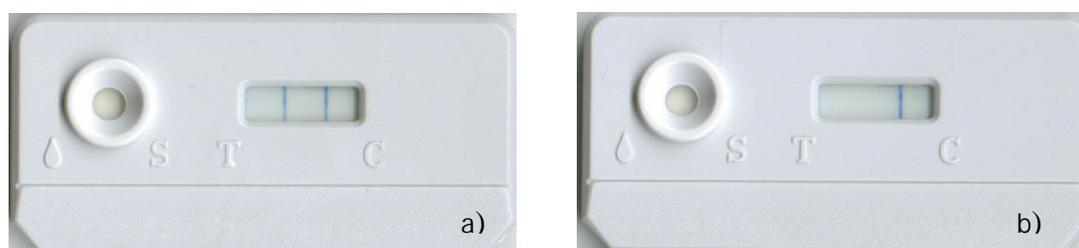


Figura 6. Esquema representativo Teste TB STAT PAK II: a) resultado positivo; b) resultado negativo.

3.4.2 MAPIA

O teste MAPIA (Chembio Diagnostic Systems, New York, USA) é um teste de serodiagnóstico que utiliza cinco antigénios específicos de *M. tuberculosis* de reactividade serológica reconhecida: ESAT-6, CFP-10, 38 kDa, 16 kDa, MPB83 e combinações destes antigénios E6/P10 (ESAT-6, CFP-10), F10 (Mtb8, CFP-10 e 38 kDa) e 16/83 (16 kDa e MPB83). Estes antigénios estão imobilizados em linhas horizontais em membranas de nitrocelulose (é utilizado um aparelho próprio para colocar os antigénios nas membranas) (Figura 7). As membranas são cortadas em tiras perpendiculares às linhas dos antigénios e incubadas com as amostras de soro, que após lavagem são incubadas com anticorpos anti-IgG humanos conjugados com peroxidase. A actividade enzimática é visualizada após incubação das tiras com um substrato que na presença da peroxidase produz cor. As tiras, depois de secas em papel absorvente, são organizadas numa folha de papel, com a respectiva identificação das amostras, onde se procede à sua leitura e interpretação.

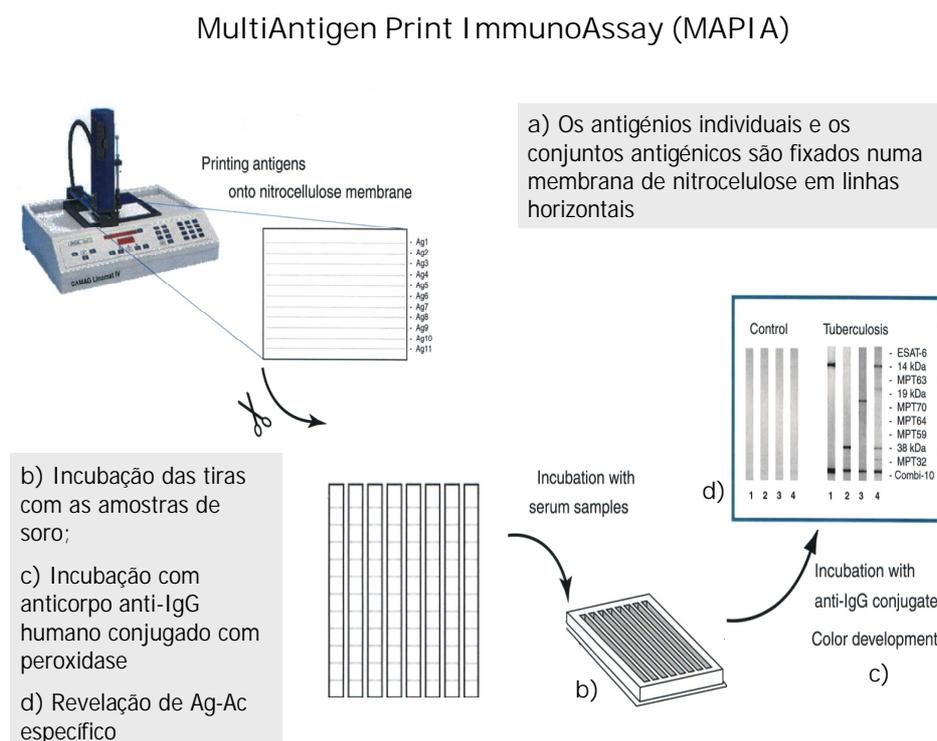


Figura 7. Esquema representativo da técnica MAPIA.

A intensidade de cor correspondente a cada banda de reacção de antigénio-anticorpo foi analisada e registada num mapa de esquema de cores das tiras (Figura 8). Estas cores foram classificadas da seguinte forma: a cor branca corresponde à ausência de desenvolvimento de cor o que significa que o teste para esse antigénio é negativo; a cor amarela corresponde a uma tonalidade muito ligeira, da mesma intensidade do controlo negativo, também sendo considerado um resultado negativo; a cor laranja e vermelha correspondem a uma coloração da banda cada vez mais intensa, sendo considerado um resultado positivo para esse antigénio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ESAT-6															
CFP10	Red						Orange								Yellow
38 kDa		Yellow		Orange									Orange		Yellow
16 kDa		Yellow			Orange								Orange	Orange	
MPB83												Orange			
E6/P10	Red	Yellow	Yellow				Orange								
F10	Red		Orange	Red	Red		Orange			Red	Red		Orange	Red	Yellow
16/83											Orange	Red	Orange	Red	
Resultado	pos	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg

Figura 8. Esquema de cores das tiras do método MAPIA para um conjunto aleatório de 15 soros testados.

3.5 Detecção de bactérias do complexo *M. tuberculosis* em tecidos humanos: timo, pulmão e baço

Um dos objectivos deste trabalho foi a pesquisa de bactérias do complexo *M. tuberculosis* em tecidos humanos: timo, pulmão e baço. A colheita das amostras de tecidos foi feita a partir de cadáveres autopsiados no Instituto Nacional de Medicina Legal (INML), Delegação do Porto, com quem o Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde/Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho (ICVS/ECS) mantém colaboração. Foram colhidas amostras para pesquisa de micobactérias por PCR, e para estudo histológico (coloração de Ziehl-Neelsen,

Hematoxilina-Eosina) de cada cadáver com dimensões aproximadas de 1cm³. Foi elaborada uma grelha com todas as informações recolhidas pelo médico legista referentes a cada cadáver, onde consta: idade, sexo, existência ou não de história de tuberculose e/ou de SIDA e causa de morte. Nesta ficha foram ainda anotadas lesões que poderiam ser indicativas de a pessoa ter sofrido de tuberculose tais como: cavernas pulmonares e granulomas em qualquer órgão. Cada amostra biológica foi identificada com o número de processo do INML e com o nome do órgão (exemplo: 339/07 pulmão). Mais uma vez, por questões éticas, todas as amostras permanecem anónimas, sendo a ligação código-paciente permitida apenas ao médico legista.

Transporte, preparação e armazenamento das amostras

As amostras de tecidos humano para pesquisa de micobactérias por PCR foram transportadas do INML do Porto para o ICVS/ECS em gelo seco, enquanto que as amostras para estudo histológico foram transportadas em paraformaldeído a 4% à temperatura ambiente.

No ICVS todas as amostras para pesquisa de micobactérias por PCR foram congeladas a -80°C até ao seu processamento. Nas amostras para estudo histológico foram preparados blocos de parafina dos quais posteriormente se efectuaram 2 cortes, um dos quais foi corado pelo método de Ziehl-Neelsen e o outro pela coloração de Hematoxilina-Eosina. Como controlo positivo da coloração de Ziehl-Neelsen, para cada conjunto de cortes foi corada também uma lâmina com corte histológico de pulmão de ratinho experimentalmente infectado com *M. avium*. Os cortes histológicos foram observados nas ampliações 40x, 200x e 1000x.

Pesquisa de micobactérias por PCR

Antes de se efectuar o PCR, todas as amostras passaram por um processo de extracção de DNA. O DNA micobacteriano foi libertado por agitação com beads de

zircónio (2 x 30seg num Mini Bead-Beater – Biospec Products), extraído com o uso de fenol e clorofórmio, precipitado com acetato de sódio e álcool etílico absoluto ice cold, lavado com álcool etílico a 70 % e dissolvido em tampão TE. O DNA obtido foi congelado a -20°C até ser efectuado o PCR. O protocolo da extracção está descrito no Anexo III. A presença de DNA de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* foi determinada através de um nested PCR para a sequência IS6110, específica para este complexo (Anexo IV).

Tabela 7. Sequências dos primers para o nested PCR da sequência IS6110.

Primers				Resultado da amplificação
		Sequência	Tamanho (pb)	
outer primers (1º PCR)	IS59	5' GCGCCAGGCGCAGGTCGATGC 3'	21	Fragmento com 662 pb
	INS2	5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3'	20	
inner primers (2º PCR)	IS60	5' GATCAGCGATCGTGGTCTCTGC 3'	21	Fragmento com 106 pb
	INS1	5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3'	20	

Juntamente com o nested PCR da sequência IS6110 foi efectuado para cada amostra um PCR para uma sequência do gene 18s rRNA humano (Anexo V), de forma a garantir que as amostras possuíam DNA humano com qualidade para ser amplificado por PCR.

Tabela 8. Sequências dos primers para o PCR do gene 18s rRNA.

Primers			Resultado da amplificação	
Nome		Sequência	Tamanho (pb)	
18s F (Foward)		5' GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3'	20	Fragmento com 147 pb
18s R (Reverse)		5' CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG 3'	20	

Todos os resultados foram inseridos numa base de dados em suporte informático (Microsoft Office Excel) de forma a facilitar a sua análise.

4. RESULTADOS

4.1 Constituição do banco de amostras

O banco de amostras de soro é constituído por amostras de indivíduos muito bem caracterizados e está em constante crescimento. Informações relevantes como o tipo de TB, vacinação com BCG, infecção por VIH, resultados dos exames directo e cultural, datas de início e fim de tratamento e datas das colheitas das amostras de soro são recolhidas e incluídas numa base de dados.

