

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
CURSO DE MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA**

**Comparação de testes sorológicos para o diagnóstico da
tuberculose**

Mestrando

Alonso Martinez Monteiro

Orientador: Valmir Laurentino Silva

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

À minha família e esposa Nathalia Presta pelo apoio e estímulo.

À Prof^a Rosely Magalhães e Elizabeth Glória por abrir as portas da Fiocruz e acreditar em mim desde a primeira entrevista de seleção do mestrado e ainda pelos ensinamentos no decorrer do curso que me deram uma nova perspectiva da realidade e história do Brasil pela ótica da saúde.

Ao Prof Valmir Laurentino por me aceitar como orientando, pelos ensinamentos profundos de saúde e de vida e pelo amigo que adquiri.

À amiga Fernanda Santos pela dedicação, vigilância e ensinamentos da prática de bancada no Departamento de Ciências Biológicas.

Às meninas de minha turma do mestrado, Bianca, Margarete, Katia, Mary e Taís pelos excelentes dias que passamos.

Aos funcionários e servidores de todo o Departamento de Ciências Biológicas por abrir as portas e me ajudar em tudo que foi requisitado no decorrer do curso. Em especial, Prof Duarte, Prof^a Rose e Prof Andre.

Ao pessoal do IOC, Paulinha e Messias.

E à todos os amigos que fiz em toda a ENSP nestes dois anos de mestrado.

*"Tudo o que temos de decidir
é o que fazer com o tempo que nos é dado."
(Gandalf)*

*Este trabalho é dedicado
Aos meus pais e
À minha esposa Nathalia*

ABREVIATURAS

A60 – Antígeno 60 da BCG

Ag - Antígeno

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

ConBruta – Concordância Bruta

CoNBxH – Co-negatividade BCG x Hexagon

CoNHxB – Co-negatividade Hexagon x BCG

CoPBxH – Co-positividade BCG x Hexagon

CoPHxB – Co-positividade Hexagon x BCG

D – Doentes

DO – Densidade Ótica

DOTS – Estratégia de Tratamento Diretamente Observado de Curta Duração

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio de imunoadsorção enzimática)

ENSP- Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

ES 31 – 31 kDa glycoprotein Excretory-Secretory

EU – Unidade Arbitrária de ELISA

HIV - Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

I – Indeterminados

IC - Imunocrotatográfico

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IR – Índice de Reprodutibilidade

kDa- Quilodalton

LAM – Lipoarabinomannan (Lipoarabinomanana)

N – Negativo

N/A – Non Available (Não Informado)

ND – Não Doentes

OMS – Organização Mundial da Saúde

OT – Old Tuberculin (Antiga Tuberculina)

P – Positivo

PBS – Solução salina isotônica com fosfato 0,01 M. pH 7.2

PPD – Derivado de Proteína Purificada

RT – Renset Tuberkulin (Tuberculina Purificada)

S – Sensibilidade

SP- Especificidade

TB – Tuberculose

TBGLs – Tuberculous Glycolipid Antigens (Antígenos Glicolipídico de Tuberculo)

TMA – Thermostable Macromolecular Antigens (Antígenos Macromoleculares Termoestáveis)

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP - Valor Preditivo Positivo

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Modelo esquemático do ELISA-BCG.pag 17

Figura 2: Interpretação dos resultados do kit Hexagon TB.....pag 18

Figura 3: Exemplo de resultado positivo do kit Hexagon TB.....pag 21

Gráfico 1: Representação gráfica da comparação das

DOs do ELISA-PPD com as placas Nunc-Imuno™ Plate e

FluoroNunc™ Module para o sorodiagnóstico da

tuberculose.....pag 22

Gráfico 2.1 : Dispersão das DOs das amostras negativas obtidas no ELISA-

BCG.....pag 28

Gráfico 2.2: Dispersão das DOs das amostras positivas obtidas no ELISA-

BCG.....pag 28

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadros

Quadro 1: Resumo dos trabalhos de ELISA para TB.....pag 07

Quadro 2: Classificação de concordância *Kappa*.....pag 19

Tabelas

Tabela 1: Resultados dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia e valores de predição do kit Hexagon TB.....pag 20

Tabela 2: Comparação das DOs do ELISA-PPD com as placas Nunc-Imuno™ Plate e FluoroNunc™ Module para o sorodiagnóstico da tuberculose.....pag 22

Tabela 3: DO do ELISA-BCG e ELISA-PPDpag 23

Tabela 4: Comparação dos resultados obtidos no ELISA-PPD e ELISA-BCG frente à 18 amostras séricas em 5 reproduções.....pag 24

Tabela 5: Número de positivos e negativos entre TB pulmonar (doentes) e Controle sadio (não doentes) no ELISA-BCG.....pag 25

Tabela 6: Parâmetros sorológicos considerando os resultados sorológicos indeterminados como negativos no ELISA-BCG.....pag 26

Tabela 7: Parâmetros sorológicos considerando os resultados sorológicos indeterminados como positivos no ELISA-BCG.....pag 27

Tabela 9: Comparação dos parâmetros do ELISA-BCG *versus* Hexagon TB considerando os resultados Indeterminados como Negativos.....pag 29

Tabela 10: Comparação dos parâmetros do ELISA-BCG *versus* Hexagon TB considerando os resultados Indeterminados como Positivos.....pag 29

Resumo

A tuberculose é uma doença infecciosa grave causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, podendo acometer todos os órgãos, mas em especial os pulmões. Apresenta grande incidência no mundo e ocorre em maior proporção em populações de baixas condições socioeconômicas. A tuberculose continua sendo uma das doenças crônicas mais importantes da história da humanidade, sobretudo nas áreas mais carentes do mundo com grandes repercussões sociais, pois acomete, predominantemente, a população adulta e produtiva. As estratégias de vigilância e controle da tuberculose incluem fundamentalmente o diagnóstico extemporâneo da doença, o tratamento e acompanhamento dos casos confirmados. O diagnóstico precoce constitui um dos principais problemas, pois, atualmente não há disponíveis testes rápidos, adequados e confiáveis para o diagnóstico em condições de campo e ambulatoriais. Diante disto, este trabalho realizou uma análise comparativa entre os testes sorológicos ELISA com antígenos brutos de PPD e de BCG e o teste imunocromatográfico Hexagon TB com o antígeno determinado A60 para o diagnóstico da tuberculose. Devido a características imunogênicas dos antígenos e da composição da prevalência da doença, a reprodutibilidade do ELISA-BCG foi baixa, bem como os parâmetros sorológicos de sensibilidade (33%) e especificidade (61%), comprometendo assim, a identificação entre pacientes clinicamente sadios e doentes. Os resultados também mostraram que o kit comercial Hexagon TB possui elevada acurácia (87,5%) e é o mais indicado ao diagnóstico da tuberculose, pois identificou melhor os indivíduos com tuberculose e os indivíduos sadios.

Palavras-chave: Tuberculose, imunodiagnóstico, PPD, BCG, Hexagon TB

Abstract

Tuberculosis is a serious infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, it can affect all organs, especially the lungs. It shows a higher incidence in the world and occurs more often in populations of low socioeconomic conditions. Tuberculosis remains one of the most important chronic diseases in human history, especially in more deprived areas of the world with great social impact, since it affects predominantly adult and productive population. Strategies for surveillance and control of tuberculosis include primarily the belated diagnosis of the disease, the treatment and monitoring the confirmed cases. Early diagnosis is a major problem, since there are no rapid, suitable or reliable tests available for diagnosis in field conditions and outpatients. Thus, this study conducted a comparative analysis of the serological ELISA with crude antigens PPD and BCG and Hexagon TB immunochromatographic test with antigen A60 specific for the diagnosis of tuberculosis. Due to the characteristics of immunogenic antigens and the composition of the disease's prevalence of the, the reproducibility of the ELISA, was low, as well as serological parameters of sensitivity (33%) and specificity (61%), thus compromising the identification between healthy and sick patients. The results also showed that the commercial kit TB Hexagon has high accuracy (87,5%) and is better suited for the diagnosis of tuberculosis, because it identified better the healthy and the sick individuals.

Keywords: Tuberculosis, immunodiagnosis, PPD, BCG, Hexagon TB

Sumário

1. Introdução.....	Pag 1
1.1 A Doença.....	Pag 1
1.2 Relação patógeno-hospedeiro.....	Pag 3
1.3 Diagnósticos para TB.....	Pag 4
1.3.1 <i>Teste Radiométrico</i>	Pag 5
1.3.2 <i>Testes Moleculares</i>	Pag 5
1.3.3 <i>Testes Sorológicos</i>	Pag 5
1.4 O Antígeno BCG.....	Pag 8
1.5 O PPD RT-23.....	Pag 8
1.6 O teste imunocromatográfico Hexagon TB.....	Pag 9
1.6.1 Antígeno A60.....	Pag 10
2. Justificativas.....	Pag 11
3. Objetivos.....	Pag 13
3.1 Objetivos gerais.....	Pag 13
3.2 Objetivos específicos	Pag 13
4. Considerações éticas	Pag 14
5. Materiais e métodos.....	Pag 15
5.1 Amostras clínicas	Pag 15
5.2 Ensaio Imunoenzimático com Ag PPD (ELISA-PPD) para comparação de placas Nunc-Imuno™ Plate e FluoroNunc™ Module no reconhecimento de anticorpos IgG anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Pag 15
5.3 Ensaio Imunoenzimático com Ag BCG (ELISA-BCG) para pesquisa de anticorpos IgG.	Pag 17
5.4 Pesquisa de IgG, IgA e IgM totais com a plataforma imunocromatográfica Hexagon TB.	Pag 17
5.5 Determinação dos parâmetros sorológicos.....	Pag 18
5.6 Avaliação estatística.....	Pag 19
6 Resultados	Pag 20
6.1 Análise do kit imunocromatográfico Hexagon TB.....	Pag 20

6.2 Interferência do PBS-Tween 20 em ensaios sorológicos.....	Pag 21
6.3 Verificação da reatividade do ELISA utilizando duas placas distintas como suporte da reação.....	Pag 21
6.4 Análise do ELISA para pesquisa de IgG com antígeno PPD e BCG.....	Pag 22
6.5 Discriminação entre sadios e doentes pelo ELISA IgG para BCG.....	Pag 24
6.6 Comparação sorológica do ELISA com o kit Hexagon TB.....	Pag 28
7. Discussão	Pag 31
7.1 Limitações do estudo.....	Pag 35
8. Conclusões.....	Pag 37
9. Referências Bibliograficas.....	Pag 38

1. Introdução

1.1 A Doença

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa de grande incidência no mundo e ocorre em maior proporção em populações de baixas condições socioeconômicas e, com o surgimento da AIDS e de focos multiresistentes, o problema vem se agravando (WHO/OMS, 2009). O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente responsável pela doença que acomete primordialmente os pulmões em 85% dos indivíduos imunocompetentes, entretanto, naqueles que apresentam comprometimento do sistema imunitário, a doença frequentemente dissemina-se em outros tecidos (WHO/OMS, 2009).

No ano de 1993 a OMS reconheceu a gravidade do problema e classificou a tuberculose como uma “situação de emergência global” e, posteriormente, novas metas foram traçadas para o controle da doença. As metas internacionais estabelecidas pela OMS e, pactuadas pelo governo brasileiro, são de detectar 70% dos casos de tuberculose estimados e curá-los em 85%. As estratégias de vigilância e controle da tuberculose vêm sendo o diagnóstico precoce da doença, o tratamento e o acompanhamento dos casos (WHO/OMS, 2009).

Em 2008 foram 9.4 milhões de casos registrado mundialmente, destes 1.4 milhões eram portadores de HIV. O total de óbitos chegou a 1.8 milhões, quase 4500 mortes ao dia. Indivíduos HIV positivo possuem de 20 a 40 vezes mais chance de desenvolver tuberculose dentre a população de um mesmo país (WHO/OMS, 2009).

