Diagnóstico de tuberculose e de infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* em indivíduos infectados por VIH, baseado na enumeração de linfócitos T específicos

Diagnosis of tuberculosis and latent Mycobacterium tuberculosis infection in HIV infected patients based in the enumeration of specific T cells

/ J. Santos[1] / E. Valadas[1] / F. Antunes[1,2]

[1] Clínica Universitária de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de Lisboa
[2] Serviço de Doenças Infecciosas, Hospital de Santa Maria.

Correspondência:

Emília Valadas

Clínica Universitária de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de Lisboa
Av. Professor Egas Moniz
1649-035 Lisboa

Telefone: 217805274
Fax: 217976242
e-mail: evaladas@fm.ul.pt

/ Resumo

Introdução: As principais dificuldades no combate à tuberculose (TB) residem no facto de não se dispor de um método rápido de diagnóstico, bem como na dificuldade em detectar infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Este problema acentua-se em indivíduos infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH).
Objectivo: Avaliar um novo método (T-SPOT®.*TB*) de diagnóstico de infecção por MTB e de TB, baseado na quantificação de linfócitos T produtores de interferão gama.
Métodos: T-SPOT®.*TB* efectuado a doentes internados no Serviço de Doenças Infecciosas e a profissionais de saúde (PS) do Hospital Santa Maria (grupo controlo).
Resultados: Foram incluídos 79 indivíduos: 55 (70,0%) estavam infectados por VIH e 9 dos 11 indivíduos com TB estavam infectados por VIH (81,8%). T-SPOT®.*TB* foi reactivo em todos os doentes com TB. Dos indivíduos sem TB, 14/68 (20,6%) apresentaram T-SPOT®.*TB* reactivo, bem como 2/22 (9%) dos PS.
Conclusões: T-SPOT®.*TB* foi reactivo em 100% dos casos de TB, apesar de se tratar, na sua maioria, de indivíduos infectados por VIH. T-SPOT®.*TB* foi reactivo em cerca de 1/5 dos doentes sem diagnóstico de TB e em 9% dos indivíduos do grupo controlo, resultados que traduzem a importância que este teste pode vir a desempenhar no diagnóstico de infecção latente por MTB.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, interferão gama.

/ Abstract

Introduction: Major difficulties in the fight against TB are the absence of a fast diagnostic method capable of detecting TB, as well as a method that allows detecting latent infection by Mycobacterium tuberculosis (MTB). This issue is even more relevant in human immunodeficiency virus (HIV) infected patients.
Objective: To evaluate a new method (T-SPOT®.TB) for the diagnosis of MTB infection and TB, based on the quantification of T cells producing gamma interferon.

Material and Methods: T-SPOT®.TB was performed in patients admitted to the Department of Infectious Diseases and in a group of health care workers (HCW) at Hospital Santa Maria (control group).
Results: 79 patients were enrolled: 70,0% were HIV infected (n=55) and 81,8% (9/11) with TB were HIV infected. T-SPOT®.TB was reactive in all patients with TB, as well as in 14/68 patients (20,6%) admitted for other infectious causes, and two of the 22 HCW.
Conclusion: T-SPOT®.TB was reactive in 100% of the TB cases, even in a population with a very high rate of HIV. T-SPOT®.TB was reactive in ff1/5 of all patients with other diagnosis and 9% of the HCW, results that support the important role of this test in the diagnosis of latent infection with MTB.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis, diagnosis, gamma interferon.*

/ Introdução

A tuberculose (TB) permanece um dos mais graves problemas de saúde pública a nível mundial. Calcula-se que um terço da população mundial, o correspondente a cerca de dois biliões de indivíduos, está infectado por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e, consequentemente, em risco de desenvolver a doença[1]. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2004, terão ocorrido 8,9 milhões de novos casos de TB no mundo e 1,7 milhões de indivíduos morreram da doença[2,3]. A situação é de tal forma grave que, caso a tendência actual não seja invertida, em 2020 terão morrido perto de 60 milhões de indivíduos por TB[4]. Estes dados colocam a TB como a segunda causa mais comum de morte, por doença infecciosa, e a primeira causa de morte em adultos, apesar de existir uma terapêutica eficaz e de baixo custo, que permite curar mais de 95% dos casos[5-7]. O dramático aumento do número de casos de TB, a nível mundial, registado nas últimas décadas, reflectiu, em grande parte, a emergência de uma nova epidemia, a infecção por vírus da imunodeficiência humana (VIH). Segundo a OMS, estima-se que, pelo menos, 15% dos 1,7 milhões de indivíduos que morreram de TB, em 2004, estavam infectados por VIH[3].