O banco de amostras de soro é constituído actualmente por 335 amostras de soro subdivididas de acordo com a caracterização dos indivíduos como apresentado na tabela 9. O grupo "controlo negativo" é constituído por 32 amostras de indivíduos saudáveis sem história de TB, com resultados de TCT e Quantiferon negativos e residentes numa zona geográfica de Portugal com baixa incidência de TB. No banco de amostras está também a ser constituído um grupo de indivíduos com TB no passado e outro de contactos saudáveis de doentes com TB activa.

Tabela 9. Banco de amostras de soros.

	Grupo de voluntários	Nº de indivíduos
TB doença	Com co-infecção VIH	57
	Sem co-infecção VIH	148
TB passado	Fim de tratamento > 1 ano	14
	Fim de tratamento < 1 ano	8
TB latente		29
Contactos saudáveis de doentes com TB activa		17
Indivíduos com patologia pulmonar (sem TB)		30
Indivíduos saudáveis (controlo negativo)		32
TOTAL		335

Nota: Foram feitas mais do que uma colheita em indivíduos com TB activa em tratamento

4.1.1 Caracterização da amostra de indivíduos com TB

Foram incluídos no estudo de serodiagnóstico indivíduos com TB activa. A distribuição do sexo na população de indivíduos com TB estudada apresenta uma taxa de 82% de indivíduos do sexo masculino e 18% do sexo feminino (figura 9).

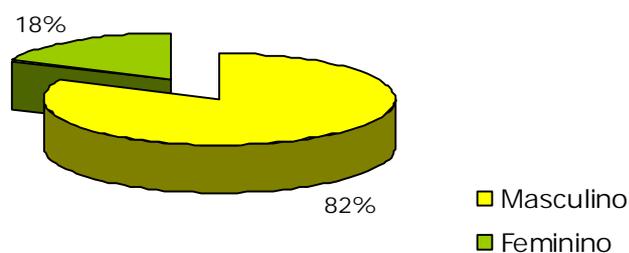


Figura 9. Distribuição do sexo na população de indivíduos com TB

A distribuição etária no grupo de indivíduos com TB, da amostra estudada, está representada na figura 10, indicando que o grupo de indivíduos com maior frequência se situa entre os 25 e os 55 anos. Estes dados reflectem a realidade nacional, uma vez que de acordo com o Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose, a distribuição de TB em Portugal por sexo e grupos etários mantém-se com forte concentração de casos no sexo masculino entre os 25 e os 44 anos (Direcção Geral de Saúde, 2007).

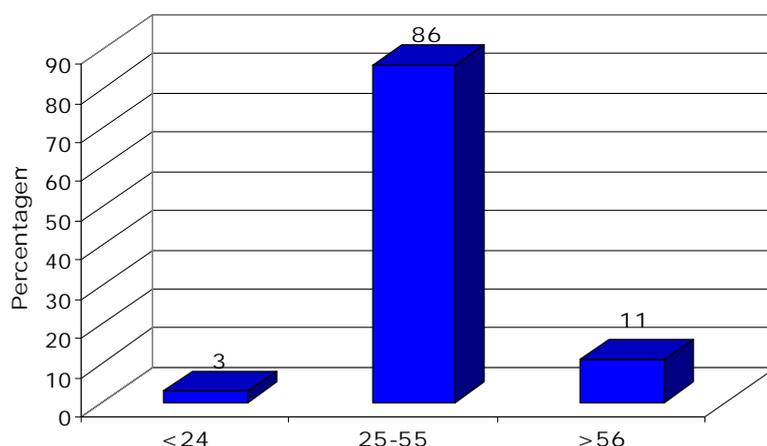


Figura 10. Distribuição da idade na população de indivíduos com TB

Os indivíduos com TB activa foram divididos de acordo com a fase do tratamento anti-bacilar tal como apresentado na tabela 10.

Tabela 10. Amostras de indivíduos com TB segundo as diferentes fases de tratamento anti-bacilar.

	Fases do tratamento anti-bacilar				Total de amostras
	T0	T1	T2	T3	
Sem co-infecção VIH	54	42	16	36	148
Com co-infecção VIH	26	12	11	8	57

T- tratamento anti-bacilar: T0 (sem tratamento ou com tratamento inferior a 15 dias); T1 (tratamento ≥ 16 dias e ≤ 3 meses); T2 (tratamento ≥ 4 meses e ≤ 6 meses) e T3 (fim de tratamento)

Todas as informações relativas a cada amostra (data da colheita, fase de tratamento, tipo de TB, infecção ou não por VIH, resultado da cultura e exame directo,) estão muito bem organizadas numa base de dados criada nos programas Microsoft Office Excel e SPSS SmartViewer 13.0 num trabalho anterior e está permanentemente a ser actualizada. Todos estes dados foram meticulosamente conferidos com as fichas de identificação de cada amostra e posteriormente introduzidos na base de dados. Esta base de dados permite seleccionar de uma forma simples os grupos que se pretende estudar, por exemplo, amostras de indivíduos com exame cultural positivo, sem infecção por VIH, no fim do tratamento (T3) e com resultado do STAT PAK II e MAPIA positivo.

4.1.2 Caracterização do grupo de indivíduos com TB latente

O conjunto de amostras de soro de pacientes com TB latente é constituído actualmente por 29 amostras. Este grupo de indivíduos está muito bem caracterizado, sendo constituído por pacientes com contacto recente com pessoa que apresentava exame directo positivo de expectoração, ausência de sintomas de TB (clínicos e radiológicos), resultados do TCT e Quantiferon positivos. A

constituição deste conjunto de amostras permitiu avaliar dois métodos de serodiagnóstico (TB STAT PAK II e MAPIA) como potenciais testes de identificação de TB latente.

A distribuição do sexo na população de indivíduos com TB latente estudada era 41% de indivíduos do sexo masculino e 59% do sexo feminino (Figura 11). A distribuição por idades da amostra estudada indica que o grupo de indivíduos com maior frequência de TB latente se situa entre os 25 e os 55 anos (Figura 12), tal como observado na amostra de pacientes com TB activa.

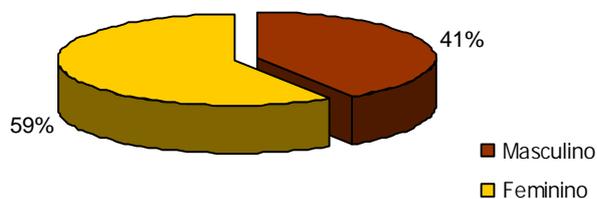


Figura 11. Distribuição do sexo na amostra de indivíduos com TB latente.

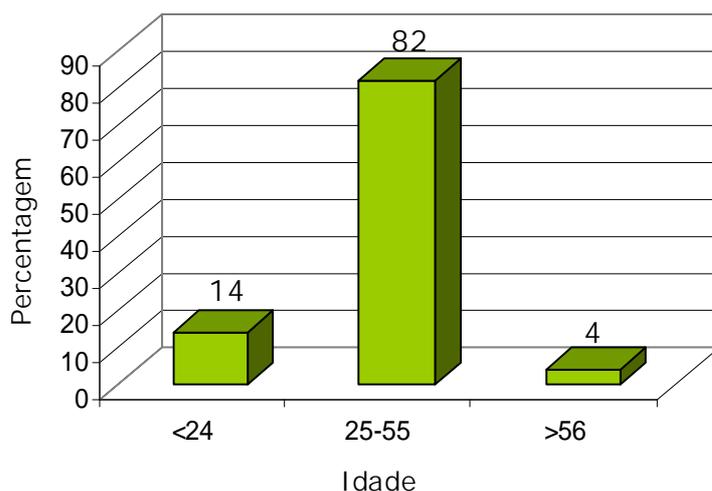


Figura 12. Distribuição da idade na amostra de indivíduos com TB latente.

4.2 Resultados do STAT PAK II e MAPIA

4.2.1 Especificidade dos testes de serodiagnóstico

Em estudos anteriormente realizados, e estudando o grupo de indivíduos saudáveis (controlo negativo), verificou-se que nenhuma amostra foi positiva para o teste TB STAT PAK II e apenas 2 apresentaram resultado positivo para o teste de MAPIA (Figura 13). Obteve-se assim, uma especificidade de 100% para o teste TB STAT PAK II e de 94% para o teste de MAPIA (Afonso, 2007).

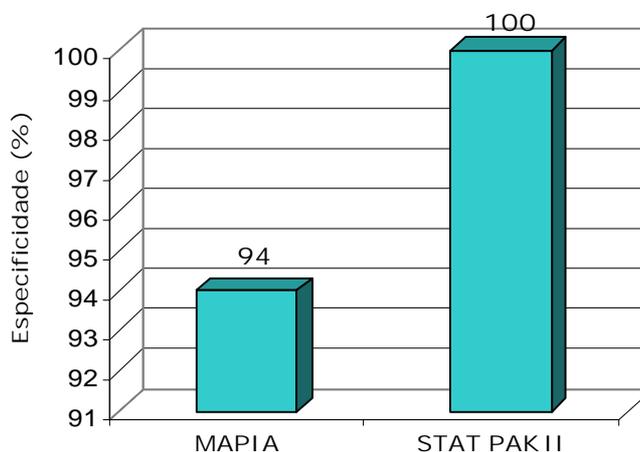


Figura 13. Especificidade dos métodos TB STAT PAK II e MAPIA

De modo a avaliar a especificidade do método TB STAT PAK II e comparar os resultados com os obtidos no grupo de indivíduos saudáveis (controlo negativo) foi constituído um conjunto de amostras de soro de indivíduos com patologia pulmonar mas sem TB, que actualmente é constituído por 30 amostras.

Este grupo de amostras está muito bem caracterizado, sendo constituído por indivíduos que possuem informação clínica clara da não existência de TB no presente nem história de TB no passado e presença de outra doença pulmonar.

Após a análise dos resultados, verifica-se que apenas duas amostras (7%) apresentaram resultado positivo para o teste TB STAT PAK II, sendo as restantes negativas. Obteve-se assim uma especificidade de 93% para este método de serodiagnóstico (Figura 14).