A StopTB, iniciativa formada por uma rede de organizações internacionais, cujo propósito é suprimir a tuberculose como problema de saúde pública, revela que o Brasil é um dos quatro países com maior número absoluto de casos de tuberculose no mundo. O total de casos no país em 2007 foi de 114.000. Estima-se que cerca de 50 milhões de

brasileiros encontram-se infectados. Na região Sudeste concentra-se 47% (38.992) dos casos notificados (StopTB, 2009).

O Estado do Rio de Janeiro e, em particular a cidade do Rio de Janeiro, evidenciam um quadro alarmante da doença, não somente por apresentar uma cepa do bacilo extremamente virulenta (Lazarrini, 2007), mas também por suas características de ocupação do espaço urbano e por consequência a formação de aglomerados e a concentração no espaço intradomiciliar (Vicentin, 2002). Segundo Ruffino (1981), a cidade do Rio de Janeiro possui características econômicas, sociais, demográficas e político-sanitárias e os processos históricos da cidade são fontes de entendimento destas características.

Historicamente, vários eventos contribuíram para o atual panorama da tuberculose no mundo: a) a epidemia de HIV aumentou acentuadamente os casos de tuberculose, pois na fase inicial da doença a tuberculose não difere da forma usual de manifestação e de reação imunitária. Mas, na fase mais avançada, a diminuição dos linfócitos T CD4⁺ compromete a ativação e o recrutamento de macrófagos resultando em proliferação e disseminação de bacilos pela corrente sanguínea (Siqueira e Rafful, 1999); b) a deterioração das condições socioeconômicas de parte da população mundial; c) a elevação da taxa de abandono do tratamento antituberculose; d) o aparecimento da multirresistência e e) a falta de interesse da comunidade científica e dos formadores de políticas públicas em relação à tuberculose (Teixeira, 2007).

O diagnóstico da tuberculose deve ser estabelecido com base no reconhecimento dos sinais e sintomas clínicos sugestivos da doença e em dados epidemiológicos, por investigação laboratorial para demonstração do parasito nos tecidos pulmonares por meio de contagem microscópica do número de bacilos por lâmina (baciloscopia) e/ou o crescimento do bacilo em meio de cultura (Stitbulov, 1999).

O diagnóstico da tuberculose ainda é o principal problema da doença, e dentro de tais metas o diagnóstico da doença em seus estágios iniciais, aliados a quimioterapia e a melhorias de condições de vida, pode contribuir para o controle da disseminação da doença. Entretanto, os atuais métodos e técnicas de diagnósticos apresentam problemas como, por exemplo, a baixa sensibilidade da baciloscopia, o longo tempo de espera das culturas microbianas e a baixa especificidade do teste cutâneo com PPD (Teixeira, 2007).

1.2 Relação patógeno-hospedeiro

A família *Mycobacteriaceae* é muito antiga e antecede a evolução da vida animal. Inicialmente, era composta por diversas bactérias saprófitas do solo que desempenhavam funções de decomposição (Campos, 1999). Estes bacilos possuem uma parede celular com elevado conteúdo lipídico. São resistentes à ação de agentes químicos, mas sensíveis a agentes físicos, como a radiação ultravioleta e também ao calor. O *M. tuberculosis* é um bacilo imóvel, não esporular, não produtor de toxinas e aeróbio estrito. Um microrganismo parasita intracelular facultativo, sendo capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias e se manter latente por anos. Apresenta crescimento lento, com tempo de geração de até 20 horas, sendo necessárias várias semanas para que as colônias tornem-se visíveis em meio de cultura (Almeida, 2001).

Na evolução dos mamíferos, o mutante *M. bovis*, desenvolveu a capacidade de parasitar um amplo espectro de animais de sangue quente. Com a proximidade e a domesticação dos animais, principalmente os bovinos, a ingestão do leite, carne crua ou mal cozida pode ter sido um elemento importante na relação humana com o parasito (Campos, 1999).

Pressupõe-se que, inicialmente, os indivíduos menos resistentes desenvolviam um quadro semelhante à febre tifóide e levava o hospedeiro disseminador ao óbito muito rapidamente. Entretanto, os sobreviventes a infecção primária e que posteriormente, desenvolviam tuberculose pulmonar, aumentava o número de indivíduos potencialmente disseminadores do bacilo (Campos, 1999 apud Osler, 1992).

Ao longo da história entre as populações humanas, a doença foi conhecida e descrita em diferentes culturas. Por ser frequente entre membros familiares, curiosamente chegou a ser considerada hereditária. Apesar de observações empíricas ocorridas na Europa e Ásia antiga se aproximarem relativamente bem do processo e explicação etiológica da doença, e sua forma de contágio ser percebida mesmo sem os instrumentos de investigação e análise necessários, o conhecimento oficial da mecânica de transmissão da tuberculose somente foi descrito no século XVIII e a confirmação do patógeno causador da doença, o *M. tuberculosis*, no final do século XIX, por Köch (Souza, 2003).

Analisando a curva epidêmica da tuberculose no decorrer da sua história, observa-se uma elevação rápida, paralela ao processo de disseminação da infecção e uma diminuição na medida em que os hospedeiros mais susceptíveis chegam ao óbito. A epidemia da tuberculose que ocorreu na Europa no século XVIII desenvolveu-se em uma população primordialmente selecionada pela resistência natural. Sobrevivendo à infecção primária, desenvolviam formas crônicas e disseminavam a doença em uma população pobre e aglomerada, vítimas de uma nova ordem de organização social e do trabalho, organizada pela Revolução Industrial (Stead, 1995).

Ao se analisar a relação entre estes dois atores do processo da doença – parasito-hospedeiro – constata-se um imperativo biológico que inevitavelmente levou ambas as espécies a sobreviverem e alcançarem um estado de “equilíbrio” após ciclos epidêmicos até amortizar à um estado endêmico (Ruffino, 1981).

Do ponto de vista biológico a interação do parasito com o hospedeiro na tuberculose pulmonar é uma história de sucesso. No homem, o bacilo encontrou abrigo, alimento e condições imunológicas extremamente favoráveis à sua reprodução e disseminação (Souza, 2003).

1.3 Diagnósticos para TB

O diagnóstico de TB pulmonar baseia-se em alguns fatores como a apresentação clínica, achados radiológicos de tórax e tomografia computadorizada de tórax, teste tuberculínico (PPD), exames bacteriológicos (baciloscopia e cultura para micobactérias (Bethlem *et al.*, 1995) e testes sorológicos para pesquisa de antígenos e imunoglobulinas específicas (Guimarães, 1978).

O diagnóstico para tuberculose significa que o paciente tem doença sintomática devido a lesões resultantes da resposta imunitária ao *M. tuberculosis* sob a forma de granulomas, normalmente com necrose caseosa central (Maitra e Kumar, 2008). Entende-se um caso de tuberculose quando há um paciente bacteriologicamente confirmado e diagnosticado por um clínico. Em adultos, o laudo negativo na baciloscopia para Bacilos Álcool Ácidos Resistentes (BAAR), imediatamente leva à segunda fase, a de cultura por meio Löwenstein-Jensen – sólido e Middlebrook 7H9 – líquido, onde se espera, através de isolamento de micobactérias em amostras de escarro, lavados e/ou aspirados ou urina, o crescimento de pelo menos 20 colônias em um período que pode chegar até 40 dias de incubação (Guimarães, 1978).

Nos casos de tuberculose infantil, a pesquisa do *M. tuberculosis* é feita por meio do exame de escarro nas crianças capazes de expectorar, a partir dos cinco ou seis anos, ou nas menores, através do lavado gástrico. O lavado gástrico só deve ser realizado em pacientes internados, pois requer jejum e pouca mobilidade do paciente ao acordar pela manhã, procedimento este que dificulta o diagnóstico (Sant'Anna, 1989).

A cultura e a baciloscopia são preconizadas como padrões ouro para testes de validação. A sensibilidade da baciloscopia pode oscilar entre 30 a 80% com média de 60%, em pacientes com cultura positiva (Almeida, 2001 apud Nelson, 1998). A sensibilidade da baciloscopia nas formas pulmonares cavitárias, com grande número de bacilos, fica em torno de 80%, enquanto que as formas infiltrativas, não cavitadas, a baciloscopia apresenta sensibilidade inferior a 32% (Greenbaun *et al.*, 1980).

Na cultura, a sensibilidade varia de 30% a 96%, enquanto a especificidade mantém-se alta, independentemente do material analisado, em torno de 98,4% a 100% (Greenbaum *et al.*, 1980).

Outras técnicas para diagnóstico da tuberculose são menos usuais:

1.3.1 *Teste Radiométrico*

O método radiométrico Bactec TB 460 consiste em um sistema semiautomatizado (*Becton Dickinson Instrument System*), baseado na detecção de $^{14}\text{CO}_2$ liberado pelas micobactérias devido à utilização do ácido palmítico marcado com ^{14}C presente no meio de cultura (Bethlem *et al.*, 1995).

1.3.2 *Testes Moleculares*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como a *nested-PCR*, têm sido destacadas como técnicas moleculares promissoras para o diagnóstico rápido da tuberculose (Assis, 2007). Entretanto, pela extrema sensibilidade da técnica, muitas vezes não se distingue um paciente infectado de um doente (Swaminathan *et al.*, 1999) além de serem de alto valor de aquisição.

1.3.3 *Testes Sorológicos*

Arloing e Courmont relataram, em 1898, a utilização de teste de aglutinação para o diagnóstico de TB pulmonar. Posteriormente, várias técnicas sorológicas foram propostas para o diagnóstico sorológico da tuberculose: fixação do complemento,

imunodifusão em gel e ensaios imunoenzimáticos, porém, nenhuma delas mostrou-se útil do ponto de vista clínico (Daniel & Debanne, 1987).

Inicialmente descrito por Engvall e Perlmann em 1971, o *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) foi usado como método quantitativo para detecção de IgG de coelho com fosfatase alcalina (Lequin, 2005). Esta técnica despertou interesse pela possibilidade de fácil execução, baixo custo e rapidez diagnóstica nas formas de TB, enquanto a baciloscopia apresenta limitações, como nas formas pulmonares paucibacilares. O método imunoenzimático permite detectar a presença de anticorpos IgG (Sant'Anna, 2001) contra antígenos micobacterianos no soro de portadores de TB, contudo, o *M. tuberculosis* apresenta estruturas antigênicas comuns a outras espécies de micobactérias não patogênicas, inclusive comuns ao *M. bovis* utilizado na vacina BCG, portanto, a especificidade da técnica ELISA também depende da qualidade do antígeno utilizado (Diaz, 1988).

Inúmeros trabalhos na década de 90 apresentam resultados relativamente satisfatórios ao uso de imunoenaios para tuberculose (Gupta, 1997 e 1995; Delacourt, 1993; Swaminathan, 1999; Cocito, 1991). Artigos mais recentes possuem uma abordagem incluindo quase sempre em sua população pacientes portadores de HIV (Gupta, 2002; Rosemberg, 2001).

Nabeshima *et al* (2005) utilizaram antígenos glicolipídicos (TBGLs) derivados da parede celular do *M.tuberculosis* com o intuito de avaliar a influência da vacinação por BCG em adultos através de imunoenensaio ELISA. Embora haja reação cruzada para outras espécies de *Mycobacterium*, este estudo mostrou baixa resposta de IgG anti-TBGLs a pacientes vacinados e não houve influência significativa à BCG.

No trabalho de Cocito (1991), foram utilizados como parâmetros de comparação e monitoramento sorológico da evolução da infecção humana, o ensaio imunoenzimático (ELISA-A60) e o imunoblot para diagnóstico de tuberculose meningítica, e para o monitoramento da resposta celular, o teste cutâneo com tuberculina e com o antígeno A60 em grupos distintos. Observou-se que o A60 funciona como gatilho para as reações celular e humoral, detectadas nos testes correspondentes, em pacientes com tuberculose ativa e este autor preconiza a sua utilização para o acompanhamento desta doença. Contrariamente, Swaminathan (1999) do *Tuberculosis Research Centre*, na Índia, pesquisou IgG e IgM em crianças doentes, contra antígenos

A60 e o 38kDa utilizando kits de ELISA. Nenhum dos kits usados foi considerado eficaz na clínica.