Portugal permanece o país com a mais elevada taxa de incidência de TB na Europa Ocidental, e o quarto da União Europeia (UE), tendo registado 37,1 casos por 100.000 habitantes em 2004 (média na UE foi de 12,6/100.000 habitantes)[8,9]. Mais ainda, em Portugal, a sobreposição entre a população infectada por VIH e a população infectada por MTB é elevada, comparável apenas à dos países do Leste Europeu, não sendo, por isso, de estranhar que a TB constitua o critério definidor de SIDA mais frequente e esteja presente em cerca de 50% dos doentes[10,11].

A prova tuberculínica ou de Mantoux é o mais antigo teste de diagnóstico, em uso na prática clínica, sendo largamente utilizado no rastreio da infecção por MTB[12,13]. Trata-se de um teste de baixo custo, relativamente fácil de executar e que não necessita de infrastruturas laboratoriais, o que tem permitido a sua ampla aplicação, mesmo em condições de recursos limitados. No entanto, existem diferentes factores que influenciam a sensibilidade e especificidade da prova de Mantoux e, consequentemente, põem em causa a fiabilidade dos resultados obtidos.
A especificidade da prova de Mantoux está condicionada pela ocorrência de reacções cruzadas, visto que uma parte significativa dos antigénios que constituem a tuberculina (*purified protein derivate* ou PPD) são partilhados por MTB e outras micobactérias, como *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) e a maioria das micobactérias não tuberculosas ou ambientais (MNT)[14]. Desta forma, uma reacção cutânea à administração de tuberculina pode significar TB, infecção latente por MTB, vacinação com BCG ou exposição a MNT[15]. Por outro lado, a sensibilidade desta prova está dependente do estado imunológico do indivíduo, uma vez que condições que interfiram com a capacidade do sistema imunológico

em desenvolver uma resposta celular de hipersensibilidade retardada, como é o caso da infecção por VIH, neoplasias ou fármacos imunossupressores, induzem, com frequência, resultados falso negativos[16,17].

Nos últimos anos, tem havido um esforço para desenvolver novas metodologias, não só para o diagnóstico de TB mas, também, de infecção por MTB. Entre os novos métodos desenvolvidos encontra-se a detecção, *in vitro*, de interferão gama (IFN-γ) produzido por linfócitos T, quando expostos a proteínas específicas de MTB, como ESAT-6 (*early secretory antigenic target* 6) e CFP-10 (*culture filtrate protein* 10)[18,19]. Estas proteínas, codificadas por genes localizados na *region of difference* 1 (RD1) do genoma de MTB, são mais específicas que PPD, uma vez que os genes que as codificam estão ausentes do genoma das diferentes estirpes de BCG e da grande maioria das MNT[19-22].

A produção de IFN-γ pode ser quantificada através da técnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou recorrendo à enumeração dos linfócitos T produtores de IFN-γ, através do método ELISPOT (*enzyme-linked immunospot assay*). Tendo por base as duas formas de detecção de IFN-γ, mas utilizando as mesmas proteínas estimuladoras (ESAT-6 e CFP-10), foram desenvolvidos dois testes comerciais distintos, o QuantiFERON®-TB Gold (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Austrália), que utiliza o método ELISA e T-SPOT®.*TB* (Oxford Immunotec, Oxford, UK), que faz uso do método ELISPOT. No entanto, apesar de se basearem em metodologias diferentes, estes dois testes apresentam diversas vantagens em comum, quando comparados com a prova de Mantoux[18,23,24,25]: (i) utilizam antigénios mais específicos que PPD, minimizando a possibilidade de ocorrência de reacções cruzadas; (ii) o indivíduo só se desloca uma vez para realizar o teste, visto que apenas é necessário realizar uma colheita de sangue; (iii) a estimulação dos linfócitos T é realizada *in vitro*, não sendo necessária a inoculação de proteínas estranhas no indivíduo, como acontece na prova de Mantoux; (iv) a interpretação do teste é objectiva, não dependendo do operador, ao contrário do que acontece na medição da indução resultante da inoculação da tuberculina; (v) o tempo necessário para a obtenção de um resultado é menor (16 a 24 horas) que o da prova de Mantoux (48 a 72 horas); (vi) os testes incluem um controlo positivo, o que permite determinar a viabilidade e funcionalidade dos linfócitos T presentes em cada amostra e, consequentemente, identificar possíveis casos de anergia.

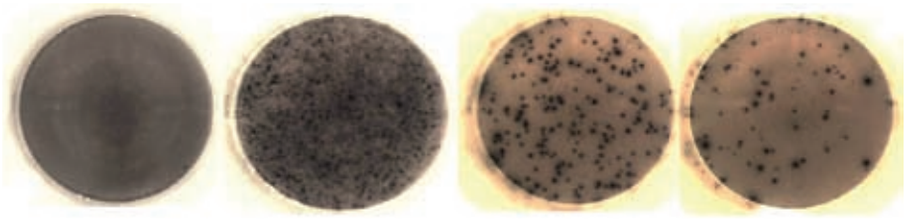

Figura 1 — Exemplo de um resultado reactivo para ESAT-6 e CFP-10, usando o método ELISPOT. Cada um dos pontos (*spots*) representa um linfócito T CD4+ que produziu IFN-γ quando entrou em contacto com os antigénios.