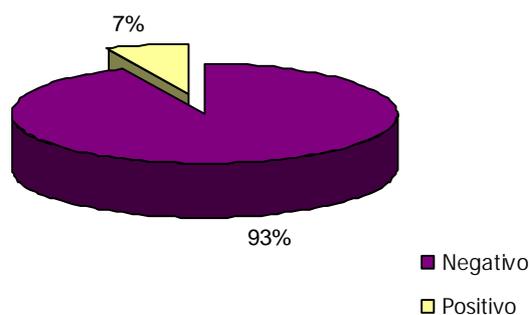


Figura 14. Especificidade do método TB STAT PAK II no grupo de indivíduos com patologia pulmonar (sem TB).

Quando comparados os resultados deste novo grupo com os indivíduos saudáveis verifica-se que a especificidade do método TB STAT PAK II diminui, ou seja, nos indivíduos saudáveis a especificidade é de 100% enquanto que nos indivíduos com patologia pulmonar (sem TB) é de 93% (Figura 15).

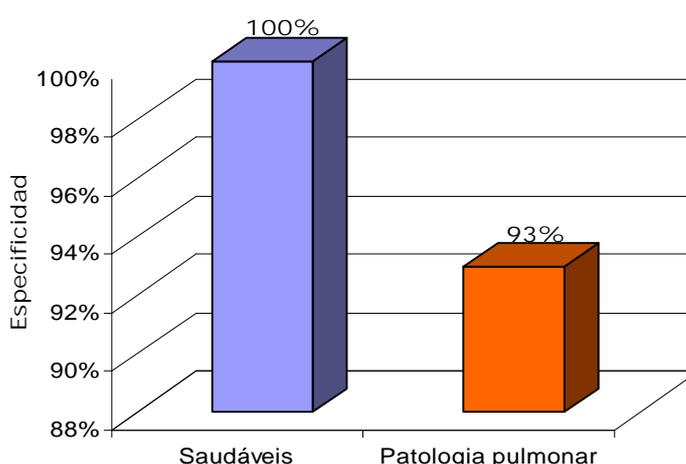


Figura 15. Especificidade do método TB STAT PAK II no grupo de indivíduos saudáveis e com patologia pulmonar (sem TB)

4.2.2 Sensibilidade dos métodos de serodiagnóstico em indivíduos com TB e sem infecção VIH

No grupo de indivíduos com TB activa, sem infecção VIH e sem tratamento ou com menos de 15 dias de terapia anti-bacilar (T0), num total de 43 amostras, 16 amostras foram positivas no teste TB STAT PAK II, apresentando este teste uma sensibilidade de 37%. Relativamente ao método MAPIA, ainda neste grupo de indivíduos, num total de 37 amostras, 20 amostras apresentaram reactividade com os antígenos de MAPIA, tendo-se obtido uma sensibilidade de 54% para este teste (figura 16).

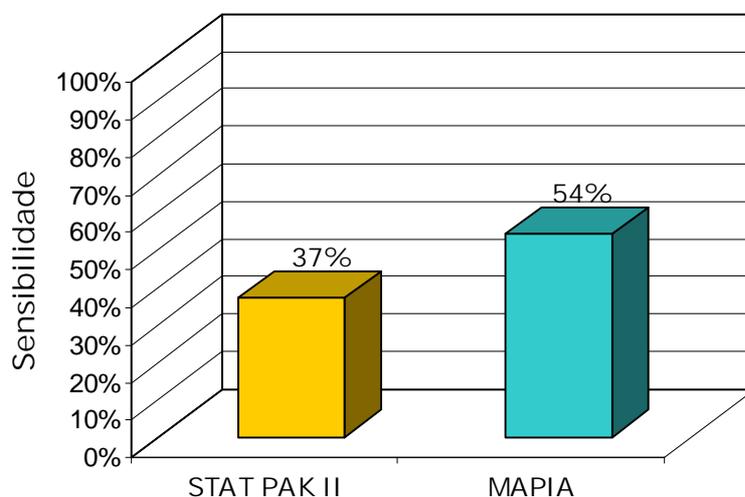


Figura 16. Sensibilidade do teste TB STAT PAK II e MAPIA em indivíduos sem infecção VIH e sem tratamento ou que iniciaram à menos de 15 dias (T0).

4.2.3 Sensibilidade dos métodos de serodiagnóstico em indivíduos com co-infecção TB-VIH

Em estudos anteriormente realizados, verificou-se no grupo de indivíduos com co-infecção TB-VIH, sem tratamento ou em início de tratamento (T0), a sensibilidade

do STAT PAK II é mais baixa em relação ao grupo sem infecção VIH. Em 25 amostras estudadas, 20 apresentaram resultado negativo nos dois testes, e apenas uma amostra apresentou resultado positivo em ambos os métodos. registando-se uma sensibilidade de apenas 16% para o teste TB STAT PAK II e 8% para o método MAPIA (Afonso, 2007) (figura 17).

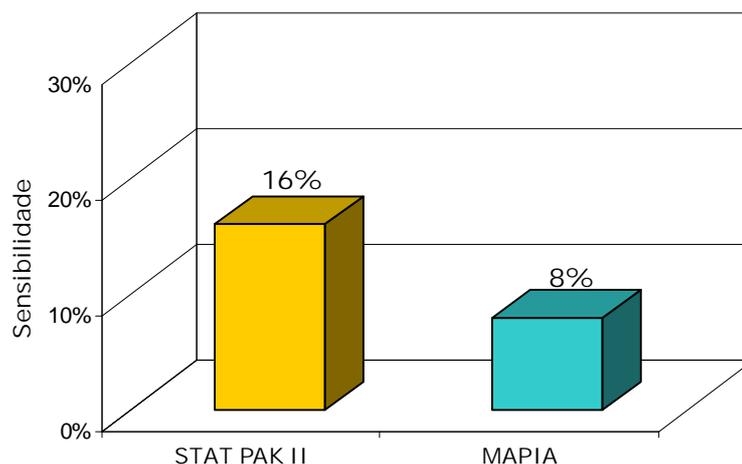


Figura 17. Sensibilidade do teste TB STAT PAK II e MAPIA em indivíduos com co-infecção VIH e sem tratamento ou que iniciaram à menos de 15 dias (T0).

4.2.4 Sensibilidade do método STAT PAK II ao longo do tratamento

No grupo de indivíduos sem infecção por VIH e com TB confirmada, a sensibilidade mostrou-se diferente consoante o período de tratamento anti-bacilar. Tal como pode ser observado na figura 18, em indivíduos sem tratamento ou que iniciaram à menos de 15 dias (T0) a sensibilidade foi de 37%, aumentando para 58% e 55% para indivíduos com terapia anti-bacilar ≥ 16 dias e ≤ 3 meses (T1) e em final de tratamento (T3), respectivamente. Comparando a sensibilidade do teste TB STAT PAK II nas três fases de tratamento anti-bacilar, observou-se que a sensibilidade é muito baixa em início do tratamento, mas aumenta nas fases mais avançadas de terapia anti-bacilar.

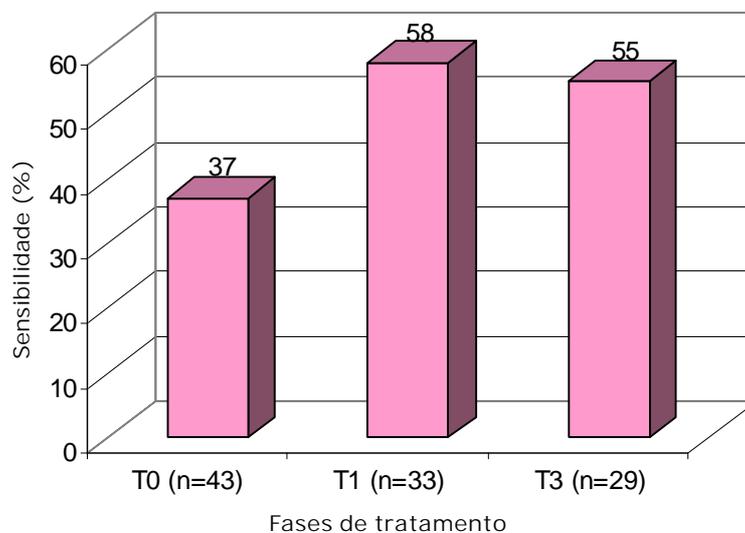


Figura 18. Sensibilidade do teste TB STAT PAK II em diferentes fases de tratamento

4.2.5 Sensibilidade do método STAT PAK II em indivíduos com TB latente

Num total de 29 amostras, apenas 4 (14%) apresentaram resultado positivo no teste TB STAT PAK II, tendo as restantes um resultado negativo. No teste de MAPIA todas as amostras apresentaram um resultado negativo (100%). (Figura 19).

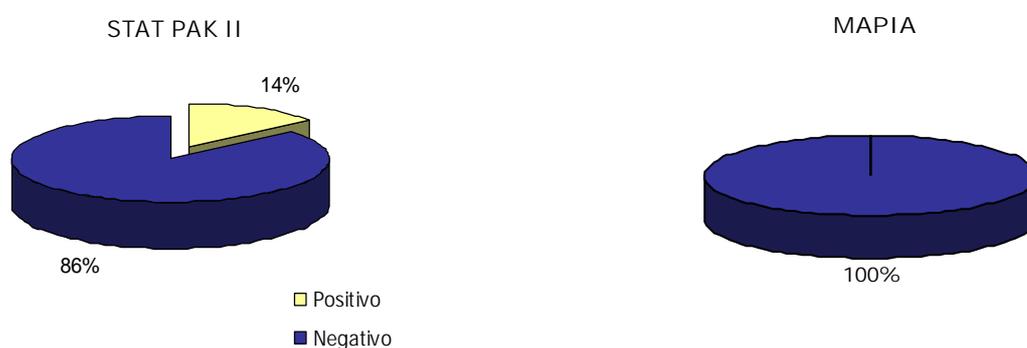


Figura 19. Resultados do TB STAT PAK II e MAPIA na amostra de indivíduos com TB latente

4.3 Detecção de bactérias do complexo *M. tuberculosis* em tecidos humanos: timo, pulmão e baço

Actualmente existem 121 amostras de tecidos humanos (timo, pulmão e baço) oriundas de 66 cadáveres (tabela 11).