Em outro trabalho, Sant'Anna (2001), pesquisou IgG anti-PPD analisando a relação da gravidade da tuberculose infantil frente aos resultados obtidos com o ELISA. Os parâmetros sorológicos não foram informados, mas assumidos como semelhante ao do trabalho de Barrera *et al.*, (1989), que consideraram o ELISA um teste promissor utilizando o mesmo antígeno.

O quadro abaixo resume alguns trabalhos acerca do ELISA para tuberculose:

Quadro 1: Resumo dos trabalhos de ELISA para TB.

Teste	Padrão Ouro	Antígenos	Anticorpos	Sensibilidade	Especificidade	Referência
ELISA	Montoux	TBGLs	IgG	81,1%	95,5%	Nabeshima, 2005
ELISA	Montoux	A60	IgG IgM	48% 89%	91,8% 100%	Cocito, 1991
ELISA	Cultura e clínica	A60 38kDa	IgG IgM IgG	29% 71% 45%	86% 50% 73%	Swaminathan, 1999
ELISA	Cultura e BAAR	Rv3425 38kDa LAM Pool	IgG IgG IgG IgG	31,6% 20,6% 35,3% 61,8%	100% 98,2% 96,5% 93%	Zang, 2009
ELISA	Cultura e BAAR	ES-31	IgG IgM IgA	83,3% 63,3% 53,3%	86,6%	Gupta, 2002
ELISA	Clínica e BAAR	A60	IgA + IgG	91,6%	90%	Gupta, 1995
ELISA	Clínica e BAAR	A60	IgM + IgA	75%	92%	Gupta, 1997
ELISA	Cultura e clínica	PPD	IgG	N/A	N/A	Sant'Anna, 2001
ELISA	Cultura e BAAR	A60 ES 31	IgG IgG	72,9% 91,6%	80% 87,5%	Banerjee, 2003

TBGLs – Tuberculous Glycolipid Antigens; LAM – Lipoarabinomannan (Lipoarabinomanana); BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente; IgA – Imunoglobulina A; IgG – Imunoglobulina G; IgM – Imunoglobulina M; ES 31 – 31 kDa glycoprotein Excretory-Secretory; ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

1.4 Antígeno BCG

Desenvolvida entre 1906 e 1919 por Camille Calmett e Albert Guérin no Instituto Pasteur em Paris, a BCG (Bacilo de Calmette e Guérin), originária de uma cepa atenuada do *M. bovis* (Pereira *et al.*, 2007), vem sendo utilizada como vacina há várias décadas e tem por finalidade evitar que a primoinfecção natural, causada por *M. tuberculosis*, evolua para doença (Bannon, 1999).

Apesar de cobrir 80% da população mundial, ainda há debates acerca de sua eficácia. Estudos de meta-análise de publicações internacionais, concluíram que a BCG protege em 50% para todas as formas de tuberculose e contra as formas mais severas, como a meningite tuberculosa pode chegar 78% de proteção (Bannon, 1999). Esta variação de proteção pode ser atribuída a diversos fatores, como diferenças genéticas de populações, virulência da *M. tuberculosis*, distintas cepas de BCG e dieta (Pereira *et al.*, 2007).

1.5 O PPD RT-23

Acerca da tuberculina, os primeiros trabalhos experimentais foram desenvolvidos por Koch em 1891. Extraída de um triturado de culturas bacilares, a tuberculina bruta era usada como tratamento, mas logo, seu valor terapêutico se provou inexistente. Seu uso, portanto, foi direcionado para o diagnóstico. Na década de 50, tuberculinas extraídas de purificados de *M. tuberculosis* (PPD RT-23), possibilitou a quantificação e homogeneização do teste de Montoux para o diagnóstico da tuberculose (Araújo *et al.*, 1983).

A relação entre BCG e o PPD ainda é motivo de novas publicações. Uma das maiores objeções para a vacinação com a BCG, é a possibilidade dela não produzir apenas proteção contra a tuberculose, mas também a de desenvolver a hipersensibilidade tuberculínica, dificultando assim, a utilização da prova de Montoux para o diagnóstico da infecção da tuberculose (Araújo *et al.*, 1983). Segundo Almeida (2007), resultados falso-positivos neste teste são esperados em indivíduos vacinados nos últimos 10 anos, e falso-negativos naqueles imunossuprimidos, portadores de HIV e ou que apresentem parasitismo por helmintos.

Hoje o teste de Montoux é usado como ponderador para na quimioprofilaxia em indivíduos positivos, principalmente aqueles imunocomprometidos. Em crianças, é usado como diagnóstico auxiliar, uma vez que estas quase sempre não são bacilíferas (Almeida, 2007).

1.6 O teste imunocromatográfico Hexagon TB

Este kit de teste rápido imunocromatográfico é produzido na Alemanha pela GmbH e distribuído no Brasil pela Human do Brasil, e tem por finalidade a detecção rápida e qualitativa de anticorpos IgG, IgA e IgM totais contra *M. tuberculosis* e outras micobactérias em soro, plasma ou sangue (Hexagon TB, 2008).

Segundo o fabricante Human GmbH, há um ajuste na sensibilidade do teste para a obtenção de resultados positivos em pacientes com tuberculose ativa. O teste geralmente é negativo em pacientes vacinados. O *cut-off* descrito na bula foi ajustado na faixa de 350 EU/mL (EU=Unidades Arbitrária de ELISA) para IgG e IgA e um índice de absorvância igual a 1 para IgM em relação ao teste ELISA utilizando o mesmo antígeno A60. Assim, o kit mostrou sensibilidade de 87% em pacientes doentes e especificidade de 90%.

O fabricante ainda resalta que o antígeno usado A60 é específico interespecies, podendo haver reações cruzadas com *M. avium*, *M. hansen* e outras micobactérias.

As limitações do teste, advertidas na bula pelo fabricante, são quase as mesmas alertadas pela Organização Mundial de Saúde ao uso de testes sorológicos para diagnóstico da tuberculose ativa: detecção qualitativa de anticorpos anti-TB não indica o título de anticorpos nas amostras; amostras obtidas no início da infecção podem não conter níveis de anticorpos suficientes para a obtenção de resultados positivos; comprometimento do resultado em paciente imunossuprimidos devido ao baixo número de anticorpos e resultado negativo, mas com quadro clínico positivo, é exemplo de limitação dos testes sorológicos para TB (Hexagon TB, 2008).

1.6.1 Antígeno A60

Formado por componentes livres e ligados de lipídios, proteínas e polissacarídeos, este antígeno provem de purificações do citoplasma de *M. bovis*. Trata-se de um complexo antigênico separado por imunoelektroforese bidimensional e identificado com antígeno A60. É o principal componente termoestável da tuberculina mais antiga (OT) e integrante do PPD. Pertence a uma família de polímeros que se caracterizam por antígenos macromoleculares termoestáveis (TMA) de microrganismos dos gêneros, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia* (Cocito, 1991).

2. Justificativas

Importantes publicações reconhecem a grande dificuldade de se estabelecer o diagnóstico da tuberculose, especialmente na infância, pela impossibilidade, na maioria dos casos, de se comprovar bacteriologicamente a doença, que, em geral, cursa com pequeno número de bacilos (Bethlem *et al.*, 1995; Cavalcante *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 1997; Sant'Anna, 1989; Sant'Anna *et al.*, 2001; Swaminathan, *et al.*, 1999; Van-Lume, 2008; WHO, 2009).

A obtenção de espécimes clínicos, como o escarro, em geral, só é conseguida após a idade escolar, pela dificuldade natural de se obter expectoração em crianças menores. Ainda hoje, na prática, o que se dispõe para diagnosticar tuberculose em crianças é um conjunto de dados indiretos como história clínica e história epidemiológica de contato, através de um sistema de pontuação (Gerhardt *et al.*, 1988).

A tuberculose, bem como a hanseníase, as leishmanioses, entre outras, são de certa forma, ignoradas pelas grandes indústrias farmacêuticas e fabricantes de reagentes para diagnósticos. Isso se explica por elas atingirem, majoritariamente, as populações menos favorecidas e, portanto não auferem lucros ao capital privado. Por isso não há interesse na pesquisa e desenvolvimento de produtos para tratamento e diagnósticos destas doenças (Cavalcante, 1998).

Os *kits* existentes são quase sempre importados e de custo elevado, e muitos ainda são testes para uso em laboratório que demandam técnicos qualificados, instrumentos e instalações laboratoriais, que elevam os custos do diagnóstico. Adicionalmente, devem ser considerados ainda os custos referentes à coleta, armazenagem e transporte das amostras e os custos sociais resultantes da demora no diagnóstico.

A análise do desempenho de diferentes antígenos empregados em reações sorológicas é fundamental para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e para ampliar o entendimento destas reações. A viabilização da produção em escala de *kits* e de seus insumos estratégicos, aliada as vantagens da baixa complexidade de aplicação e praticidade do produto, resultará numa redução dos custos por teste, que facilitará o seu emprego na vigilância e controle da tuberculose no Brasil. Entretanto, esta dissertação contribui no sentido de analisar os parâmetros sorológicos do ELISA com antígenos brutos de PPD e de BCG e do teste imunocromatográfico Hexagon TB com o antígeno determinado A60.

Esta dissertação é parte integrante do projeto intitulado, *Diagnóstico da tuberculose ativa: Desenvolvimento e avaliação dos parâmetros sorológicos de teste rápido de fluxo lateral*, em desenvolvimento e cooperação técnica com a microempresa privada BIODEVICES, Instituição Científica e Tecnológica, dotada da competência técnica e operacional, submetido ao edital de Doenças Negligenciadas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) nº 34/2008, e teve a concessão de auxílio aprovada para o seu desenvolvimento, conforme discriminado: Custeio (R\$ 20.966,00), Capital (R\$ 30.300,00), totalizando R\$ 51.266,00.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Realizar uma análise comparativa entre os testes sorológicos ELISA com antígenos brutos de PPD e de BCG e o teste imunocromatográfico Hexagon TB com o antígeno determinado A60 para o diagnóstico da tuberculose.

3.2 Objetivos específicos

Verificar se a presença de anticorpos séricos de indivíduos com tuberculose ativa discrimina a doença quando comparado a indivíduos saudáveis (controle negativo), examinados por meio do ELISA e do imunocromatográfico Hexagon TB.

Comparar a reatividade dos antígenos brutos do PPD e da BCG empregados no ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Mycobacterium spp.*

Discutir a viabilidade do uso de antígenos brutos e determinado em apoio ao diagnóstico sorológico da tuberculose ativa.

4. Considerações éticas

Este trabalho foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/ENSP, com nº de protocolo 140/09.

Neste estudo foram utilizadas amostras séricas de pacientes com diagnóstico definitivo de tuberculose. As amostras foram fornecidas ao pesquisador responsável de uma só vez, sem nenhum identificador, sendo previamente identificadas por código, excluindo assim, qualquer possibilidade de identificação dos doadores.

Foi utilizado como critério de inclusão das amostras o diagnóstico definitivo de TB (cultura positiva).

Os riscos relacionados à pesquisa são inexistentes devido ao fato das amostras séricas doadas serem identificadas por códigos numéricos sem a identificação pessoal.

5. Materiais e métodos

5.1 Amostras clínicas

O desenho do estudo foi projetado para realizar uma avaliação descritiva do desempenho dos testes sorológicos ELISA e imunocromatografia em amostras de pacientes com tuberculose, utilizando dois grupos. Um grupo composto por 8 amostras séricas de pacientes com tuberculose, diagnosticados clínica e laboratorialmente, e outro grupo controle, composto por 10 amostras negativas clínica e laboratorialmente, totalizando 18 amostras.