Mas, apesar de apresentarem as mesmas vantagens, em relação à prova de Mantoux, existem diferenças, em termos de sensibilidade, entre os dois testes de detecção de IFN-γ, especialmente quando aplicados em populações com alterações na resposta imune, como são o caso dos indivíduos imunocomprometidos e das crianças.

O efeito da imunodepressão, associado à infecção por VIH, na sensibilidade de T-SPOT®.*TB* foi avaliado num estudo envolvendo indivíduos infectados por VIH e TB, tendo apresentado uma sensibilidade de 90%[26]. A avaliação de T-SPOT®.*TB* em crianças, foi realizada através de um estudo envolvendo crianças africanas, oriundas de uma região de elevada prevalência de infecção por VIH. Em crianças com TB, a sensibilidade de T-SPOT®.*TB* foi de 83%, significativamente mais elevada que a sensibilidade da prova tuberculínica (63%)[27]. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a sensibilidade da prova de Mantoux diminui drasticamente quando determinada em crianças com idade inferior a três anos (51%), co-infectadas por VIH (36%) ou desnutridas (44%), enquanto T-SPOT®.*TB* não foi significativamente afectado por estes factores, apresentando uma sensibilidade de 85%, 73% e 78%, respectivamente[27]. Estes resultados permitiram concluir que, em crianças, a sensibilidade de T-SPOT®.*TB* é superior à da prova tuberculínica.

O efeito da imunossupressão, nos resultados obtidos por QuantiFERON®-TB foi igualmente avaliado em alguns estudos[28-32], que permitiram concluir que este teste, quando utilizado em indivíduos infectados por VIH, com contagens baixas de linfócitos T CD4+, está associado a uma maior probabilidade de ocorrerem resultados indeterminados. Num trabalho[33], que comparou directamente os dois métodos, na mesma população, os resultados indeterminados, associados a situações de imunossupressão, foram, significativamente, mais frequentes com QuantiFERON®-TB (11%, 43/383) do que com T-SPOT®.*TB* (3%, 12/383). Neste estudo, idade inferior a cinco anos foi significativamente associada a resultados indeterminados, mas apenas com QuantiFERON®-TB.

Comparando os resultados obtidos pelos diferentes estudos referidos, é possível concluir que T-SPOT®.*TB* não é influenciado, de forma significativa, pela idade ou grau de imunossupressão, ao contrário do que parece acontecer com QuantiFERON®-TB.

O objectivo deste estudo foi avaliar um método de diagnóstico (T-SPOT®.*TB*) de infecção por MTB e de TB, em indivíduos com e sem infecção por VIH, com base na produção de IFN-γ por linfócitos T específicos.

/ Material e Métodos

População estudada

Foram incluídos doentes do sexo masculino internados, entre Novembro de 2005 e Maio de 2006, no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de Santa Maria (HSM), Lisboa, e que, voluntariamente, aceitaram participar no estudo. O grupo controlo foi constituído por profissionais de saúde dos Serviços de Doenças Infecciosas e de Patologia Clínica/Microbiologia do HSM.

A todos os indivíduos que integraram o estudo foi pedido o consentimento informado, tendo sido excluídos aqueles que não apresentavam condições para dar o seu consentimento de participação no estudo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do HSM.

Métodos

A colheita de sangue periférico (18mL) foi realizada durante as primeiras 48 horas de internamento. No caso do grupo controlo, as amostras foram colhidas ao longo do período de realização do estudo. As amostras foram processadas, pelo mesmo investigador, até quatro horas após a colheita. A cada amostra de sangue foi adicionado igual volume de RPMI 1640 Medium (GIBCO®, Invitrogen, Espanha) e, em seguida, foram separadas as células mononuclerares (PBMC) através de uma solução de gradiente (Lymphodex, Inno-train Diagnostik GmbH, Alemanha). Realizaram-se duas lavagens das PMBC com RPMI 1640 Medium e, depois da remoção do sobrenadante da última lavagem, o precipitado foi ressuspendido com 1mL de AIM V® Medium (GIBCO®, Invitrogen, Espanha). A viabilidade dos PBMC foi determinada utilizando o corante de exclusão azul de tripano a 0.4% (GIBCO®, Invitrogen, Espanha), de forma a obter uma suspensão de células viáveis na concentração de 2,5 x 10^5 PBMC/mL.