Tabela 11. Banco de amostras de tecidos humanos.

	n.º amostras
Timo	63
Pulmão	29
Baço	29
Total	121

A distribuição do sexo na amostra de cadáveres estudados apresenta uma taxa de 74% de indivíduos do sexo masculino e 26% do sexo feminino (Figura 20). A distribuição etária desta amostra em três grupos de idade indica que o grupo com maior número de amostras se situa entre os 25 e 55 anos (Figura 21). Existem 12 amostras de tecido humano que não possuem informações acerca da idade, sexo e causa de morte.

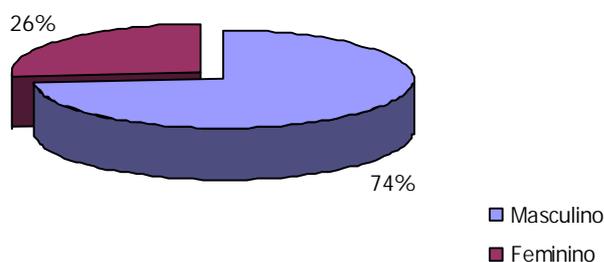


Figura 20. Distribuição do sexo na amostra de cadáveres

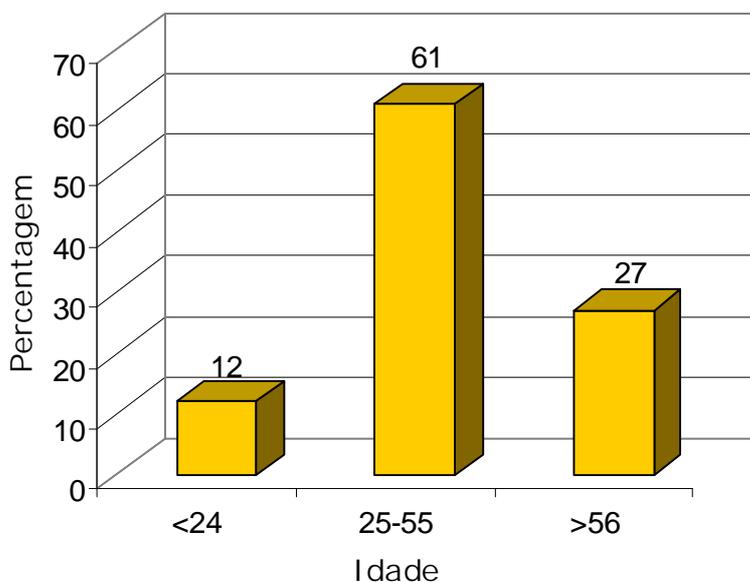


Figura 21. Distribuição da idade na amostra de cadáveres

Analisando a informação acerca dos cadáveres relativamente à causa de morte, verifica-se que “morte natural” é a causa mais frequente representando 59% dos casos. A causa de morte menos frequente na nossa amostra é o “suicídio” (7%) (Figura 22).

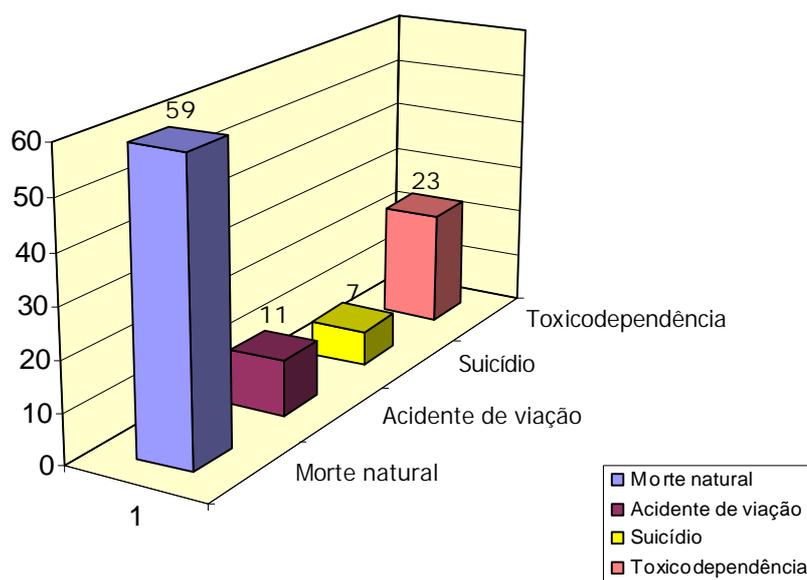


Figura 22. Causa de morte na amostra de cadáveres

Todas as amostras foram testadas com o PCR para os genes IS6110 e 18s rRNA. Quanto ao PCR 18s rRNA todas as amostras apresentaram resultado positivo, o que significa que possuem DNA humano com qualidade suficiente para ser amplificado por PCR (Figura 23).

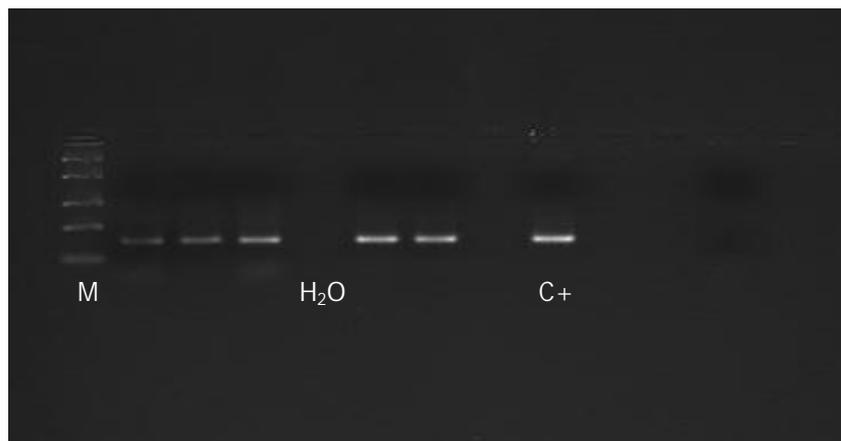


Figura 23. Exemplo de um gel do PCR 18s rRNA em DNA de tecidos humanos
M – Marcador de peso molecular; H₂O - Controlo negativo; C+ – Controlo positivo

Na pesquisa de micobactérias nos tecidos pelo PCR IS6110, todas as amostras apresentaram resultado negativo (Figura 24).

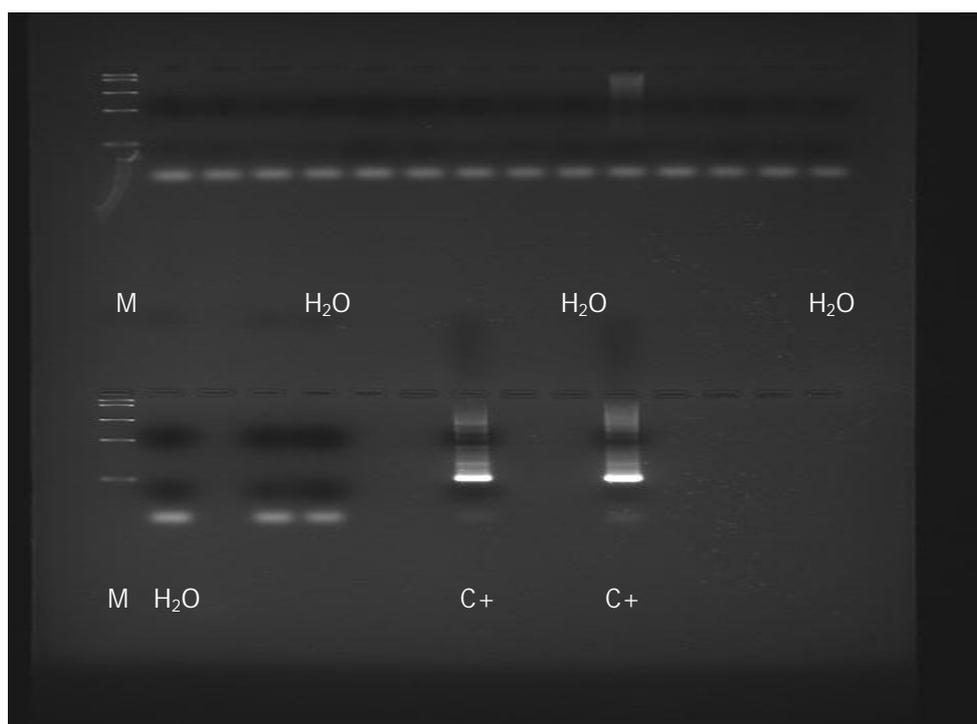


Figura 24. Exemplo de um gel do PCR IS6110 em DNA de tecidos humanos
M – Marcador de peso molecular; H₂O - Controlo negativo; C+ – Controlo positivo

Foram ainda observados cortes histológicos dos tecidos corados pelas colorações de Ziehl Neelsen e Hematoxilina-eosina, nas ampliações 40x, 200x e 1000x. Como controlo positivo da coloração de Ziehl Neelsen, para cada conjunto de cortes foi corada também uma lâmina com corte histológico de pulmão de murganho experimentalmente infectado com *M. avium*. Nas lâminas observadas não se observou a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (Figura 25). A coloração de Hematoxilina-eosina foi efectuada com o objectivo de observar o tecido.

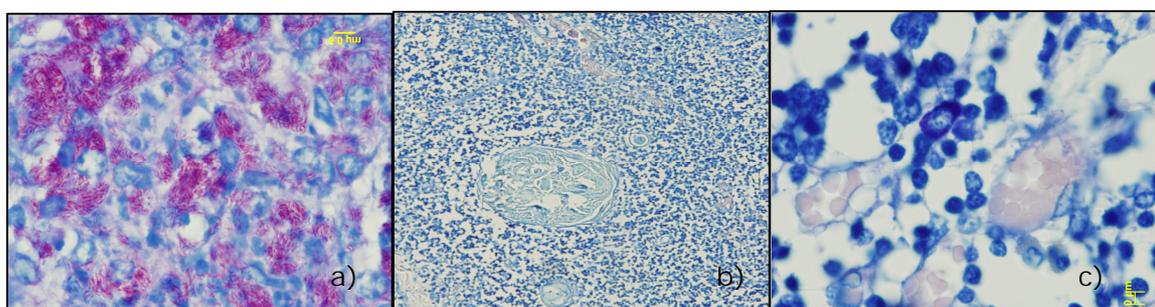


Figura 25. Cortes histológicos corados pela coloração de Ziehl Neelsen
a) Controlo positivo (1000x); b) Timo (100x); c) Timo (1000x)

5. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho surgiu no seguimento de um outro, no qual tive a oportunidade de colaborar, de forma a completar a avaliação dos métodos de serodiagnóstico TB STAT PAK II e MAPIA, no diagnóstico de TB em Portugal.