Não houve discriminação de pacientes gestantes, usuários de corticóides, imunosuprimidos e ou portadores de HIV em ambos os grupos.

As amostras foram fornecidas ao pesquisador responsável de uma só vez pela microempresa privada BIODEVICES em conformidade com a Lei nº. 10.973, de 2 de dezembro de 2004 e decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005, Instituição Científica e Tecnológica, dotada da competência técnica e operacional. As amostras fornecidas não possuíam nenhum identificador, sendo previamente identificadas por código, excluindo assim, qualquer possibilidade de identificação dos doadores.

5.2 Ensaio Imunoenzimático com Ag PPD (ELISA-PPD) para comparação de placas Nunc-Imuno™ Plate e FluoroNunc™ Module no reconhecimento de anticorpos IgG anti-*Mycobacterium tuberculosis* .

Inicialmente foram testados dois modelos de placa de fundo plano para pesquisa de anticorpos IgG anti-*M.tuberculosis* para padronização da técnica. Nesta etapa foi utilizado somente o PPD como antígeno bruto.

Para a sensibilização das placas do ELISA, 10 µL de PPD (Statens Serum Institut) foram diluídos em 10 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6. Transferiu-se 100 µL do PPD diluído para cada poço da placa do ELISA Nunc-Imuno™ e FluoroNunc™ Module adquiridas comercialmente. Incubou-se em câmara úmida por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes em solução de lavagem salina isotônica com fosfato 0,01 M. pH 7.2 (PBS). As amostras séricas humanas (soros controles positivos e negativos) foram diluídas a 1:100 em solução de trabalho (PBS com 1% de leite em pó desnatado) e distribuídas (100 µL) para os poços determinados da placa de ELISA orientando-se por gabarito.

As placas contendo as amostras diluídas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após 3 lavagens da placa para remoção do material não ligado, foi adicionado o conjugado (imunoglobulina anti-IgG humana conjugada à peroxidase, Bethyl Laboratories, Inc) diluído a 1:2000 em PBS com 1% de leite em pó desnatado (Molico-Nestlé Industrial e Comercial Ltda-MG-Brasil).

As placas foram novamente incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após nova etapa de lavagens, foi adicionada 100 µL da solução reveladora (Na₂HPO₄ 0,83M, ácido cítrico 0,33 M, pH 4,9-5,2, Orto-fenilenodiamina - OPD 0,05M, H₂O₂ 7,5%) em cada um dos poços da reação. Incubou-se durante 30 minutos, protegido da luz, à temperatura ambiente e, em seguida, a reação foi estabilizada com 50 µL/poço de H₂SO₄ 1N (solução *stop*).

A leitura foi realizada em leitor de ELISA Testline ELx 800, com filtro de referência de 492 nm e filtro de contraste de 600 nm.

5.3 Ensaio Imunoenzimático com Ag BCG (ELISA-BCG) para pesquisa de anticorpos IgG.

A realização do ELISA-BCG (**figura 1**) seguiu os mesmos procedimentos do item 5.2, substituindo o Ag PPD pela BCG (Fap Indústria Brasileira).

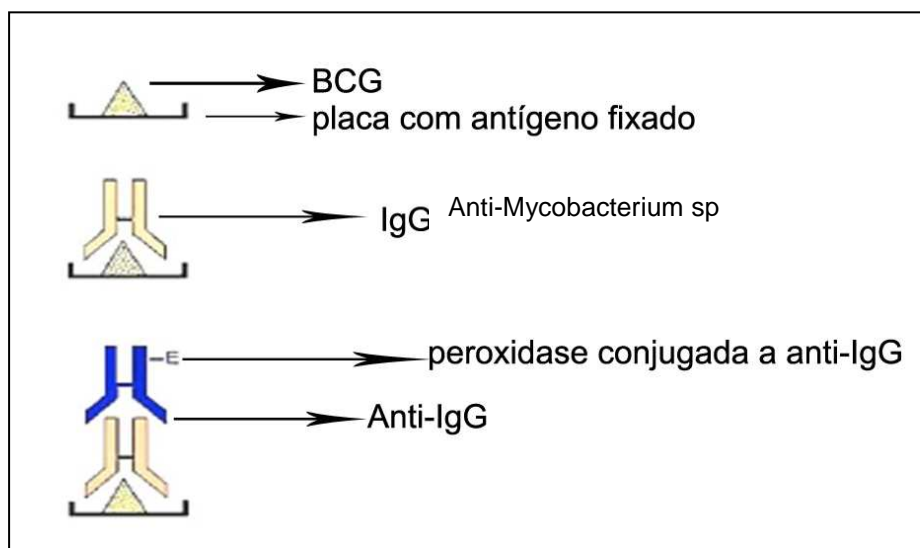


Figura 1: Modelo esquemático do ELISA-BCG. TB-Tuberculose; IgG- Imunoglobulina G; BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

5.4 Pesquisa de IgG, IgA e IgM totais com a plataforma imunocromatográfica Hexagon TB.

Para esta pesquisa foi utilizado o protocolo sugerido na bula do fabricante (Human GmbH).

Para a realização dos exames, deixou-se os imunorreagentes atingirem a temperatura ambiente: as amostras, o dispositivo de teste (Conjugado de proteína A; corante 2,0µg; antígeno de proteína A60; anticorpos anti-proteína A de coelhos; estabilizante de proteínas e azida sódica 0,05%) e o diluente (Tampão fosfato 20mM, Cloreto de sódio 150mM e Azida sódica 0,05%).

Foi identificado cada teste com um número referente à amostra. Em seguida, foi pipetado 15µL de soro na janela da plataforma situada na parte inferior. Foi adicionado 120µL do diluente na janela.

A leitura do resultado foi feita após 15 minutos seguindo as indicações de interpretação da bula.

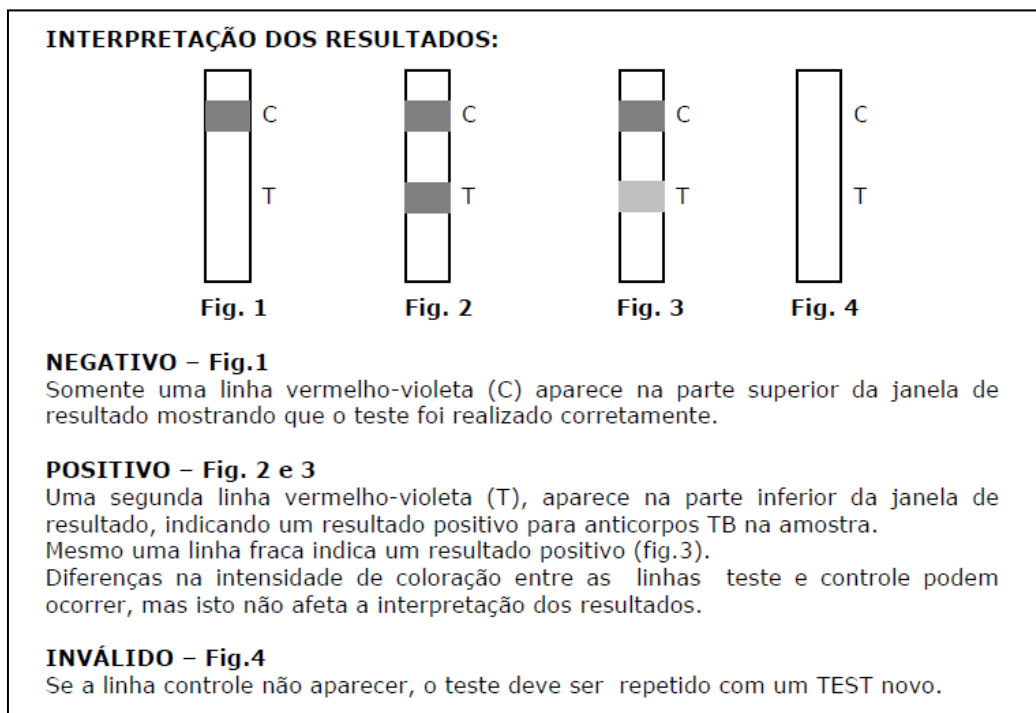


Figura 2: Interpretação dos resultados do kit Hexagon TB

5.5 Determinação dos parâmetros sorológicos

Os métodos imunoenzimáticos e o imunocromatográfico foram avaliados quanto às suas qualidades fixas: sensibilidade (S), especificidade (SP) e Acurácia, e suas qualidades variáveis: valor de predição de positividade (VPP) e valor de predição de negatividade (VPN) (TOMAN, 1981; GUIMARÃES *et al.*, 1987).

Os resultados dos testes sorológicos foram também confrontados para a verificação co-positividade, co-negatividade concordância bruta e concordância ajustada *Kappa*.

A classificação da concordância segundo coeficiente *Kappa* está discriminada na **quadro 2**.

Quadro 2: Classificação de concordância *Kappa*

Menor que zero	Sem concordância
0,00-0,20	Desprezível
0,21-0,40	Leve
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Grande
0,81-1,00	Excelente

Fonte: Landis e Koch, 1977

5.6 Avaliação estatística

Os resultados do ELISA-BCG E ELISA-PPD foram analisados através de cálculos estatísticos para a construção dos parâmetros sorológicos, levando-se em conta, as limitações de reprodutibilidade da técnica, seja pelo tamanho amostral ou pela qualidade inerente aos próprios antígenos. Para tais cálculos foi utilizado o *software* MedCalc versão 11.2

6 Resultados

6.1 Análise do kit imunocromatográfico Hexagon Tb

Foram retiradas 2 amostras do total de 10 para refinamento de comparação e utilizadas somente 8 amostras de pacientes com clínica, BAAR e cultura positivas e 8 amostras de pacientes saudáveis, examinadas e interpretadas de acordo com a posologia indicada pelo fabricante do Hexagon TB. Foram efetuados 4 análises para cada uma das amostras, totalizando 64 análises.

O kit imunocromatográfico Hexagon Tb permite a pesquisa qualitativa de imunoglobulinas totais (IgG, IgM e IgA), se limitando a discriminar amostras positivas e negativas. A **tabela 1** mostra os resultados na íntegra.

Tabela 1: Resultados dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia e valores de predição do kit Hexagon TB

Tabela 1.A					Tabela 1.B				
Análise 1	TB pulmonar	Sadios	total	S=75%	Análise 2	TB pulmonar	Sadios	total	S=63%
Positivos	6	0	6	SP=100%	Positivos	5	0	5	SP=100%
Negativos	2	8	10	Acurácia=87,5%	Negativos	3	8	11	Acurácia=81%
total	8	8	16	VPP= 100%	total	8	8	16	VPP= 100%
				VPN= 80%					VPN= 72%
Tabela 1.C					Tabela 1.D				
Análise 3	TB pulmonar	Sadios	total	S=75%	Análise 4	TB pulmonar	Sadios	total	S=75%
Positivos	6	0	6	SP=100%	Positivos	6	0	6	SP=100%
Negativos	2	8	10	Acurácia=87,5%	Negativos	2	8	10	Acurácia=87,5%
total	8	8	16	VPP= 100%	total	8	8	16	VPP= 100%
				VPN= 80%					VPN= 80%
Tabela 1.E									
Análise Global	TB pulmonar	Sadios	total	S=71,87%					
Positivos	23	0	23	SP=100%					
Negativos	9	32	41	Acurácia=87,5%					
total	32	32	64	VPP= 100%					
				VPN= 78,05%					

S=sensibilidade; SP=especificidade, VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo

Com base nos resultados qualitativos das 64 análises efetuadas frente as 16 amostras séricas, os valores dos parâmetros sorológicos para sensibilidade do teste foi de 0,7187 (71,87%), especificidade de 100%, acurácia de 0,875 (87,5%), valor preditivo positivo 100% e valor preditivo negativo 78,05% (Tabela 1.E).