A placa de reacção e os restantes reagentes necessários para realizar o T-SPOT®.*TB* (Oxford Immunotec, Reino Unido) foram retirados do frigorífico de forma a atingirem a temperatura ambiente. T-SPOT®.*TB* foi realizado segundo as indicações estipuladas pelo fabricante[14,26]. Após a realização do teste, procedeu-se à contagem dos halos ou *spots* existentes no fundo de cada poço, em que cada *spot* corresponde a um linfócito T que, em resposta ao antigénio a que foi exposto, produziu IFN-γ (figura 1). Todas as manipulações realizadas, desde a separação das PBMC até à realização de T-SPOT®. *TB*, com excepção das centrifugações, foram desenvolvidas em câmara de fluxo laminar vertical, de forma a limitar a possibilidade de contaminação.

Interpretação dos resultados

O teste é considerado válido quando o controlo negativo apresenta menos de 10 *spots* e o controlo positivo mais de 20 *spots*.

Um resultado é considerado reactivo, caso sejam enumerados seis ou mais *spots* no poço contendo ESAT-6 ou CFP-10, o que indica que a amostra contém linfócitos T $CD4^+$ capazes de reconhecer os antigénios ESAT-6 e/ou CFP-10 e, consequentemente, produzir IFN-γ. Um resultado é considerado não reactivo quando são enumerados menos de seis *spots* nos poços contendo ESAT-6 ou CFP-10.

Considera-se que um resultado é indeterminado, quando são enumerados mais de 10 *spots* no controlo negativo ou menos de 20 *spots* no controlo positivo.

Análise estatística

O programa *Microsoft Office Excel*® 2002 foi usado para elaborar a base de dados. Para a análise estatística dos dados foram aplicadas técnicas de estatística descritiva (média, mediana, entre outras) assim como tabelas de contingência (cálculo da sensibilidade e especificidade).

/ Resultados

Caracterização da população

Foram incluídos 79 indivíduos do sexo masculino, com uma média de idades de 40 anos (mínimo 16 anos, máximo 76 anos). A maioria tinha idades compreendidas entre os 30 e os 49 anos (n=51; 64,5%). Em relação à origem geográfica, mais de 80% dos indivíduos eram portugueses (n=64; 81,0%) e os restantes eram naturais de países africanos (n=9; 11,4%) [S. Tomé e Príncipe (n=3; 3,8%), Angola (n=2; 2,5%), Cabo Verde (n=2; 2,5%) e Guiné-Bissau (n=2; 2,5%)], Brasil (n=3; 3,8%), Ucrânia (n=1; 1,3%), Venezuela (n=1; 1,3%) e Índia (n=1; 1,3%). Dos 64 portugueses, 95% residiam em Portugal (n=61) e os restantes em Angola (n=3). Os indivíduos naturais de outros países (n=15) apresentaram uma mediana de permanência em Portugal de 10,5 anos (mínimo 4 anos, máximo 30 anos).

Caracterização da infecção por VIH na população

A detecção de anticorpos anti-VIH foi determinada em todos os doentes, verificando-se que cerca de 70% (n=55; 69,6%) estavam infectados por VIH-1. Todos os resultados foram confirmados por *Western Blot*. A contagem de linfócitos T $CD4^+$, disponível em 54 dos 55 doentes com infecção por VIH, variou entre 0,1 e 1111,4/mm^3 (mediana: 92,0 linfócitos T $CD4^+$/mm^3). De entre os 33 indivíduos (61,1%) que apresentavam valores de linfócitos T $CD4^+$ inferiores a 200/mm^3, cerca de dois terços (n=22; 67%) apresentava contagem de linfócitos T $CD4^+$ inferior a 50/mm^3.

Avaliação dos resultados obtidos com T-SPOT®.*TB*

Todas as amostras testadas apresentaram um controlo negativo não reactivo (n=79; 100,0%). Onze das 79 amostras (13,9%) apresentaram um controlo positivo fracamente reactivo (<20 *spots*) ou não reactivo, levando a que os resultados obtidos nessas amostras, para os antigénios CFP-10 e ESAT-6, não fossem considerados válidos (resultados indeterminados).

TABELA I – RELAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE T-SPOT®.*TB* E DIAGNÓSTICO CLÍNICO.

Diagnóstico		T-SPOT®.*TB*					
		Reactivo		Não Reactivo		Indeterminado	
	n	n	%	n	%	n	%
Tuberculose	11	11	100,0	0	0	0	0
Pneumonia	15	2	13,3	6	40,0	7	46,7
Hepatite	5	0	0,0	5	100	0	0,0
Infecção renal	4	1	25,0	3	75,0	0	0,0
Meningite	4	0	0,0	3	75,0	1	25,0
Endocardite infecciosa	3	2	66,7	1	33,3	0	0,0
Sífilis	2	2	100,0	0	0,0	0	0,0
Acidente vascular cerebral	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
Septicémia	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
Linfoma do sistema nervoso central	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
Mononucleose infecciosa	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
Retinite a vírus citomegalico	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
Infecção por *Salmonella paratyphi*	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
Síndrome febril prolongada	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
Outros	28	0	0,0	25	89,3	3	10,7
Total	79	25		43		11	

Entre as 68 amostras avaliadas, 25 amostras (36,8%) tiveram um T-SPOT®.*TB* reactivo, em que 24,1% (n=19) foram reactivas para ESAT-6 e 27,8% (n=22) foram reactivas para CFP-10. As restantes 43 amostras (63,2%) apresentaram resultado não reactivo.