Os resultados dos grupos de doentes com TB activa, permitiram determinar a sensibilidade dos métodos de serodiagnóstico em cada situação de doença específica, nomeadamente na evolução da terapia anti-bacilar e na co-infecção TB-VIH. Relativamente aos indivíduos com infecção VIH, em estudos anteriores (Afonso, 2007) verificou-se que estes testes parecem não ser úteis no diagnóstico de TB uma vez que a sensibilidade é de apenas 16% no método TB STAT PAK II e de 8% no método MAPIA (figura 17).

Neste trabalho foram avaliados dois novos grupos: indivíduos com TB latente e indivíduos com uma patologia pulmonar mas sem TB. Os resultados do método TB STAT PAK II no grupo de indivíduos com uma patologia pulmonar permitiram reavaliar a especificidade deste teste.

5.1 Continuação da constituição do banco de soros de indivíduos com TB activa e controlos

Em trabalhos realizados anteriormente (Afonso, 2007), iniciou-se a constituição de um banco de amostras de soro e plasma de indivíduos com TB em diferentes fases de tratamento, assim como de indivíduos saudáveis (controlo negativo) e com TB no passado. Um dos objectivos deste trabalho foi a continuação da constituição do banco de amostras de indivíduos com TB activa em diferentes fases de tratamento, assim como a constituição de um novo grupo controlo (indivíduos com patologia pulmonar mas sem TB). A constituição deste novo grupo de amostras tornou-se bastante importante na medida que permitirá avaliar

se existe alguma possibilidade de ocorrência de resultados falsos positivos no método TB STAT PAK II, uma vez que na população de indivíduos saudáveis em Portugal, este teste apresentou todos os resultados negativos, ou seja, uma especificidade de 100% (Figura 13). Fazem ainda parte do banco algumas amostras de soro de indivíduos com TB no passado. De futuro pretende-se aumentar o número destas amostras pois a avaliação deste grupo pode ser importante para determinar a possibilidade da ocorrência de falsos positivos dos métodos de serodiagnóstico em pessoas com história prévia de TB tratada e curada. É de salientar o cuidado no armazenamento das amostras em várias alíquotas que tem por objectivo evitar o descongelamento da totalidade da amostra em cada utilização e também permitir manter um conjunto de amostras em arcas congeladoras distintas. Para todas as amostras do banco foi elaborado um mapa para conhecimento da localização exacta de cada amostra nas arcas congeladoras.

Com todos estes grupos de amostras muito bem definidas e caracterizadas, pretende-se de futuro ter as condições para avaliar rapidamente novos métodos de serodiagnóstico de forma a ajudar no rápido diagnóstico de TB. Neste contexto, algumas amostras do banco foram solicitadas por um grupo de investigação na Dinamarca (Statens Serum Institute) para serem testadas com novos antigénios de *M. tuberculosis*. Foram enviados 200 µl de soro de 72 amostras do banco de grupos definidos: TB activa sem co-infecção VIH, TB activa com co-infecção por VIH e ainda TB latente. A correspondência de cada amostra ao seu grupo não foi facultada. Os investigadores enviarão o resultado de cada amostra que foi testada com dois novos antigénios por ELISA. A correspondência entre os resultados e grupos, assim como a sua interpretação será entretanto feita por nós.

Reavaliação da especificidade do método TB STAT PAK II tendo em conta o grupo de pacientes com patologia pulmonar mas sem TB

Como já foi referido anteriormente, a constituição deste novo grupo foi fundamental para a reavaliação da especificidade do método TB STAT PAK II pois permitiu investigar se outras patologias pulmonares originam um resultado falso positivo no teste, para o qual os 32 indivíduos saudáveis foram todos negativos. Quando comparados os resultados do método TB STAT PAK II no grupo de indivíduos saudáveis com os indivíduos com patologia pulmonar mas sem TB, verificou-se que a especificidade diminuiu de 100% para 93% respectivamente (Figura 15). Estes resultados vão ao encontro de outros trabalhos de serodiagnóstico desenvolvidos; pois numa meta-análise recente sobre testes comerciais de serodiagnóstico, Steingart e colaboradores (Steingart et al., 2007) verificaram que a especificidade destes testes diminui quando se utiliza um grupo controlo de doentes com patologia pulmonar e ausência de TB relativamente ao grupo de controlo de saudáveis. Este facto pode ser explicado por ligações inespecíficas dos anticorpos presentes nestes indivíduos a antigénios específicos da TB dando origem a resultados falsos positivos. Neste momento ainda estão a ser efectuadas colheitas a este grupo para que no futuro se possa alargar a população estudada e também pretende-se efectuar o TCT e Quantiferon a todos os indivíduos, ou seja, é essencial saber se estes dois indivíduos são potenciais latentes para TB. Se for o caso, considera-se que a especificidade do teste mantém-se nos 100%, caso não sejam, então tem que se considerar a possibilidade real de ocorrência de resultados falsos positivos.

Avaliação do método TB STAT PAK II ao longo do tratamento anti-bacilar

Como referido anteriormente, os métodos de serodiagnóstico de TB imunocromáticos possuem múltiplas vantagens, nomeadamente são métodos simples, rápidos, sem necessidade de recorrer a equipamento específico e fáceis

de interpretar o que os torna bastante atractivos para os centros de diagnóstico em Portugal. Avaliando a sensibilidade do método TB STAT PAK II ao longo do tratamento anti-bacilar verifica-se que este teste apresenta uma baixa sensibilidade em início de tratamento (37%). Numa primeira fase de tratamento anti-bacilar -T1 (≥ 16 dias e ≤ 3 meses) o teste TB STAT PAK II apresenta melhor sensibilidade (58%) (Figura 18), o que pode ser útil na avaliação da terapia anti-bacilar, dando ao clínico uma maior certeza no diagnóstico efectuado em situações com resultados bacteriológicos negativos. De futuro e com a crescente constituição do banco de soros, será importante aumentar o número de amostras de indivíduos que ainda não iniciaram tratamento para poder, de forma mais clara, comparar estes com indivíduos em fases iniciais de tratamento. Pretende-se também dividir o grupo T1 (≥ 16 dias e ≤ 3 meses) em dois, um grupo de amostras de indivíduos até 1 mês de tratamento e outro com tratamento anti-bacilar ≥ 1 mês e ≤ 3 meses, de forma a verificar com precisão em que fase de tratamento o método TB STAT PAK II é mais sensível e de que forma o resultado obtido em T0 (tratamento ≤ 15 dias) se mantém se forem apenas estudados indivíduos sem tratamento.

5.2 Avaliação de dois testes de serodiagnóstico na TB latente

A constituição do grupo de indivíduos com TB latente foi fundamental, pois além destes constituírem um grupo de risco que é importante avaliar, a sua identificação e aplicação de um tratamento profiláctico precoce pode evitar a evolução de uma infecção latente para TB activa. Com este trabalho pretendeu-se conhecer o comportamento da resposta humoral na infecção latente e conforme os resultados obtidos, era objectivo deste trabalho, determinar a utilidade dos métodos de serodiagnóstico no diagnóstico de TB latente.

Actualmente o TCT continua a ser considerado indispensável na avaliação de TB latente. Os testes baseados na detecção da produção de INF- γ (Quantiferon) têm sido avaliados em Portugal e os resultados destes métodos parecem ser

especialmente úteis na detecção de indivíduos com TB latente (Raquel Duarte, comunicação pessoal de dados ainda não publicados). Mas este teste apresenta, no entanto, algumas desvantagens relativamente ao TCT, nomeadamente o facto de exigir condições laboratoriais nem sempre possíveis nos centros de diagnóstico de TB em Portugal, exigindo também a formação adequada dos técnicos responsáveis pelo diagnóstico para a realização deste método. Assim surge a necessidade de conhecer a aplicabilidade dos métodos de serodiagnóstico no diagnóstico da TB latente em Portugal tendo em conta as vantagens destes métodos referidas anteriormente, nomeadamente a fácil execução e rapidez nos resultados.

A condição de TB latente no nosso trabalho é definida por um TCT positivo, em indivíduos assintomáticos que foram expostos ao *M. tuberculosis* (por contacto recente com paciente bacilífero) mas que não apresentam sintomas nem sinais radiológicos característicos da TB activa (Lalvani et al., 2007). Mas clinicamente existem duas formas da doença que são muito difíceis de distinguir, ou seja, quando a exposição ao *M. tuberculosis* foi recente (também denominada como TB infecção) ou quando a exposição aconteceu em momento anterior não determinado e se a bactéria se mantém no indivíduo por muito tempo sem originar sintomas, ou seja, sem resultar em TB activa (verdadeiramente TB latente). Devido a esta dificuldade, a definição do nosso grupo de indivíduos com TB latente foi definida como indivíduos recentemente expostos a doentes infectados por *M. tuberculosis* (uma vez que a exposição recente a um paciente bacilífero oferece uma maior segurança para a definição de TB latente) e com TCT e Quantiferon positivos, pois é o único grupo de infecção sem sintomas que conseguimos ter segurança suficiente para o definir.