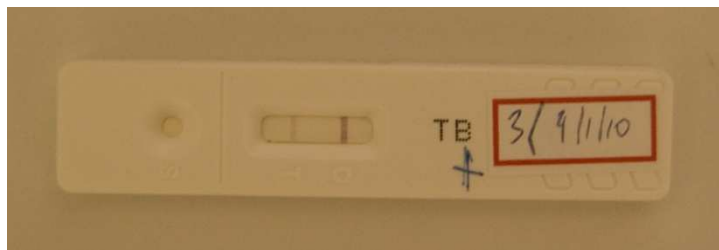


Figura 3: Exemplo de resultado positivo do kit Hexagon TB

6.2 Interferência do PBS-Tween 20 em ensaios sorológicos.

Inicialmente as provas imunoenzimáticas realizadas neste trabalho, se basearam em procedimentos tradicionais de rotina laboratorial para sorodiagnóstico de outras doenças. Os resultados obtidos com os antígenos de PPD e BCG foram por demais inconsistentes no sorodiagnóstico da tuberculose com as amostras controle positivo e negativo. Ao optar pelo preparo do PBS sem tween 20 (Julian *et al.*, 2001), os resultados sorológicos apresentaram maior intensidade de reação, melhorando o sinal de leitura visual.

6.3 Verificação da reatividade do ELISA utilizando duas placas distintas como suporte da reação

Foram utilizadas placas produzidas pela **Nunc-Imuno™ Plate e FluoroNunc™ Module** de fundo plano para verificação da reatividade do ELISA. Foi empregado o PPD como antígeno e a análise seguiu os procedimentos do item 5.4 anteriormente descrito. Foi feito a comparação dos valores de densidade ótica (DO) mediante exames de 8 amostras controle positivas e um controle negativo.

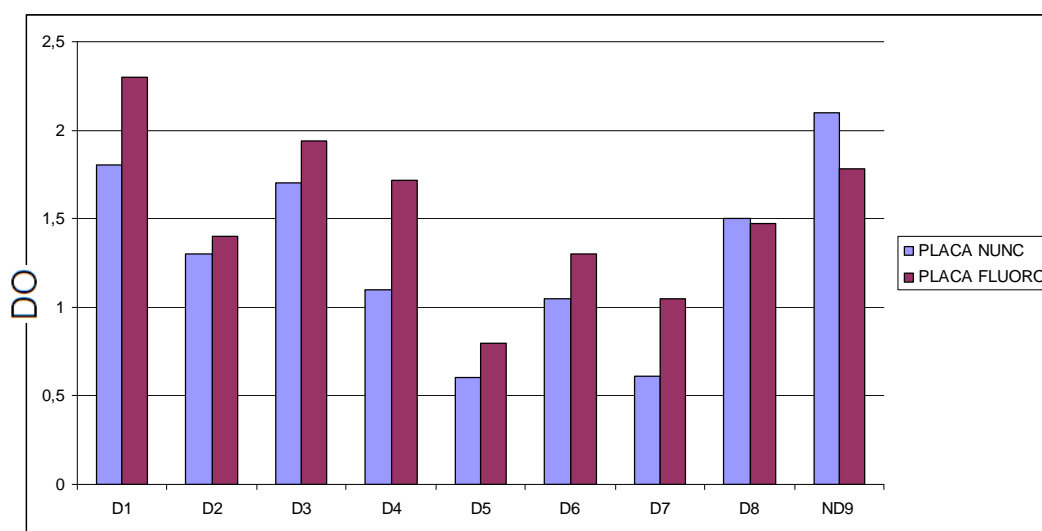
As médias das leituras das placas **FluoroNunc™ Module** foram ligeiramente maiores e estas escolhidas para a realização dos testes progressos. A **tabela 2** e o **gráfico 1** mostram os valores absolutos do ELISA.

Tabela 2: Comparação das DOs do ELISA-PPD com as placas Nunc-Imuno™ Plate e FluoroNunc™ Module para o sorodiagnóstico da tuberculose

PPD	TB Pulmonar								Controle Negativo	
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	ND9	MÉDIA
PLACA NUNC	1,8	1,3	1,7	1,1	0,6	1,05	0,61	1,5	2,1	1,3
PLACA FLUORO	2,3	1,4	1,94	1,72	0,8	1,3	1,05	1,47	1,78	2,04
MÉDIA	2,05	1,35	1,82	1,41	0,7	1,175	0,83	1,485	1,94	1,67

D= Doentes; ND= Não Doentes

Gráfico 1: Representação gráfica da comparação das DOs do ELISA-PPD com as placas Nunc-Imuno™ Plate e FluoroNunc™ Module para o sorodiagnóstico da tuberculose



D= Doentes; ND= Não Doentes DO = Densidade Ótica

6.4 Análise do ELISA para pesquisa de IgG com antígeno PPD e BCG

Após a escolha da placa **FluoroNunc™ Module** fora feita uma comparação entre a reatividade entre PPD e BCG. Foram utilizados 8 amostras positivas para TB e 10 amostras de indivíduos saudáveis.

Nesta análise o *cut-off* foi estabelecido pela média das DOs das amostras negativas em cinco análises mais ou menos o desvio padrão excluindo as leituras extremas (**Tabela 3**). As amostras que apresentaram leituras extremas foram: Análise 1 (ND1, 9 e 10), análise 2 (ND 9 e 10), análise 3 (ND 10), análise 4 (ND 1 e 10) e análise 5 (ND 10).

Tabela 3: DO do ELISA-BCG e ELISA-PPD para o sorodiagnóstico da tuberculose em 5 reproduções

Tabela 3.A DO do PPD entre Doentes

PPD	DOENTES								BL
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
ANALI 1	0,49	0,23	0,26	0,36	0,33	0,38	0,23	0,08	0,503+/- 0,17
ANALI 2	0,51	0,43	0,33	0,3	0,27	0,32	0,33	0,24	0,48 +/- 0,18
ANALI 3	0,38	0,42	0,51	0,89	0,35	0,35	0,25	0,12	0,42+/- 0,14
ANALI 4	0,61	0,51	0,33	0,44	0,37	0,38	0,23	0,17	0,36+/- 0,12
ANALI 5	0,49	0,53	0,64	0,6	0,62	0,72	0,23	0,32	0,48+/- 0,3

D = Doentes; ANALI = Análise; BL = Border-line

Tabela 3.B DO do PPD entre Não Doentes

PPD	NÃO DOENTES										BL
	ND1	ND2	ND3	ND4	ND5	ND6	ND7	ND8	ND9	ND 10	
ANALI 1	0,79	0,29	0,21	0,38	0,41	0,66	0,18	0,23	0,04	0,009	0,503+/- 0,17
ANALI 2	0,44	0,2	0,23	0,37	0,46	0,6	0,17	0,22	0,063	0,012	0,48 +/- 0,18
ANALI 3	0,39	0,22	0,21	0,36	0,71	0,56	0,21	0,38	0,18	0,03	0,42+/- 0,14
ANALI 4	1,4	0,32	0,22	0,39	0,45	0,43	0,14	0,25	0,16	0,044	0,36+/- 0,12
ANALI 5	0,46	0,38	0,37	0,5	0,48	0,64	0,33	0,42	0,33	0,07	0,48+/- 0,3

ND = Não Doentes; ANALI = Análise; BL = Border-line

Tabela 3.C DO do BCG entre Doentes

BCG	DOENTES								BL
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
ANALI 1	0,85	0,22	0,45	0,41	0,26	0,46	0,53	0,37	0,52/0,22
ANALI 2	1,07	1,12	1,17	1,12	1,02	0,73	0,29	0,31	0,84/0,54
ANALI 3	0,53	0,38	0,64	0,55	0,5	0,82	0,38	0,8	0,94/0,64
ANALI 4	1,05	0,59	0,91	0,93	0,44	0,77	0,45	0,89	0,96/0,66
ANALI 5	0,73	0,41	0,72	0,66	0,44	0,6	0,44	0,57	0,82/0,52

ND = Não Doentes; ANALI = Análise; BL = Border-line

Tabela 3.D DO do BCG entre Não Doentes

BCG	NÃO DOENTES										BL
	ND1	ND2	ND3	ND4	ND5	ND6	ND7	ND8	ND9	ND10	
ANALI 1	0,36	0,25	0,33	0,44	0,6	0,71	0,55	0,22	0,19	0,02	0,53/0,19
ANALI 2	0,35	0,38	0,51	0,57	1,03	0,83	0,73	0,5	0,07	0,08	0,48/0,22
ANALI 3	0,25	0,75	1,53	1,43	0,83	1,16	0,89	0,71	0,71	0,59	0,42/0,08
ANALI 4	0,52	0,36	0,58	0,57	0,35	0,43	0,62	0,34	0,37	0,27	0,64/0,4
ANALI 5	0,47	0,47	0,94	0,6	0,29	0,25	0,33	0,24	0,42	0,4	0,5/0,44

ND = Não Doentes; ANALI = Análise; BL = Border-line

Após a determinação dos índices de DO, *border line* e *cut-off*, os valores foram transcritos para uma análise resumida na tabela abaixo. (**Tabela 4**).

Tabela 4: Comparação dos resultados obtidos no ELISA-PPD e ELISA-BCG frente à 18 amostras séricas em 5 reproduções

	Nº	Nº de Análises	Positivos (%)	Negativos (%)	Indeterminados (%)
PPD					
Não Doentes	10	5	12 (24%)	8 (16%)	30 (60%)
Doentes	8	5	14 (35%)	4 (10%)	22 (55%)
TOTAL	18	10			
BCG					
Não Doentes	10	5	18 (36%)	5 (10%)	26 (52%)
Doentes	8	5	13 (32,5%)	10 (25%)	17 (42,5%)
TOTAL	18	10			

6.5 Discriminação entre sadios e doentes pelo ELISA IgG para BCG

Entendendo que a avaliação dos parâmetros sorológicos dependem de arbitração dos pontos de corte, a determinação do *cut-off* foi estabelecida pela mediana de todas as amostras negativas por cada análise mais ou menos o desvio padrão, portanto, cada *cut-off* somente discriminou doentes e não doentes por análise. Foram feitas 5 análises e o *cut-off* oscilou de 0,3 à 1,19 dependendo da análise.

De acordo com os resultados analisados pelos diferentes índices de DO, foi feita a qualificação entre positivos, negativos e indeterminados e observado larga variação entre tais índices nas mesmas amostras em distintas análises. Deste ponto se arbitrou os valores limítrofes do *border-line* para qualificar as amostras que resultaram indeterminadas como positivas ou negativas e foram feitas as devidas comparações, bem como uma análise global (**Tabela 6 e 7**).

Admitindo os resultados indeterminados, o número de resultados positivos entre o grupo dos sadios foi de 39,58%, enquanto que entre o grupo dos doentes foi menor, 13,5%. Os resultados negativos entre os doentes foi de 27,5% e entre os não doentes foi de 10,41%. O número de indeterminados foi de 50% entre os sadios e 40% para os doentes (**Tabela 5**).

Tabela 5: Número de positivos e negativos entre TB pulmonar (doentes) e Controle sadio (não doentes) no ELISA-BCG.

	Controle sadio										TOTAL
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	
POSITIVO	2	2	1	3	0	4	1	3	3	0	19 (39,58%)
NEGATIVO	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	5 (10,41%)
INDETERMINADO	2	2	3	1	4	1	4	2	2	5	24 (50%)
											48

	TB pulmonar								TOTAL
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	
POSITIVO	4	3	2	1	0	2	1	0	13 (32,5%)
NEGATIVO	0	0	1	2	2	2	2	2	11 (27,5%)
INDETERMINADO	1	2	2	2	3	1	2	3	16 (40%)
									40

N= amostra negativa; P=amostra positiva

As tabelas abaixo (**Tabela 6 e 7**) destacam os parâmetros sorológicos quando considerado as amostras que resultaram indeterminadas como positivas e negativas. Os valores para os parâmetros sorológicos totais das amostras I=N foram respectivamente para sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN de: 63%, 61%, 63%, 39% e 53%. E para aquelas com I=P foram: 73%, 12%, 38%, 39% e 35%.