Relação entre resultados de ELISPOT e diagnóstico

A infecção por VIH foi o diagnóstico mais frequente na população estudada (n=55; 70,0%), sendo seguida por pneumonia (n=15; 19,0%), tuberculose (n=11; 13,9%), hepatite (n=5; 6,3%), infecção renal (n=4; 5,1%), meningite (n=4; 5,1%), endocardite infecciosa (n=3; 3,8%) e sífilis (n=2; 2,5%). Em vários casos a infecção por VIH surgiu associada a uma outra patologia.

Todos os doentes com diagnóstico de TB, confirmado por exame cultural, apresentaram ELISPOT reactivo (n=11; 100%). Entre os indivíduos com outros diagnósticos (n=68), 14 (20,6%) apresentaram ELISPOT reactivo, 43 (63,2%) apresentaram ELISPOT não reactivo e 11 (16,2%) apresentaram ELISPOT indeterminado (tabela I).

Relação entre resultados de ELISPOT, tuberculose e infecção por VIH

ELISPOT foi reactivo em nove dos 24 indivíduos sem infecção por VIH (37,5%) e em 16 dos 55 indivíduos infectados por VIH (29,1%). Entre os 11 casos com ELISPOT reactivo e diagnóstico de TB, nove (81,8%) estavam infectados por VIH (figura 2).

Foi possível relacionar os resultados de ELISPOT e contagem de linfócitos T $CD4^+$ em 54 dos 55 indivíduos infectados por VIH. Dos indivíduos que apresentaram ELISPOT reactivo, mais de metade (n=8; 53,3%) tinham contagem de linfócitos T $CD4^+$ inferior a 200/mm^3, 20,0% (n=3) apresentavam contagens entre 200 a 500 linfócitos T $CD4^+/mm^3$, e em 26,7% (n=4) a contagem foi superior a 500 linfócitos T $CD4^+/mm^3$.

Os doentes infectados por VIH, com diagnóstico de TB e ELISPOT reactivo (n=9) apresentavam, em 55,6% dos casos (n=5), contagem de linfócitos T $CD4^+$ inferior a 200/mm^3, 22,2% (n=2) apresentavam contagem entre 200 a 500 linfócitos T $CD4^+/mm^3$ e 22,2% (n=2) apresentavam contagem superior a 500 linfócitos T $CD4^+/mm^3$.

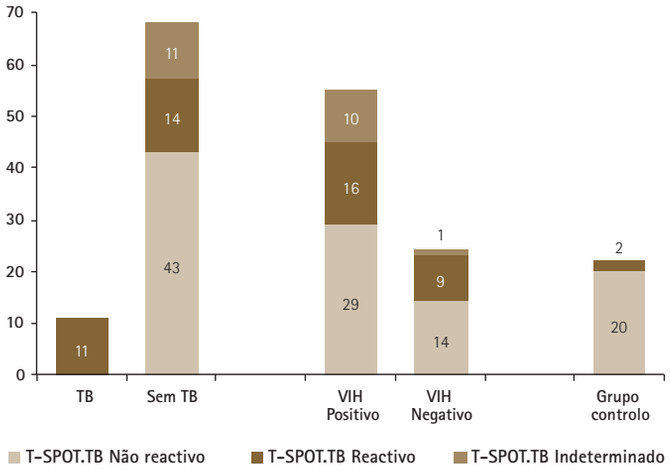

Figura 2 — Resultados de T-SPOT®.*TB* em indivíduos com tuberculose (TB), sem TB, infectados por VIH, não infectados por VIH e grupo controlo.

Entre os indivíduos com infecção por VIH e ELISPOT não reactivo, a maioria (n=20; 69,0%) apresentava contagem de linfócitos T $CD4^+$ inferior a 200/mm^3, 24,1% (n=7) apresentava contagem de linfócitos T $CD4^+$ entre 200 e 500/mm^3 e 6,9% (n=2) apresentava mais de 500 linfócitos T $CD4^+$/mm^3.