A avaliação dos resultados obtidos nos testes de TB STAT PAK II e MAPIA permitem concluir que estes tipo de métodos de serodiagnóstico não se adequam ao diagnóstico da TB latente, uma vez que no TB STAT PAK II apenas 14% dos indivíduos apresentam um teste positivo e no MAPIA todos os resultados foram

negativos (Figura 19). Todos os indivíduos deste grupo possuem o TCT e Quantiferon positivos. Como referido anteriormente, a prova da tuberculina induz uma reacção de hipersensibilidade retardada reflectindo uma resposta de memória enquanto que o Quantiferon detecta a libertação de INF- γ in vitro após estimulação de linfócitos T, ou seja, ambos os testes pesquisam a existência de uma população de células T previamente estimulada com *M. tuberculosis*. Nos testes de serodiagnóstico utilizados, explora-se a indução da resposta humoral, ou seja, produção pelos linfócitos B de anticorpos específicos de TB. Esta diferença pode explicar os resultados obtidos pois no teste Quantiferon é necessária uma prévia estimulação dos linfócitos T a produzirem INF- γ (estimulação in vitro) para posteriormente ser detectada a resposta, ou seja, existe neste caso uma “amplificação” da resposta celular a ser quantificada, o mesmo se poderá dizer para o TCT pois há uma estimulação das células in vivo. Este facto não se verifica nos testes serológicos utilizados, ou seja, não existe uma estimulação prévia dos possíveis anticorpos presentes na amostra, o que pode condicionar os resultados. Por um lado, a quantidade de anticorpos neste tipo de infecção parecer ser também muito pequena. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que referem que na TB latente parece verificar-se uma carga bacteriana muito baixa o que induz uma resposta humoral bastante fraca (Lalvani et al., 2007). Este facto torna a pesquisa de anticorpos específicos de antígenos de *M. tuberculosis* por estes métodos inadequada para o diagnóstico de TB latente.

Apesar de se constatar que os métodos de serodiagnóstico não servem para o diagnóstico de TB latente, estes resultados revestem-se de grande importância na medida em que como se verificou uma elevada percentagem de resultados negativos, a utilidade destes testes no diagnóstico de TB activa parece reforçada uma vez que um resultado positivo raramente se deve a uma infecção latente. Neste sentido, os testes de serodiagnóstico podem ajudar à distinção entre TB activa e TB latente. Seria interessante num estudo futuro avaliar se nestas circunstâncias a sensibilidade dos testes de serodiagnóstico também aumenta com o tratamento anti-bacilar administrado a pacientes com TB latente.

5.3 Pesquisa de micobactérias nos tecidos humanos

Como referido na Introdução, a forma mais comum de TB é pulmonar, contudo a infecção pode também afectar uma grande variedade de tecidos (Pina, 2000; American Thoracic Society, 2000; WHO, 2005). Situações de TB extrapulmonar estão associadas à capacidade das micobactérias de disseminarem do órgão que representa a porta de entrada do microrganismo (geralmente as vias respiratórias/pulmão) para outras zonas do corpo, incluindo órgãos do sistema imune tais como, nódulos linfáticos, timo e baço e outros como ossos, articulações, meninges, pleura, etc. . A escolha dos órgãos para o nosso estudo (pulmão, timo e baço) teve por base o facto do pulmão por ser o órgão onde mais frequentemente se encontra *M. tuberculosis* e o baço por ser um local central de resposta imunitária e de onde as micobactérias podem facilmente disseminar para outro locais do organismo. É ainda de referir que em modelos animais de tuberculose, em que os murganhos são infectados através da inalação de aerossóis contendo *M. tuberculosis*, poucos dias após a infecção do pulmão são encontradas bactérias nos gânglios linfáticos que drenam o pulmão e poucos dias mais tarde no baço.

Resultados recentes, também utilizando murganhos, (Nóbrega et al., 2007) mostraram que o timo é frequentemente um órgão alvo de disseminação de micobactérias após infecção tanto por aerossóis como por via endovenosa. Nos humanos, a presença de micobactérias no timo foi descrita num número limitado de publicações (Simmers et al., 1997; Stephen et al., 2003; Sacco et al., 2004; Saieg et al., 2007). Não se sabe se este pequeno número de relatos se deve ao facto de ser uma situação rara ou se, por a infecção deste órgão não ter sintomas associados, não ser frequentemente pesquisada. Sendo o timo responsável pela produção de linfócitos T, essenciais a uma resposta imunitária eficaz contra infecções por micobactérias, torna-se extremamente importante compreender se no caso do Homem, o timo também é um local frequente de disseminação de *M. tuberculosis* tal como encontrado em modelo murino ou se pelo contrário, se trata

de uma situação rara. Aliados a este facto, dados não publicados também em modelo murino, demonstraram resistência das micobactérias aos antibióticos no timo, existindo também um relato em humanos que traduz o mesmo. Neyrolles e colaboradores (Neyrolles et al., 2006) sugerem que o tecido adiposo possa ser um local preferencial de latência das micobactérias, e sendo o timo constituído no Homem adulto em grande quantidade por tecido adiposo, torna a pesquisa de micobactérias neste órgão ainda mais relevante.

A população escolhida ou seja, cadáveres da zona do Porto, foi tida em consideração uma vez que a cidade do Porto é a cidade de Portugal com maior incidência de novos casos de TB. Foram efectuadas lâminas coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina para todos os tecidos modo a comprovar a identificação do órgão assim como a integridade do tecido a analisar. Neste trabalho não se evidenciou a presença de micobactérias nas amostras de tecidos testadas com PCR com primers específicos para as micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Este facto pode dever-se a factores, tais como, a pequena quantidade de amostra analisada por órgão, o número total de amostras testadas ser pequeno ou realmente ser rara a presença de bactérias nestes tecidos de indivíduos que não se encontravam com TB activa. De futuro, e com a continuação da constituição deste banco de amostras de tecidos humanos, pretende-se testar as técnicas já usadas ou outro tipo de tecnologia, nomeadamente PCR em tempo real ou hibridização in situ (teste rápido para detecção de micobactérias em cultura e tecidos, permite a observação directa da distribuição e morfologia bacteriana nos tecidos). Seria ainda mais interessante, testar em pessoas que no momento da morte se sabia que tinham TB activa. No entanto, esta é uma situação muito rara, pois em Portugal não se fazem autópsias de pessoas para as quais a causa de morte é conhecida. Acresce a este facto, que sendo a TB uma doença de contágio por aerossóis, só em situações muito particulares é que se realizam a autópsia de pessoas que morressem com TB activa.

Está em curso uma colaboração com o Instituto de Medicina Molecular de Lisboa, para o envio de novas amostras de timo, mas de crianças vacinadas com BCG. De futuro pretende-se verificar a presença destas micobactérias no timo.

6. CONCLUSÃO

Com a continuação da constituição do banco de amostras, foi possível criar dois novos grupos de amostras: um grupo com TB latente e outro grupo de indivíduos com patologia pulmonar mas sem TB. Estes dois novos grupos foram fundamentais para completar a avaliação dos métodos de serodiagnóstico como complemento ao diagnóstico de TB. O grupo de indivíduos com TB latente foi avaliado com dois métodos de serodiagnóstico (TB STAT PAK II e MAPIA). Após avaliação do grupo, pode-se concluir que estes testes de diagnóstico não são úteis na detecção da TB latente. No entanto estes resultados foram importantes, pois se no futuro estes testes forem utilizados para diagnóstico de TB activa, a presença da infecção latente terá pouca interferência nos resultados. Relativamente ao grupo com patologia pulmonar mas sem TB, verifica-se um decréscimo da especificidade do método TB STAT PAK II relativamente ao grupo de indivíduos saudáveis, o que permite considerar a possibilidade (embora pequena) da ocorrência de resultados falsos positivos nestes indivíduos.

Quanto à sensibilidade dos testes de serodiagnóstico em estudo, podemos concluir que os métodos TB STAT PAK II e MAPIA avaliados, não têm interesse nos casos de co-infecção TB-VIH devido à muito baixa sensibilidade apresentada. No entanto, o teste rápido TB STAT PAK II uma vez que é rápido e simples de efectuar e interpretar, para os casos de TB sem infecção por VIH, este método pode ser particularmente útil no diagnóstico precoce de infeção, acompanhado do resultado do exame directo.

Com este trabalho, e com o constante crescimento do banco de amostras foi ainda possível determinar que sensibilidade do teste TB STAT PAK II aumenta ao longo do tratamento anti-bacilar. Este facto pode dar uma maior segurança de diagnóstico ao clínico contribuindo desta forma para a decisão de tratamento numa fase precoce da infecção, enquanto se aguardam os resultados da cultura.

O constante crescimento do banco também permite que no futuro as amostras possam ser usadas em novos estudos de diagnóstico de TB.

Iniciou-se ainda um banco de amostras de tecido humano, que apesar de ter originado resultados negativos no presente estudo, no futuro poderá ser utilizado com outras técnicas, procurando aumentar a sensibilidade da pesquisa de micobactérias.

Como conclusão final, no âmbito da minha actividade como Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública, este trabalho contribuiu muito para o enriquecimento da minha formação profissional, pois tive a oportunidade de executar novas metodologias, nomeadamente a observação microscópica de tecidos, PCR "caseiro" associado a todos os passos da optimização deste, técnicas de serodiagnóstico e elaboração de um banco de amostras biológicas associado à base de dados que o acompanha. A contínua pesquisa na literatura sobre o diagnóstico de TB ao longo de vários meses, também me proporcionou ter actualmente uma opinião mais crítica sobre novos métodos de diagnóstico de TB e a sua importância clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso A. Métodos de serodiagnóstico como complemento ao diagnóstico de tuberculose em Portugal. Universidade da Beira Interior, 2007.

American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection: joint statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2000.161:S221–S247.

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000; 356(9235): 1099–104.

Bangs Laboratories Immunochromatographic lateral: How or strip tests development ideas. Fonte: http://www.pall.com/34445_4154.asp#4166 acessado 16 Junho 2008.

Bates MN, Khalakdina A, Pai M, Chang L, Lessa F, Smith KR. Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007; 167(4): 335–42.

Berkel GM, Cobelens FG, de Vries G, Draayer-Jansen IW, Borgdorff MW. Tuberculin skin test: estimation of positive and negative predictive values from routine data. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, 9:310-316.

Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance 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*. 2001, 5:462–467.

Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of Tuberculin Skin Test and New Specific Blood Test in Tuberculosis Contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, Vol 170. pp 65–69.

Centers 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. *MMWR*. 2005; 54(RR-15): 1–48.

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

Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, Pathan AA, Ewer K, Ayles H. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *AIDS* 2002; 16:2285–93.

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

Circular Informativa Direcção Geral da Saúde, nº6/DT, 23/02/07

Cobelens FG. Tuberculosis risks for health care workers in Africa. *Clin Infect Dis*. 2007;44 (3): 324–6.