Tabela 6: Parâmetros sorológicos considerando os resultados sorológicos indeterminados como negativos no ELISA-BCG

		análise 1 BCG*			
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	S= 25%	VPP=66%
Tabela 6.A	POSITIVO (+)	2	1	SP= 90%	VPN= 60%
	NEGATIVO (-)	6	9	Acurácia= 61%	
		análise 2 BCG*			
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	S=38%	VPP= 37%
Tabela 6.B	POSITIVO (+)	3	5	SP=50%	VPN= 50%
	NEGATIVO (-)	5	5	Acurácia= 44%	
		análise 3 BCG*			
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	S= 25%	VPP=33%
Tabela 6.C	POSITIVO (+)	2	4	SP= 60%	VPN= 50%
	NEGATIVO (-)	6	6	Acurácia= 44%	
		análise 4 BCG*			
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	S= 63%	VPP=62%
Tabela 6.D	POSITIVO (+)	5	5	SP= 50%	VPN=62%
	NEGATIVO (-)	3	5	Acurácia=55%	
		análise 5 BCG*			
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	S=13%	VPP= 20%
Tabela 6.E	POSITIVO (+)	1	4	SP=60%	VPN=46%
	NEGATIVO (-)	7	6	Acurácia=38%	
Tabela 6.F	TOTAL			S=33%	VPP=39%
	POSITIVO (+)	13	20	SP= 61%	VPN= 53%
	NEGATIVO (-)	27	31	Acurácia=63%	

S=sensibilidade; SP=especificidade, VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo

* Indeterminado = Negativo

Tabela 7: Parâmetros sorológicos considerando os resultados sorológicos indeterminados como positivos no ELISA-BCG

	análise 1 BCG*			S= 63% VPP= 38%
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	SP= 20% VPN=40%
Tabela 7.A	POSITIVO (+)	5	8	Acurácia=38%
	NEGATIVO (-)	3	2	
	análise 2 BCG*			S=75% VPP=42%
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	SP=20% VPN=50%
Tabela 7.B	POSITIVO (+)	6	8	Acurácia=44%
	NEGATIVO (-)	2	2	
	análise 3 BCG*			S=38 % VPP=25%
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	SP=10% VPN=16%
Tabela 7.C	POSITIVO (+)	3	9	Acurácia=22%
	NEGATIVO (-)	5	1	
	análise 4 BCG*			S=100% VPP=44%
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	SP=0% VPN=0%
Tabela 7.D	POSITIVO (+)	8	10	Acurácia=44%
	NEGATIVO (-)	0	0	
	análise 5 BCG*			S=88% VPP=41%
		Doentes (+)	Não Doentes (-)	SP=0% VPN= 0%
Tabela 7.E	POSITIVO (+)	7	10	Acurácia=38%
	NEGATIVO (-)	1	0	
Tabela 7.F	TOTAL			S=73% VPP=39%
	POSITIVO (+)	29	45	SP=12% VPN=35%
	NEGATIVO (-)	11	6	Acurácia=38%

S=sensibilidade; SP=especificidade, VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo

* Indeterminado = Positivos

Os gráficos abaixo destacam a dispersão pelo valor de DO das amostras para pesquisa de BCG por análise.

Gráfico 2.1: Dispersão das DOs das amostras negativas obtidas no ELISA-BCG

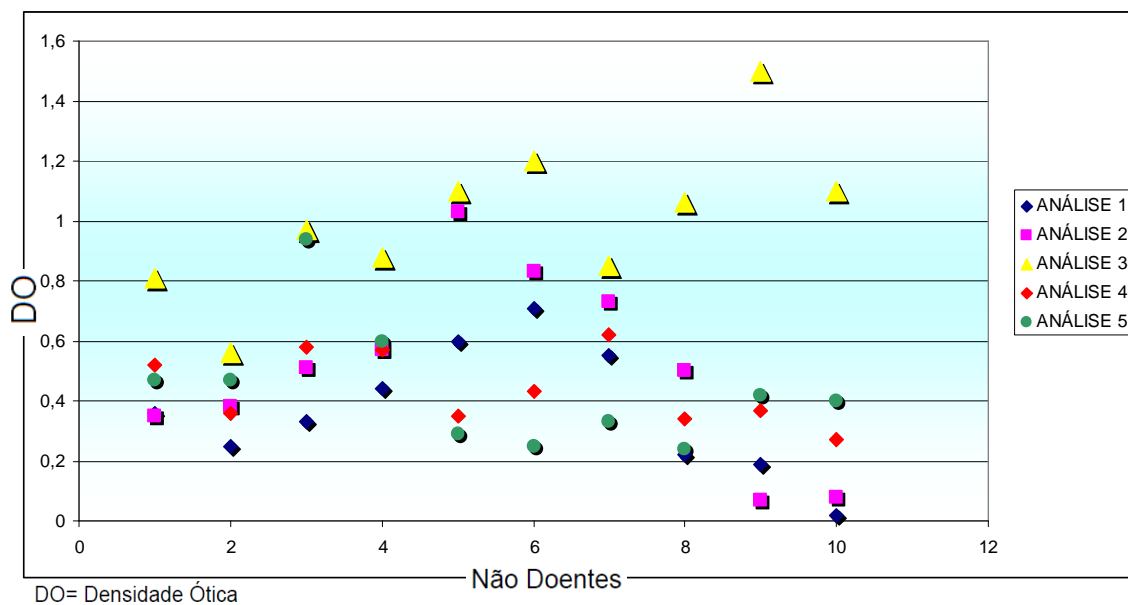
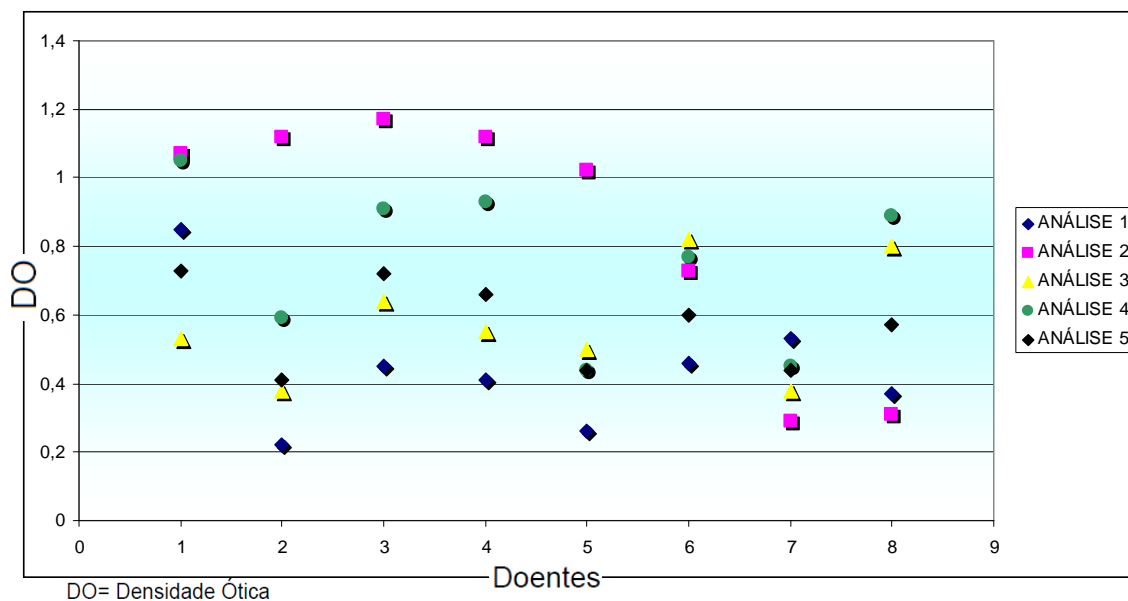


Gráfico 2.2: Dispersão das DOs das amostras positivas obtidas no ELISA-BCG



6.6 Comparação sorológica do ELISA com o kit Hexagon TB

As análises de comparação entre os distintos testes foram feitas através do cálculo da copositividade, conegatividade, concordância bruta, *kappa* e índice de reprodutibilidade. Os valores foram estimados considerando Indeterminado = Negativo

e Indeterminado = Positivo para o ELISA-BCG. Os quadros abaixo revelam os valores para cada análise, bem como, para análise global (**Tabela 9 e 10**).

Tabela 9: Comparação dos parâmetros do ELISA-BCG *versus* Hexagon TB considerando os resultados Indeterminados como Negativos

		HEXAGON TB				
		POSITIVO (+)	NEGATIVO (-)			
Tabela 9.A	ANALISE 1					
	BCG*	POSITIVO (+)	2	1	3	CoPBxH= 66,67%
		NEGATIVO (-)	4	11	15	CoPHxB= 33,33%
		6	12	18	CoNBxH= 73,33%	
					CoNHxB=91,6%	
					ConBruta= 72%	
Tabela 9.B	ANALISE 2					
	BCG*	POSITIVO (+)	2	6	8	CoPBxH= 25%
		NEGATIVO (-)	3	7	10	CoPHxB= 40%
		5	13	18	CoNBxH= 70%	
					CoNHxB= 53,84%	
					ConBruta= 50%	
Tabela 9.C	ANALISE 3					
	BCG*	POSITIVO (+)	2	5	7	CoPBxH=28,57%
		NEGATIVO (-)	4	7	11	CoPHxB= 33,33%
		6	12	18	CoNBxH=63,64%	
					CoNHxB=58,3%	
					ConBruta=50%	
Tabela 9.D	ANALISE 4					
	BCG*	POSITIVO (+)	1	5	6	CoPBxH=16,57%
		NEGATIVO (-)	5	7	12	CoPHxB=16,6%
		6	12	18	CoNBxH=58,33%	
					CoNHxB=58,3%	
					ConBruta=44,4%	
Tabela 9.E	ANALISE GLOBAL					
	BCG*	POSITIVO (+)	7	17	24	CoPBxH= 29,16%
		NEGATIVO (-)	16	32	48	CoPHxB= 30,40%
		23	49	72	CoNBxH= 66%	
					CoNHxB= 65,30%	
					ConBruta= 54,16%	
					Kappa= 43,50%	
					IR= 17,5%	

* Indeterminados = Negativos
CoPBxH= Co-positividade BCG x Hexagon TB
CoPHxB= Co-positividade Hexagon TB x BCG
CoNBxH= Co-negatividade BCG x Hexagon TB
CoNHxB= Co-negatividade Hexagon TB x BCG
ConBruta= Concordância Bruta
IR= Índice de Reprodutibilidade

7. Discussão

O presente estudo foi conduzido, inicialmente, para verificar a relevância antigênica do PPD e BCG. Como o BCG apresentou resultados mais consistentes, este complexo antigênico foi selecionado para a aplicação no ELISA. Posteriormente, avaliaram-se os parâmetros sorológicos do ELISA-BCG e do teste imunocromatográfico Hexagon TB com antígeno determinado A60.

Após a identificação da interferência do Tween 20 na lavagem das glicoproteínas do PPD (Julian *et al.*,2001), foi a *priore*, estabelecido que o ELISA utilizado neste trabalho sofreria modificações. Portanto, o Tween 20 foi excluído da técnica e utilizado o PBS sem o referido detergente. Por outro lado, Sant'Anna e colaboradores (1989; 2001) em seus estudos; *Tuberculose na infância: rotina para diagnóstico e tratamento* e *Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância*, mostraram resultados consistentes para o uso da técnica ELISA utilizando o PSB-Tween 20 para a lavagem das placas em sua metodologia, trabalhos estes, utilizados como referência para a elaboração da metodologia inicial desta dissertação que sofreu as devidas adequações.