Dos 11 indivíduos com um resultado de ELISPOT indeterminado, 10 eram relativos a indivíduos infectados por VIH. Em 50,0% (n=5) destas 10 amostras o número de linfócitos era inferior a 200 linfócitos T $CD4^+$/mm^3, enquanto 40,0% (n=4) apresentavam uma contagem de linfócitos T $CD4^+$ entre 200 e 500/mm^3 e 10,0% (n=1) apresentava um número de linfócitos T $CD4^+$ superior a 500 /mm^3.

Sensibilidade, especificidade e valor preditivo de T-SPOT®.*TB*

Para calcular a sensibilidade, especificidade e valor preditivo, foram considerados como resultados verdadeiramente positivos todos os que apresentaram exame cultural positivo para MTB e ELISPOT reactivo (n=11).

Em relação à totalidade de doentes incluída no estudo (n=68), T-SPOT®.*TB* apresentou sensibilidade de 100,0%, especificidade de 75,4%, valor preditivo positivo de 44,0% e valor preditivo negativo de 100,0%. A percentagem de falsos positivos foi de 24,6% (n=14). Desta avaliação foram excluídos 11 indivíduos com resultados indeterminados no T-SPOT®.*TB*.

Nos indivíduos infectados por VIH (n=45), T-SPOT®.*TB* apresentou sensibilidade de 100,0%, especificidade de 80,6%, valor preditivo positivo de 53,3% e valor preditivo negativo de 100,0%. Neste grupo, a percentagem de falsos positivos foi de 19,4% (n=7). Desta avaliação foram excluídos os 10 indivíduos VIH positivos que revelaram resultados indeterminados no T-SPOT®.*TB*.

Nos indivíduos não infectados por VIH (n=23), T-SPOT®.*TB* apresentou sensibilidade de 100,0%, especificidade de 66,7%, valor preditivo positivo de 22,2% e valor preditivo negativo de 100,0%. A percentagem de falsos positivos neste grupo de doentes foi de 33,3% (n=7). Desta avaliação foi excluído um indivíduo sem infecção por VIH visto ter revelado um resultado indeterminado no T-SPOT®.*TB*.

Caracterização do grupo controlo

O grupo controlo (n=22) foi composto, na sua maioria, por indivíduos do sexo feminino (n=17; 77,3%) e apresentou uma mediana de idades de 40,5 anos (mínimo 27 anos, máximo 60 anos). Todos os profissionais de saúde disseram desconhecer a existência de qualquer doença crónica, incluindo a infecção por VIH. De entre os 22 indivíduos do grupo controlo, dois apresentaram ELISPOT reactivo e os restantes 20 apresentaram um resultado não reactivo (figura 2). Neste grupo, a especificidade do teste foi de 90,9% e o valor preditivo negativo foi de 100%.

/ Discussão

O presente estudo pretendeu avaliar a capacidade de um novo método (T-SPOT®.*TB*) no diagnóstico de TB e de infecção por MTB, em indivíduos infectados e não infectados por VIH.

Em relação aos aspectos associados à aplicação de uma nova metodologia, esta revelou-se fácil de implementar (não necessitando de material laboratorial diferenciado), de executar e de interpretar (a contagem de *spots* foi possível recorrendo a uma lupa).

O teste apresentou sensibilidade e especificidade elevadas, mesmo quando aplicado a indivíduos imunocomprometidos (69,6% dos doentes incluídos neste estudo tinham infecção por VIH), ao contrário do que seria de esperar com o teste de Mantoux. De facto, num estudo recente realizado na área de Lisboa[34], o teste de Mantoux revelou sensibilidade de 91,0% em indivíduos sem infecção por VIH, mas nos indivíduos infectados por VIH o valor da sensibilidade desceu para 45,0%. No presente estudo, todos os doentes com TB confirmada por exame cultural, apresentaram ELISPOT reactivo (n=11, 100%), pelo que a sensibilidade do teste foi de 100,0%, independentemente se determinada para indivíduos infectados ou não infectados por VIH. Este valor de sensibilidade é semelhante ao obtido noutros estudos, nos quais obtiveram valores entre 77 e 100%[14,26,27,35-41]. Comparando os resultados de sensibilidade dos dois testes, prova de Mantoux e T-SPOT®.*TB*, verifica-se haver diferença entre os resultados, especialmente em relação aos indivíduos infectados por VIH (45,0% e 100,0%, respectivamente). Esta diferença, na sensibilidade dos dois testes, foi igualmente demonstrada por outros estudos[17,27,29,36-38], onde a prova de Mantoux apresentou sistematicamente sensibilidade inferior à de T-SPOT®.*TB*. A imunodepressão, resultante da infecção por VIH, parece, assim, não ter impacto na sensibilidade de T-SPOT®.*TB*, ao contrário do que acontece com a prova de Mantoux. Nesta prova, quanto menor for a contagem de linfócitos T $CD4^+$/mm^3 maior a probabilidade de ocorrerem resultados falso negativos[42,43], por haver

menor capacidade de dar origem a uma resposta de hipersensibilidade retardada. No caso do ELISPOT, apenas é necessário que existam, em circulação, linfócitos T CD4+, capazes de reconhecer os antigénios, para que seja possível visualizar a resposta. Uma das razões para não se ter efectuado a prova de Mantoux, em simultâneo com o ELISPOT, foi o facto de não se esperar resultados conclusivos, já que, mesmo nos doentes com TB confirmada, apenas metade apresentava linfócitos T CD4+ superiores a 200/mm^3. Em suma, os resultados deste trabalho demonstram que T-SPOT®.*TB* pode ser utilizado em doentes com infecção por VIH, mesmo em casos de imunodepressão acentuada.