D'Alessandro A, Waard JH. Evaluación de dos pruebas comerciales para el serodiagnóstico de la tuberculosis pulmonar. *Rev Chil Infect* 2008; 25 (1): 37-40.

DGS Tuberculose: Ponto da Situação em Portugal em 2006, dados preliminares em Março de 2007.

Diel R, Ernst M, Doscher G. Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting MTB infection with a blood test. *Eur Respir J*. 2006; 28:16–23.

Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive Value of a Whole-blood IFN- γ Assay for the Development of Active TB Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008.

Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, Drobniewski F, Lalvani A. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technology Assessment* 2007; Vol. 11: No. 3.

Duarte R, Amado J, Lucas H, Sapage JM, Tratamento da tuberculose latente: revisão das normas. *Revista Portuguesa Pneumologia* 2007; XIII (3): 397-418.

Dye C, Scheele S, Dolin R, Pathania G, Raviglione M. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999, 282:677–686.

Ewer K, Millington KA, Deeks JJ, Alvarez L, Bryant G, Lalvani A. Dynamic antigen-specific T-cell responses after pointsource exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174(7):831–9.

Ferrara G, Losi M, D'Amico R. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 2006; 367:1328 –34.

Flynn J, Chan J. Tuberculosis: Latency and Reactivation, *Infection and Immunity*, 2001, p. 4195–4201 Vol. 69, No. 7.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey & Scott's. *Diagnostic Microbiology*, Eleventh edition, 2002.

Hale YM, Pfyffer GE, Salfinger M. Laboratory Diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clinical Infections Diseases*, September 2001; 33:834-46.

Hannan MM, Peres H, Maltez F, Hayward AC, Machado J, Morgado A, Proença R, Nelson MR, Bico J, Young DB, Gazzard BS. Investigation and control of a large outbreak of multi-drug resistant tuberculosis at a central Lisbon hospital. *Journal of Hospital Infection*, Volume 47, Issue 2, 2001, p 91-97.

Hill PC, Brookes RH, Fox A, Longitudinal Assessment of an ELISPOT Test for *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *PLoS Med*. 2007; 4(6):e192.

Horsburgh CR Jr. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States, *Engl J Med.*, 2004;350(20):2060–7.

Houghton RL, Lodes MJ, Dillon DC, Reynolds LD, Day CH, McNeill PD, Hendrickson RC, Skeiky YAW, Sampaio DP, Badaro R, Lyashchenko KP, Reed SG. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9(4): 883-891

Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. *Clinical Infection Disease*, 1993, 17:968-75.

Jackson L, M.Sc YW., Stephen LTH, Chi-Sing, Path N, Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Diagnostic Molecular Pathology* 2000, Vol. 9 (2), 67-74.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologists' toolbox. *Immunobiology, the immune system in health and disease*. 6th edition. New York: Garland Science Publishing 2005. pp. 683–729.

Júlian E, Matas L, Alcaide J, Luquin M. Comparison of antibody response to a potential combination of specific glycolipids and proteins for test sensitivity improvement I tuberculosis serodiagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2004; 11(1): 70-76.

Kang YA, Lee HW, Yoon HO, Cho B, Koo HS, Young-Soo S. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon assay for the diagnosis of latent tuberculosis infections in an indeterminate tuberculosis burden country. *JAMA* 2005; 293: 2571-2761.

Keane J. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology*. (Oxford) 2005; 44 (6): 714–20.

Lalvani A, Brookes R, Wilkinson R. Human cytolytic and interferon gamma secreting CD81T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 270-5.

Lalvani A, Nagvenkar P, Udwadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, Ewer K, Hill AV, Mehta A, Rodrigues C: Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 2001 a, 183:469-477.

Lalvani A, Pathan AA, Durkan H. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001; 357(9273):2017–21.

Lalvani A, Pathan AA, Mcshane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infections by enumeration of antigen-specific T-cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001 b; 163: 824-828.

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

Lee E, Holzman RS. Evolution and current use of the tuberculin test. *Clin Infect Dis* 2002; 34:365–70.

Lee JY, Choi HJ, Park I-N, Hong S-B, OH Y-M, LIM C-M. Comparison of two commercial interferon assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J* 2006; 28: 24-30.

Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression; *Plos One* Feb 2008, Issue 2, 1536.

Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al-Jahdali H, Menzies D, Gennaro ML, Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect. Immun*, 1998, 66:3936–3940.

Mahomed H, Hughes EJ, Hawkrigde T, Minnies D, Simon E, Little F, Hanekom WA, Geiter L, Hussey GD: Comparison of mantoux skin test with three generations of a whole blood IFN gamma assay for tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006, 10:310-316.

Manabe YC, Bishai WR. Latent *Mycobacterium tuberculosis* – persistence patience and winning by waiting. *Nature Med* 2000, Vol. 6, 1436-1439.

Marchetti G, Catozzi L. Evaluation of PCR in Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Formali-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues: Comparison of four amplification assays. *Journal of Clinical Microbiology*, June 1998.

Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: New test for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med* 2007; 146: 340-354.

Moran-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick DM, FitzGerald JM. Tuberculin skin test size and risk of tuberculosis development: a large population-based study in contacts. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11 (9):1014–20.

Mori T, Sakatan M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Okada M, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, Mazurek GH, Tsuyuguchi I. Specific Detection of Tuberculosis Infection An Interferon- γ -based Assay Using New Antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, Vol 170. pp 59–64.

Morrison J, Pai M, Philip CH. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis, in countries with low tuberculosis incidence. However, in countries in which the incidence of tuberculosis is high, *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 359–68.

Mukherjee P, Dutta M, Datta P, Dasgupta A, Pradhan R, Pradhan M, Kundu M, Basu J, Chakrabarti P. The RD1-encoded antigen Rv3872 of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential candidate for serodiagnosis of tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13(2): 146-152.

National Collaborating Centre for Chronic Conditions. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. Royal College of Physicians, Report editor, 2006. London.

Neyrolles O, Hernández-Pando R, Pietri-Rouxel F, Fornès P, Tailleux L, Payán J, Pivert E, Bordat Y, Aguilar D, Prévost MC, Petit C, Gicquel B. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PloS ONE*, 2006, issue 1: e43.

Nienhaus A, Schablon A, Bacle CL, Siano B, Diel R. Evaluation of the interferon-gamma release assay in healthcare workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2007.

Nobrega C, Cardona Pere-Joan , Roque S, Pinto do Ó P, Appelberg R, Correia-Neves M. The thymus as a target for mycobacterial infections *Microbes and Infection* 9, 2007, 1521 e 1529.

Oxlade O, Schwartzman K, Menzies D. Interferon-gamma release assays and TB screening in high-income countries: a cost effectiveness analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11 (1):16–26.

Pai M, Joshi R, Dogra S, Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon-gamma assay. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174 (3):349–55.

Pai M, Lewinsohn DM. Interferon-gamma assays for tuberculosis: is anergy the Achilles' heel? *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172 (5):519–21.

Pai M, McCulloch M, Enanoria W, Colford JM Jr. Systematic reviews of diagnostic test evaluations: What's behind the scenes? *ACP J Club* 2004 a, 141:A11–A13.

Pai M, Menzies D. Interferon-gamma release assays: what is their role in the diagnosis of active tuberculosis? *Clin Infect Dis.* 2007; 44(1):74–7.

Pai M, O'Brien R. Serial Testing for Tuberculosis: Can We Make Sense of T Cell Assay Conversions and Reversions? *PLoS Med.* 2007;4 (6):e208.

Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4(12):761–76.

Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis from basic science to patient care. TuberculosisTextbook.com, First Edition, 2007.

Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, van Soolingen D, Hale YM, Salfinger M. Rapid and simple approach of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. J Clin Microb 2002, 40 (7): 2339-2345.

Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, Mcshane H, Davidson RN, Pasvol G, Direct ex vivo análisis of antigen –specific IFN-•secreting CD4 T sells in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. J Immunol 2001; 167: 5217-5225.

Perfil da TB em Portugal – Dados definitivos 2006

Perkins MD, Conde MB, Martins M, Kritski AL. Serologic diagnosis of tuberculosis using a simple commercial multiantigen assay. Chest 2003, 123:107–112.

Raja A. Immunology of tuberculosis. The Indian Journal of Medical Research, 2004; 120: 213-232

Reid A, Scano F, Getahun H, Williams B, Dye C, Nunn P, De Cock K M, Hankins C, Miller B, Castro KG, Raviglione MC. Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of tuberculosis/HIV collaboration. Lancet Infect Dis 2006; 6: 483–95

Rothel JS, Andersen P. Diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: is the demise of the Mantoux test imminent?, Expert Rev Anti Infect Ther. 2005; 3(6):981–93.

Sacco O, Gambini C, Aicardi M, Silvestri M, Rossi U G, Toma P, Mattioli G, Jasonni V, Rossi G A. Thymus tuberculosis poorly responding to anti-mycobacterial therapy in a young girl with primary infection. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 2004, 232 e 236.

Saieg M, Bernardi F, Gonçalves R, Botter M, Junior S, Pozzan G. Tuberculosis of the thymus. *J Bras Pneumol.* 2007, 33 (3): 355-357.

Saint-Denis La Plaine. Test de détection de la production d'interféron gamma pour le diagnostic des infections tuberculeuses. Haute Autorité de Santé, editor. 2006, Collège de la Haute Autorité de Santé. Ref Type: Report.

Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, S Vermund HR Klein S., Walke AT, Friedland GH. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1989.320:545–550.

Selwyn PA, Sckell BM, Alcabes P, Friedland GH, Klein RS, Schoenbaum EE. High risk of active tuberculosis in HIV-infected drug users with cutaneous anergy. *JAMA* 1992; 268:504–9.

Senol G, Erer OF, Yalcin YA, Coskum M, Gündüz AT, Biçmen C, Ertas M, Ozkan SA. Humoral immune response against 38 kDa and 16 kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *European Respiratory Journal* 2007; 29: 143-148.

Silva VM, Kanaujia G, Gennaro ML, Menzies D. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2003, 7:478–484.

Simmers T A, Jie C, Sie M.C. Thymic tuberculosis: a case report, *Neth. J. Med.* 1997, 87 e 90.