Apesar deste trabalho apresentar limitações no tocante ao número amostral e ainda possuir distintos objetos de análise em relação aos trabalhos de Sant'Anna e colaboradores (1989; 2001), fica patente a fragilidade dos resultados destes autores. As demais referências bibliográficas onde o PPD foi utilizado com antígeno em placas de ELISA, a metodologia descrita não especificou com detalhes o preparo de soluções, de modo que não foi possível estabelecer comparações frente ao uso de tween 20.

A primeira etapa do trabalho consistiu em selecionar duas diferentes placas de fundo plano para serem usadas nos ELISAs posteriores. Foram, portanto, comparadas as placas Nunc-Imuno™ Plate e FluoroNunc™ Module. O antígeno usado foi o PPD e

ambas foram analisadas pela avidéz da reatividade estabelecida pelo DO. Não houve estabelecimento do *cut-off* e a comparação foi meramente descritiva. A **tabela 2** mostra os distintos valores da DO e revela que a placa FluoroNunc™ Module aderiu melhor os antígenos em relação a placa Nunc-Imuno™ Plate.

Comparou-se o ELISA-BCG e ELISA-PPD para pesquisa de anticorpos IgG em amostras de pacientes com tuberculose e indivíduos clinicamente saudáveis. Em decorrência do *n* amostral reduzido do estudo e da baixa reprodutibilidade das análises, a comparação dos parâmetros sorológicos foi estatisticamente “não-significante”. A **tabela 4** mostra a distinta amplitude da DO para BCG e para o PPD entre os grupos de doentes e saudáveis.

O número elevado de resultados indeterminados estabelecido pela média de todas as amostras negativas por cada análise mais ou menos o desvio padrão, revelou a dificuldade em discriminar doentes e saudáveis com ambos os antígenos. Esta análise mostrou também que o ELISA-BCG foi mais sensível que o ELISA-PPD em função do número de positivos identificados no grupo de doentes. Desconsiderando os resultados indeterminados, o ELISA-BCG se mostrou ainda mais sensível 78%, enquanto para o ELISA-PPD 60%. Sendo a tuberculose uma doença com elevado potencial de disseminação, o ELISA-BCG sendo mais sensível, de acordo com as amostras analisadas, seria o mais indicado, já que minimiza as chances de classificar um indivíduo doente como saudável.

A discriminação entre doentes e saudáveis com o ELISA-BCG fora feita posteriormente utilizando 10 amostras de saudáveis e 8 de doentes. Realizaram-se 5 repetições em distintos dias para se verificar a reprodutibilidade do teste. O **gráfico 1** revela que as mesmas amostras em análises distintas, resultaram em elevada diferença de DO, seja frente às amostras provenientes de indivíduos saudáveis, ou doentes. Estes resultados revelam que o uso de antígenos brutos compromete a reprodutibilidade do testes.

Entendendo I=P (**tabela 7**) a sensibilidade global de todas as análises (73%) foi expressivamente maior em comparação com a sensibilidade quando I=N (**tabela 6**) (33%), enquanto que os valores de especificidade se mostraram expressivamente menor para I=P (12%) em relação a I=N (61%). Comparando-se, portanto, tais resultados com aqueles apresentados pelo kit Hexagon TB, observamos que a sensibilidade para os

valores de I=P são mais próximos dos observados pelo kit Hexagon TB (71%). Entretanto, o *kappa* para esta análise se mostrou leve considerando I=P e moderado para I=N, o que de certa forma, revela a inconsistência dos testes. Esta comparação é reforçada pelo resultado da copositividade entre Hexagon TB vs BCG na **tabela 10**.

Os valores preditivos são influenciados pela prevalência da doença na população. Quanto maior a prevalência da doença, maior será o valor preditivo positivo e menor o valor preditivo negativo (Dercksen *et al.*, 2000). Entretanto, pela baixa reprodutibilidade do ELISA-BCG, a prevalência de pacientes com tuberculose no grupo de amostras analisada neste estudo, apresenta limitação atribuídas que não permitiram a análise de outros parâmetros estatísticos.

Possivelmente, a dificuldade de discriminação entre indivíduos doentes e não doentes por intermédio do ELISA-BCG se explica pela heterogeneidade dos epítomos e glicoproteínas presentes no corpo bacilar do *M. bovis*, mesmo na forma atenuada da BCG. Em comparação aos resultados observados no kit Hexagon TB, a elevada sensibilidade e especificidade descrita pelo fabricante (Hexagon TB, 2008), e de certa forma, seguida pelos resultados deste estudo, sugere que o uso de antígenos determinados como o A60 seja mais indicado para pesquisa de anticorpos anti-*M. tuberculosis*.

As reações cruzadas para outros grupos de *Mycobacterium*, com elevada descrição na literatura (Texeira, *et al.*, 2007; Julian *et al.*, 2001; Rajavelu, *et al.*, 2006; Dubón, 1993; Almeida, 2007; Van-lume, 2008; Delaocourt, 1993; Swaminathan, 1999), também podem explicar a positividade em algumas amostras entre os não doentes. Entretanto, a maior relevância para tais resultados, seja o fato das amostras serem provenientes da cidade do Rio de Janeiro, uma região onde a tuberculose é endêmica (Lazzarini, 2007; STOP TB, 2009). Sendo assim, a chance de que estes pacientes sejam infectados é relativamente elevada, comprometendo a acurácia do ELISA, sendo a IgG uma imunoglobulina de resposta crônica ou marcadora de resposta pós-vacinal, portanto, inadequada para discriminar um indivíduo doente de um infectado.

Apesar do kit Hexagon Tb fazer também pesquisa de IgM, em alguns estudos como os de Gupta e colaboradores (2002), esta imunoglobulina se mostrou insatisfatória para o uso clínico. Isto pode estar associado ao fato de que a tuberculose é uma doença com características clínicas crônicas, portanto um paciente doente, somente apresentaria

este anticorpo, de forma a ser pesquisado, na fase inicial da doença. Tendo em vista que muitos dos pacientes, somente procuram o serviço quando apresentam um quadro clínico mais avançado, é razoável afirmar que esta imunoglobulina não oferece segurança na discriminação da doença, já que na fase crônica os níveis séricos de IgM seriam praticamente vestigiais.

Por mais paradoxal ou ambíguo que as afirmações acima acerca da pesquisa da IgG e IgM possam parecer, tais resultados podem ser explicados em virtude do *M. tuberculosis* manter um nível de infecção latente, que pode ser demonstrada pela pesquisa da IgG, mas não o suficiente a ponto de estimular uma resposta de fase aguda marcada pela IgM.

Apesar dos inúmeros testes rápidos existentes no mercado apresentarem excelentes resultados para o diagnóstico da TB, o Ministério da Saúde do Brasil e a OMS não preconiza o uso destas técnicas na rotina e na clínica da tuberculose. Parte-se do pressuposto que as razões, mesmo que ainda não totalmente claras, se baseiem na heterogeneidade das populações que constituem o quadro de prevalência da doença em distintos locais. De certa forma, é razoável aceitar que ainda não haja um conjunto de trabalhos e, mesmo uma meta-análise que inclua os negativos no estudo, que considere as variáveis sociais-econômicas, biológicas e históricas do processo saúde-doença, entendendo a vulnerabilidade, seja ela individual, coletiva ou pragmática, que distintos grupos estão expostos em diferentes graus.

Portanto, acredita-se que a inclusão destas variáveis na elegibilidade dos grupos e populações para a pesquisa sorológica na TB seja o cerne para a adoção definitiva deste diagnóstico por parte das agências de controle de doenças. Por outro lado, apesar deste trabalho abordar uma perspectiva biológica da doença, não se pode deixar de lado o entendimento de que e a terapêutica restrita ao diagnóstico e uso de medicamentos, ou mesmo abordagens massivas e ousadas como DOTS, sejam as únicas formas de combate a doença. Como também já fora apresentado por Ruffino (1981), entender que as doenças ocorrem em uma relação espaço-tempo é fundamental para o controle da tuberculose.

Abordagens das doenças transmissíveis por uma perspectiva da ocupação do território, da historicidade e situação social, como no trabalho de Kawa e Sabroza (2002) para leishmaniose no Rio de Janeiro, ampliam o entendimento do processo de

transmissão, bem como agregam valor na formulação de estratégias de controle e formulação de políticas públicas de diagnóstico e tratamento de outros agravos.

As comparações entre distintas abordagens sorológicas para tuberculose permitem melhorar o entendimento das nuances do processo imunopatológico da doença. Por décadas o desconhecimento do mecanismo imunitário atrasou o entendimento da relação patógeno-hospedeiro e por consequência, o diagnóstico e possíveis formas de tratamentos e profilaxia. Mas, nos últimos 30 anos, novas pesquisas em imunodiagnóstico trazem luz a este processo e novos antígenos de maior relevância agregam valor a acurácia das técnicas sorológicas (Zhang *et al.*, 2009; Teixeira, *et al.*, 2007; Julian *et al.*, 2001; Rajavelu, *et al.*, 2006; Dubón, 1993; Almeida, 2007; Vanlume, 2008; Delaocourt, 1993; Swaminathan, 1999).

Não há no mercado acesso irrestrito a insumos necessários a composição de novas técnicas e plataformas de diagnóstico para a tuberculose. Antígenos determinados são, quase sempre, de uso exclusivo da indústria privada, não sendo acessíveis as instituições de pesquisas públicas.

É imprescindível o conhecimento da população de estudo e os detalhes que compõem as variáveis na formação da prevalência da tuberculose. Este estudo revela que com o devido conhecimento acima citado, a sorologia para TB pode ser usada na triagem de pacientes em clínica.

7.1 Limitações do estudo

As amostras usadas no estudo para formação dos grupos de sadios e doentes não discriminam raça, idade, portadores de HIV, diabéticos, usuários de corticóides de uso prolongado, grávidas e hansénicos. Também não foi critério de exclusão ou inclusão, amostras com resultados positivos ou negativos para teste de Montoux.

Todas estas categorias acima citadas podem ter grande influência nos testes sorológicos para tuberculose, o que até certo ponto, gera implicações temerárias nos resultados do ELISA.

Fundamentalmente, para resultados mais conclusivos, tais critérios de inclusão e exclusão, principalmente de HIV positivo, teste de Montoux e idade, se faz necessário. Entretanto, pelas dificuldades institucionais e limitação de tempo, a obtenção das

amostras não se concretizou da maneira como foi preconizada no desenho inicial do estudo.

O tamanho amostral caracteriza o desenho do estudo em descritivo, excluindo, desta forma, qualquer intenção de se estabelecer representatividade da população de inferência. Sendo assim, pode-se atribuir a esta dissertação, um valor estatístico “não-significativo”, mas que por outro lado, pode agregar elevada significância em estudos de intervenção clínica ou para pesquisas futuras, como este trabalho se propõe, por ser parte inicial do projeto *Desenvolvimento e avaliação dos parâmetros sorológicos de teste rápido de fluxo lateral*.

Apesar de se entender que há uma relação inversa entre o erro e o tamanho das amostras (amostras “grandes” estão associadas a erros “pequenos” e vice e versa), a magnitude do erro neste estudo, que possam ser atribuídas ao tamanho amostral, é desprezível tendo em vista as hipóteses iniciais e o desenho do estudo.

A determinação de parâmetros sorológicos confiáveis, para reproduzir a verdade dos fatos, foi comprometida pela ausência de reprodutibilidade das análises.

As distintas padronizações da técnica do ELISA para tuberculose, sugeridas e apresentadas pelas literaturas descritas neste trabalho, sugere limitações na comparação dos resultados.

8. Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se dizer que, apesar das limitações do estudo, antígenos brutos como a BCG e o PPD não discriminam indivíduos doentes de sadios e, portanto, não devem ser usados como imunorreagentes em técnicas para diagnóstico sorológico da tuberculose ativa.