Os linfócitos T responderam de forma diferente aos dois antigénios específicos de MTB, utilizados no ELISPOT, apresentando maior reactividade a CFP-10 (n=23, 92,0%) do que a ESAT-6 (n=19, 76%). Estes resultados estão em consonância com os obtidos em estudos realizados na Índia[14] e Dinamarca[44], embora outros estudos mostrem que a resposta a CFP-10 foi inferior a ESAT-6[26,45] Esta variabilidade, na resposta aos antigénios, pode estar associada ao número de bactérias viáveis e ao tempo de doença, ao nível de expressão dos antigénios, por parte da estirpe de MTB infectante, e às características genéticas do processamento de antigénios e resposta imune do hospedeiro[46].

A especificidade de T-SPOT®.*TB*, tendo em vista os resultados obtidos para os 68 indivíduos estudados, foi de 80,6% para os indivíduos infectados por VIH e de 66,7% para os não infectados por VIH. Estes valores de especificidade reflectem o facto de terem ocorrido resultados reactivos em indivíduos sem diagnóstico de TB (n=14, 20,6%).

Como a incidência de TB em Portugal continua a ser a mais elevada da Europa Ocidental (~37/100.000, em 2004), é legítimo pressupor que exista, de igual modo, uma elevada taxa de infecção latente na população portuguesa. Assim, não se pode dizer que o teste apresentou uma especificidade baixa, especialmente nos indivíduos não infectados por VIH, sem antes descartar a possibilidade de os resultados reactivos corresponderem a casos de infecção latente por MTB.

A especificidade de T-SPOT®.*TB*, no grupo controlo, foi de 90,9%, valor próximo ao obtido noutros estudos, que também calcularam a especificidade do teste num grupo controlo: num dos estudos a especificidade foi de 92%[37] e nos restantes foi 100%[14,26,41,47].

A especificidade da prova de Mantoux, num estudo que avaliava o papel deste teste no diagnóstico da TB em Portugal[34], foi de 81%, valor inferior ao obtido pelo T-SPOT®.*TB* (90,9%). Na realidade, esta diferença de especificidade entre os dois testes é esperada, visto que T-SPOT®.*TB* utiliza antigénios específicos de MTB (ESAT-6 e CFP-10), ao contrário do que acontece na prova de Mantoux (PPD). Este facto, permite diminuir, significativamente, a possibilidade de ocorrência de resultados falso positivos como reflexo de reacções cruzadas devido, por exemplo, à vacinação com BCG.

Nos últimos anos, a coincidir com o aumento do número de casos de infecção por VIH e com a possibilidade de uma maior taxa de reactivação de infecção latente, tem-se vindo a debater a necessidade de fazer quimioprofilaxia a estes indivíduos. No entanto, não existindo um teste que pudesse detectar infecção latente por MTB, com elevado grau de certeza, todas as estratégias de quimioprofilaxia nestes indivíduos se baseiam, por agora, na prova de Mantoux ou no grau de imunodepressão, assumindo que o risco de reactivação de infecção latente é superior nestes indivíduos. No entanto, as limitações desta prova são bem conhecidas, em especial nos indivíduos com infecção por VIH e imunodepressão associada. Nestas situações, a prova de Mantoux é, numa elevada percentagem dos casos, não reactiva. Num estudo que avaliou T-SPOT.*TB*, no diagnóstico de infecção por MTB[48], em indivíduos com infecção por VIH e com diferentes contagens de linfócitos T CD4+, concluiu-se que a imunossupressão associada à infecção por VIH não interferia com o teste, visto que apenas 3% (28/29) dos indivíduos avaliados tiveram um resultado indeterminado. Nenhum dos indivíduos, com contagem inferior a 200 linfócitos T CD4+/mm^3, apresentou um resultado indeterminado, o que indica que o resultado de T-SPOT®.*TB* não é influenciado pela imunodepressão.