Singh KK, Dong Y, Belisle JT, Harder J, Arora VK, Laal S. Antigens of Mycobacterium tuberculosis Recognized by Antibodies during Incipient, Subclinical Tuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Feb. 2005, p. 354–358.

Soini H, Musser J M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clinical Chemistry* 2001, 47:5, 808-814.

Stead WW, Lofgren JP. Does the risk of tuberculosis increase in old age? *J. Infect. Dis.* 1983, 147:951–955.

Steingart K, Henry M, Laal S, Hopewell P, Andrew R, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M. Commercial Serological Antibody Detection Tests for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Systematic Review; *Plos Medicine*, June 2007, Volume 4, Issue 6, e202

Stephen T, Thankachen R, Parihar B, Nair S, Shukla V. Multilocular tuberculous cyst of thymus gland. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003, 2093 e 2094.

Sutherland I, Svandova E, Radhakrishna S. The development of clinical tuberculosis following infection with tubercle bacilli. *Tubercle.* 1982; 63:255–68.

Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG, Litwin CM. Evaluation of an in vitro assay for interferon gamma production in response to the Mycobacterium tuberculosis-synthesized peptide antigens ESAT-6 and CFP-10 and the PPD skin test. *Am J Clin Pathol.* 2006; 125:467-73.

Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success, *J Bras Pneumol.* 2007; 33(3):323-334.

Tessema TA, Hamasur B, Bjun G, Svenson S, Bjorvatn B. Diagnostic evaluation of urinary lipoarabinomannan at an Ethiopian tuberculosis centre. *Scand J Infect Dis* 2001, 33: 279–284.

Tissot F, Zanetti G, Francioli P, Zellweger JP, Zysset F. Influence of bacille Calmette-Guerin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: to what size? *Clin Infect Dis*. 2005; 40 (2):211–7.

Weldingh K, Rosenkrands I, Okkels LM, Doherty TM, Andersen P. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 57-65.

World and Health Organization. Laboratory Services in Tuberculosis Control. Part III: culture. WHO 1998

World and Health Organization. Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing. WHO Report 2008.

Wrighton-Smith P, Zellweger JP. Direct costs of three models for the screening of latent tuberculosis infection. *Eur Respir J*. 2006; 28:45–50.

Yew WW, Leung CC. Pulmonary and critical care updates. Update in tuberculosis 2005. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 173: 491-498.

Yuan Y, Crane DD, Barry CE. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial α -crystallin homolog. *Journal of Bacteriology* 1996; 178(15): 4484-4492.

Zellweger J-P, Zellweger A, Ansermet S, Senarclens B, Wrighton SP. Contact tracing using a new T-cell-based test: better correlation with tuberculosis exposure than the tuberculin skin test. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 1242-1247.

Zhang H, Wang J, Lei J, Zhang M, Yang Y, Chen Y, Wang H. PPE protein (Rv3425) from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis*: a potential B-cell antigen used for serological diagnosis to distinguish vaccinated controls from tuberculosis patients. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13(2): 139-145.

Zink AR, Nerlich AG. Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissue samples, *Journal of Clinical Pathology*, Fev 2007.

ANEXO I

Consentimento Informado

CONSENTIMENTO INFORMADO

Utilização de técnicas de serodiagnóstico como complemento ao diagnóstico de tuberculose em Portugal.

A tuberculose é um dos maiores problemas de Saúde pública do mundo, sendo uma das principais causas de morte por agentes infecciosos. A incidência da tuberculose em Portugal é actualmente três vezes e meia superior à da União Europeia.

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por bactérias da espécie *M. tuberculosis*, cuja infecção ocorre essencialmente a partir da inalação de aerossóis contaminados.

Os testes laboratoriais são essenciais para o correcto diagnóstico da tuberculose. É de maior interesse o desenvolvimento de um método de diagnóstico serológico (pesquisa de anticorpos específicos no sangue) sensível, específico, rápido e de fácil execução que permita substituir ou complementar testes actuais com vista à obtenção de um diagnóstico mais eficaz da tuberculose no nosso país.

Caso aceite colaborar neste importante estudo necessitaremos apenas de colher 10 ml de sangue. A técnica para a colheita do sangue é uma técnica de rotina sem riscos, efectuada no laboratório do Centro de Saúde. A investigação laboratorial será efectuada de forma anónima, pelo que os resultados individuais não podem ser divulgados ou comunicados e serão sempre considerados estritamente confidenciais.

Eu abaixo assinado (nome completo do inquirido)
..... declaro que compreendi a explicação que me foi dada acerca do estudo acima referido e que me foram respondidas todas as questões e dúvidas colocadas, pelo que declaro consentir na realização do estudo supracitado.

Eu abaixo assinado, certifico que foram postas à disposição, informações respeitantes ao estudo supracitado, "de modo simples, inteligível e leal", conforme o disposto no Decreto-Lei nº 97/94 de 9 de Abril. O doente poderá recusar a qualquer momento a sua participação neste estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo na sua assistência.

(assinatura do inquirido)

(assinatura do investigador responsável)

ANEXO II

Ficha identificativa

Hospital ou C.D.P. (designação)

Utilização de técnicas de Serodiagnóstico como complemento ao diagnóstico de tuberculose em Portugal

Nº da amostra - ID # _____

Idade: _____ anos Sexo: F M

Região onde vive: _____ Profissão: _____

Infecção HIV: Sim Não Toxicodependente: Sim Não

Linfócitos T CD4+ (contagem e data) _____

Outras infecções: _____

Vacina BCG, Sim Não Data (s): _____ ; _____

T.C.T.: resultado (s) e data (s) : _____ ; _____

Suspeita de TB: Contacto Sintomas

Diagnóstico definitivo de TB (cultura positiva), sim não

TB pulmonar TB não pulmonar especificar (TB extra-pulmonar) _____

TB no passado Ano (s) _____

Data de início de tratamento: _____ Data de fim de tratamento: _____

Data(s) de colheita de soro: T0 _____ T1 _____ T2 _____ T4 _____

Outras Informações: _____

Laboratório

Exame Directo (produto/data/resultado): _____

PCR (produto/data/resultado): _____

Cultura (produto/data/resultado): _____

Antibiograma: sim não

Estreptomicina, S[●] R[●] Isoniazida, S[●] R[●] Rifampicina, S[●] R[●] Etambutol, S[●] R[●]

Outras drogas sim não se sim, quais _____

MTC MAC MOTT

MTC - *M. tuberculosis* Complex, MAC - *M. avium* Complex; MOTT - Mycobacteria Other Than Tuberculosis;

ANEXO III

Protocolo de extracção de DNA das amostras

1. Preparar solução com 40 µl de TEN buffer (concentrado 10 x) e 160 µl de água destilada.
2. Adicionar 200 µl de homogeneizado.
3. Agitar lentamente durante 1-2 min.
4. Incubar a 100° C durante 5 minutos para inactivar.
5. Oscilar o tubo 2x30 seg no Mini-bead Beater.
6. Adicionar 400 µl de Fenol.
7. Agitar lentamente durante 1-2 min.
8. Adicionar 400 µl de Clorofórmio.
9. Agitar lentamente durante 1-2 min.
10. Centrifugar 5 min a 12.000 rpm.
11. Remover a fase aquosa para um tubo de rosca novo de 1,5 ml.
12. Adicionar 400 µl de Clorofórmio.
13. Agitar lentamente durante 1-2 min.
14. Centrifugar 5 min a 12.000 rpm.
15. Remover a fase aquosa para um tubo de rosca novo de 1,5 ml.
16. Adicionar 40 µl de Acetato de Sódio 3M e 1 ml de Álcool absoluto ice cold.
17. Agitar lentamente durante 1-2 min.
18. Deixar o ADN precipitar mantendo-o 30 min a -20° C.
19. Centrifugar 5 min a 14.500 rpm.
20. Desprezar o sobrenadante e lavar o pellet em Álcool 70 %.
21. Centrifugar 5 min a 12.000 rpm.
22. Desprezar o máximo possível de sobrenadante.
23. Dissolver o pellet em cerca de 50 µl de TE buffer.

Anexo IV

Protocolo do PCR para a sequência IS6110

IS6110 1ªmix

Reagentes da mix	[Stock]	[Reacção]	1x (•l)
H ₂ Odd			27,75
Buffer complete	10 x	1x	5,00
dNTP's	10 mM	200 •M	1,00
Primer IS59	10 •M	1 pg/•l	5,00
Primer INS2	10 •M	1 pg/•l	5,00
Taq (Fermentas)	5 U	1,25U	0,25
Total			44,00

Volume reacção: 44 •l mix + 6 •l DNA (3•g)

Programação do termociclador

95°C - 3 minutos
95°C - 30 segundos 50X
60°C - 30 segundos
72°C - 45 segundos
72°C - 3 minutos
8°C - •

IS6110 2ªmix

Reagentes da mix	[Stock]	[Reacção]	1x (•l)
H ₂ Odd			26,75
Buffer incomplete	10 x	1x	5,00
dNTP's	10 mM	200 •M	1,00
Primer IS60	10 •M	1 pg/•l	5,00
Primer INS1	10 •M	1 pg/•l	5,00
Taq (Fermentas)	5 U	1,25U	0,25
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	3,00
Total			46,00

Volume reacção: 44 •l mix + 6 •l DNA (3•g)

Programação do termociclador

95°C - 3 minutos
94°C - 30 segundos 20X
60°C - 30 segundos
72°C - 30 segundos
72°C - 3 minutos
8°C - •

Anexo V

Protocolo do PCR para a sequência 18s rRNA

18s rRNA (147 bp)

Nº amostras 1

Reagentes da mix	[Stock]	[Reacção]	1x (•l)	Programação do termociclador
H ₂ Odd			31,80	
Buffer incomplete	10 x	1x	5,00	94°C - 5 minutos
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3,00	94°C - 30 segundos
dNTP's	10 mM	200 •M	1,00	56°C - 30 segundos 40X
Primer F	10 •M	0,3 •M	1,50	72°C - 1 minuto
Primer R	10 •M	0,3 •M	1,50	72°C - 10 minutos
Taq (Fermentas)	5 U	1 U	0,20	8°C - •
<u>Total</u>			<u>44,00</u>	

Volume reacção: 44 •l mix + 6 •l DNA