O kit comercial Hexagon TB possui elevada acurácia e é o mais indicado ao diagnóstico da tuberculose, pois identifica melhor os indivíduos com tuberculose e os indivíduos sadios e pode ser usado na clínica ou bera de leito como triagem de pacientes.

9. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, C.M.C. *Reconhecimento dos antígenos recombinantes MPT-51 e GlcB do Mycobacterium tuberculosis por anticorpos séricos de indivíduos com tuberculose ativa*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil, 2007.

ARAÚJO, A.C.; TAKEDA, A.K.; HERRERO, C.B.; FREITAS, I.W.; NAKANDAKARE, I.K.; GUEDES, E.A.; BRÓLIO, R. Reatividade tuberculínica e resposta imunológica celular e humoral "in vitro" em doentes com tuberculose pulmonar. *Rev. Saúde Pública* . v. 17, n. 2, p. 94-111, 1983.

ASSIS, N C S; LOPES, M L; CARDOSO, N C; COSTA, M M; SOUSA, C DE O; LIMA, K V B Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 43, n.1, p. 1-7, 2007.

BANERJEE, S.; GUPTA, S. N.; SHENDE, S. K.; HARINATH B.C. Serodiagnosis of Tuberculosis Using Two ELISA Systems. *Indian. J. of Clin. Biochem.* v.18, n.2, p 48-53, 2003.

BANNON, M.J. BCG and tuberculosis. *Arch. Dis. Child.* v. 80, p. 80-83, 1999.

BARRERA, L.; MICELI, I.; RITACCO, V.; TORREA, G.; BROGLIA, B.; BOTTA, R.; MALDONADO, C.P.; FERRERO, N.; PINASCO, A.; CUTILLO, I.; CORNEJO, M.; PROKOPIO, E.; KANTOR, I. Detection of circulating antibodies to purified protein derivated by enzyme-linked immunosorbent assay: its potential for the rapid

- diagnosis of tuberculosis. *Pediatric Infections Disease Journal*. v. 8, p.763-767, 1989.
- BETHLEM, N.; BETHLEM, E.P.; RIBEIRO, S.N.; GERHARDT, F.G.; LAPA, E. S. JR.; MUZY, S.; CÔRREA, J.C.; MAGARÃO, S.L.; GONTIJO, F.P.P.; FONSECA, L.S.; SANT'ANNA, C.C.; HIJAR, M.A. *Tuberculose*. In: Newton Bethlem, editor. *Pneumologia*. 4a ed. São Paulo: Atheneu. P. 379-448, 1995.
- CAVALCANTE, S.C.; PACHECO, A.G.; LAURIA, L.; DERIEMER, K.; DUROVNI, B. Epidemiologia da tuberculose no Município do Rio de Janeiro. Revisão de casos notificados de 1995 a 1997. *Boletim Pneumologia Sanitária* v. 6, p. 81-92, 1998.
- CAMPOS, H. S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? *Boletim de Pneumologia Sanitária*. v. 7. n. 1, p. 51-64, 1999.
- COCITO, C.G. Properties of the mycobacterial antigen complex A60 and its applications to the diagnosis and prognosis of tuberculosis. *Chest*. v. 100, p. 1687-1693, 1991.
- DANIEL, T.M.; DEBANNE, S.M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *American Review of Respiratory Disease*. v.135, p. 1137-1151, 1987.
- DERCKSEN, D.P.; BRINKHOF, J.M.A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K.V.; BODE, C.F.; BAIRD, G.; KAMP, E.M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Microbiol*. n.75, p.167-175, 2000.
- DIAZ, E.S. *Inmunologia de tuberculosis: metodos diagnosticos*. In: *Seminário Regional de Tuberculosis* (Publicação Científica 511). Organización Panamericana de la Salud/Organización Mondiale de la Salud, 1988.

- DELACOURT, C.; GOBIN, J.; GAILLARD, J.L.; BLIC, J.; VERON, M.; SCHEINMANN, P. Value of ELISA using antigen 60 for the diagnosis of tuberculosis in children. *Chest*. v. 104, p. 393-398, 1993.
- DUBÓN, J.M.; RIGOUTS, L.; PORTAELS F. Diagnóstico Serológico de Tuberculosis: Utilización del antígeno P32 y el antígeno SLIV, para el diagnóstico rápido y precoz de la tuberculosis por la serología (ELISA) en el Hospital Regional IHSS en San Pedro Sula, Honduras, *Revista Medica Hondureña*. v. 61, p. 45-50, 1993.
- GERHARDT, G.; NATAL S.R.; PEREIRA, A.; LIMA, S.F.; PENNA, M.L.F.; CAMPOS, H.S.; WANKE, B.; WERNECK, A.; MANCEAU, J.N. Tuberculose pulmonar sem confirmação bacteriológica. *J. Pneumologia*. v. 14, Supl. 137, 1988.
- GREENBAUM, M.; BEYT, B.E.; MURRAY, P.R. The accuracy of diagnosing pulmonary tuberculosis at a teaching hospital. *Am. Ver. Respir. Dis.* v. 121, n. 3, p. 477-481, 1980.
- GUIMARÃES, M.C.S.; COUTINHO, S.G. and ANTUNES, C.M.F. Normas para sorologia de moléstias parasitárias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 20, n. 1, p. 55-58, 1987.
- GUIMARÃES, R X, *Clínica e laboratório: interpretação das provas laboratoriais- 2ª edição*, Editora Savier, 1978.
- GUPTA, S.; KUMARI, S.; BANWALIKAR, J. N. Diagnostic utility of the estimation of mycobacterial Antigen A60 specific immunoglobulins IgM, IgA and IgG in the sera of cases of adult human tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease*. v.76, p. 418-424, 1995.
- GUPTA, S.; BHATIA, R.; DATTA, K.K. Serological diagnosis of childhood tuberculosis by estimation of mycobacterial antigen 60 specific immunoglobulins in the serum. *Tubercle and Lung Disease*. v. 78, n. 1, p. 21-27, 1997.

- GUPTA, S.; NRAJ, S.; BANERJEE, S.; KUMAR, S.; REDDY, M.V.R.; BHASKAR, C. H. Analysis of SEVA TB ES-31 antigen specific immunoglobulins IgM, IgA and IgG in sera of sputum and culture positive pulmonary tuberculosis, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. v.17, n. 1, p. 5-8, 2002.
- HEXAGON TB; Patrícia C.C.Vilela, Laboratório Human GmbH-Alemanha. Bula de remédio. 2008.
- JULIAN, E.; CAMA, M.; MARTINEZ, P.; LUQUIN, M. An ELISA for five glycolipids from the cell wall of Mycobacterium tuberculosis: Tween 20 interference in the assay. *Journal of Immunological Methods*. v. 251, p. 21-30, 2001.
- KAWA, H. E SABROZA, P C. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. *Cad. Saúde Pública*, v.18, n.3, p. 853-865, 2002.
- LANDIS, R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, Texas, v.33, n.1, p.159-74, 1977.
- LAZZARINI, L.C.; HUARD, O.; RICHARD, C.; BOECHAT, N.L.; GOMES, H.M.; OELEMAN, N.; MARANIBIA, C.; KUREPINA, N.; SHASHKINA, E.; MELLO, C. Q.; GIBSON, A.L.; VIRGINIO, M.J.; MARSICO, A.G.; BUTLER, W.R.; KREISWIRTH, B.N.; SUFFYS, P.N.; LAPA E SILVA, J.R.; JOHN, L. Discovery of a Novel Mycobacterium tuberculosis Lineage That Is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* v.45, p. 3891-3902, 2007.
- LEQUIN, R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clinical Chemistry* v. 51, p. 2415-2418, 2005.
- MAITRA, A.; KUMAR, V. “O pulmão”, In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. (org.) Robbins Patologia Básica. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 572, 2008.
- MELLO, F.C.Q. *Modelos Preditivos para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar Paucibacilar* / Fernanda Carvalho de Queiroz Mello. (Tese de mestrado) Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2001.

NABESHIMA, S.; MURATA, M.; KASHIWAGI, K.; FUJITA, M.; FURUSYO, N.; HAYASHI, J. Serum antibody response to tuberculosis-associated glycolipid antigen after BCG vaccination in adults. *J. Infect. Chemother.* v.11, n. 5, p. 256-258, 2005.

OSLER W. Principles and Practice of Medicine. New York, Appleton, 1892.

PEREIRA, S.M.; DANTAS, O.M.S.; XIMENES, R.; BARRETO, M.L. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. *Rev. Saúde Pública*, v.41, suppl.1, p. 59-66, 2007.

RAJAVELU, P.J.; MADHUMATHI, D.D.; SULOCHANA, D.D. Humoral immune responses of normals and tuberculosis patients to multiple sonicate antigens prepared from the most prevalent strains of Mycobacterium tuberculosis. *Current Science*, v. 91, n. 7, p. 918-922, 2006.

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. *Bol. Pneumol. Sanit.* 2001 9(1): 35-59.

RUFFINO, N.A.; PEREIRA, J.C. Mortalidade por tuberculose e condições de vida. *Saúde em Debate* v. 12, p. 27-34, 1981.

SANT'ANNA, C.C. Tuberculose na infância: rotina para diagnóstico e tratamento. *Jornal de Pediatria*, v. 13, p. 44-49, 1989.

SANT'ANNA, C.C.; FONSECA, L.S.; SAAD, M.H.F. Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 34, n. 6, p.531-535, 2001.

SIQUEIRA, R.H.; RAFFUL M. "Tuberculose Pulmonar" In SILVEIRA I C DA. (org). *O Pulmão na prática médica*, 4ª edição-Rio de Janeiro, v.1, p-331-352, 1999.

- STITBULOV, R.; FILHO, E.J. “*Pneumopatias na Gestação*” In: FERNANDES, A L G; MENDES, E.S.P.S.; TERRA FILHO, M (org). SOCIEDADE PAULISTA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA /SPPT - *Pneumologia, atualização e reciclagem* Ed Atheneu, São Paulo, p. 28-29, 1999.
- SOUZA, S.M. Ciclo de um mito global; Tuberculose, *Revista Insight Inteligência*, v. 49, p. 49-59, 2003.
- STEAD, W.W.; BATES, J.H. Geographic and evolutionary epidemiology of tuberculosis. In Rom W, Garay S: Tuberculosis. New York, *Little Brown and Company*, p 77-83, 1995.
- STOP TB PARTNERSHIP Disponível em <http://www.stoptb.org/> no dia 7 de julho de 2009.
- SWAMINATHAN, S.P.; UMADEVI, S.; SHANTHA, A.; RADHAKRISHNAN, D.S.; MANJULA, D.S. Sero Diagnosis of Tuberculosis in Children Using Two ELISA Kits. *Indian. J. Pediatr.* v.66, p. 837-842, 1999.
- TEIXEIRA, H.C.; ABRAMO, C.; MUNK, M.E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Ribeirão Preto - SP, v. 33, p. 323-334, 2007.
- TOMAN, E. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los test diagnosticos. *Bolletín de la Union Internacional Contra la Tuberculosis*, v. 56, p. 19-30, 1981.
- VAN-LUME, D.S.M. *Diagnóstico imunológico da tuberculose infantil utilizando os antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10*, Dissertação (Tese de mestrado), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.
- VICENTIN, G.; SANTO, A.H.E.; CARVALHO, M.S. Mortalidade por tuberculose e indicadores sociais no município do Rio de Janeiro. *Ciênc. Saúde Coletiva*. v.7, n.2, p. 253-263, 2002.

ZHANG, S; JUN-WEI, Z.; ZHAN-QIANG, S.; EN-ZHUO, Y.; JI-HUAN, Y.; QI, Z.; GUO-LONG, Z.; HONG-MEI, Z.; YUAN-MING, Q.; HONG-HAI, W.; QING-WEN, S. Development and evaluation of a novel multiple-antigen ELISA for serodiagnosis of tuberculosis. *Elsevier*. v. 89, p. 278-284, 2009.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). *Global Tuberculosis Control*. 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)