No presente estudo, 11 indivíduos apresentaram um resultado de T-SPOT®.*TB* indeterminado (16,2%), dos quais 10 estavam infectados por VIH. Em 50% destas 10 amostras o número de linfócitos T CD4+ era inferior a 200/mm^3, enquanto 40% apresentava contagem de linfócitos T CD4+ entre 200 e 500/mm^3 e 10% apresentava um número de linfócitos T CD4+ superior a 500/mm^3. Desta forma, é possível verificar que os resultados indeterminados ocorreram em indivíduos com contagens de linfócitos T CD4+ superiores a 200/mm^3 e não, predominantemente, em indivíduos com marcada imunodepressão. Mais ainda, 53,3% dos resultados reactivos, em indivíduos infectados por VIH, ocorreram em indivíduos com valores de linfócitos T CD4+ inferiores a 200/mm^3, ou seja, com declarada imunossupressão. Assim, a imunossupressão, associada à infecção VIH, não parece ser a principal razão de resultados indeterminados.

Em suma, este teste apresentou potencial para ser incluído na prática clínica, como exame de rotina para a detecção de infecção por MTB, assim como para ser utilizado na identificação de indivíduos (ou populações) com risco acrescido de desenvolverem reactivação de MTB latente, passando assim a desempenhar o papel da prova de Mantoux.

/ Bibliografia

1. Bloom BR, Murray CJ. "Tuberculosis: commentary on a reemergent killer". *Science.* 1992; 257(5073):1055-64.

2. Dye C. "Global epidemiology of tuberculosis". *Lancet.* 2006; 367(9514):938-40.

3. World Health Organization. "Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing (WHO/HTM/TB/2006.362)". *WHO*, Geneva. 2006. .http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/en/index.html.

4. Mustafa AS, Al-Attiyah R. "Tuberculosis: looking beyond BCG vaccines". *J Postgrad Med.* 2003; 49(2):134-40.

5. Murray JF. "A century of tuberculosis". *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169(11):1181-6.

6. Raviglione MC, Snider DE, Jr., Kochi A. "Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic". *JAMA.* 1995; 273(3):220-6.

7. Zumla A, Mullan Z. "Turning the tide against tuberculosis". *Lancet.* 2006; 367(9514):877-8.

8. Direcção Geral de Saúde: Programa Nacional de Controlo da Tuberculose (SVIG-TB). Ponto da situação epidemiológica e indicadores de desempenho, Ano 2003/04. 2005. http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i006875.pdf.

9. EuroTB. Surveillance of tuberculosis in Europe: Report on tuberculosis cases notified in 2004. Institut de Veille Sanitaire, France. 2004. http://www.eurotb.org/rapports/2004/eurotb_report_2004.pdf.

10. Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis. Infecção VIH/SIDA - a situação em Portugal a 30 de Junho de 2006. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 2006. http://www.insarj.pt/site/resources/docs/SIDA_30_de_Junho_de_2006.pdf.

11. Maher D, Raviglione M. "Global epidemiology of tuberculosis". *Clin Chest Med.* 2005; 26(2):167-82.

12. Watkins RE, Brennan R, Plant AJ. "Tuberculin reactivity and the risk of tuberculosis: a review". *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4(10):895-903.

13. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. "False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria?" *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006; 10(11):1192-204.

14. Lalvani A, Nagvenkar P, Udwadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, *et al.* "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; 183(3):469-77.

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

16. Delgado JC, Tsai EY, Thim S, Baena A, Boussiotis VA, Reynes JM, *et al.* "Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia". *Proc Natl Acad Sci USA. 2002*; 99(11):7576-81.

17. Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, *et al.* "Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection". *Eur Respir J.* 2006; 28(1):24-30.

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

19. Palomino JC. "Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field". *Eur Respir J.* 2005; 26(2):339-50.

20. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P, *et al.* "Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides". *Infect Immun.* 2000; 68(6):3314-21.

21. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. "A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10)". *Microbiology.* 1998; 144:3195-203.

22. Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, Horsburgh CR, Jr., Alexander LN, Andersen P. "Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to Mycobacterium avium complex and those with pulmonary disease due to Mycobacterium tuberculosis". *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(4):606-9.

23. Streeton JA, Desem N, Jones SL. "Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection". *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2(6):443-50.

24. 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.

25. Richeldi L. "An update on the diagnosis of tuberculosis infection". *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174(7):736-42.

26. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, Pathan AA, Ewer K, Ayles H, *et al.* "Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells". *AIDS.* 2002; 16(17):2285-93.

27. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, Deeks J, Pathan AA, Lalvani A. "Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study". *Lancet.* 2004; 364(9452):2196-203.

28. Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, Westh H, Mathiesen LR, Ravn P. "Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the M. tuberculosis specific interferon-gamma test". *Respir Res* 2006; 7:56.

29. Ferrara G, Losi M, Meacci M, Meccugni B, Piro R, Roversi P, *et al.* "Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection". *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172(5):631-5.

30. Luetkemeyer AF, Charlebois ED, Flores LL, Bangsberg DR, Deeks SG, Martin JN, *et al.* "Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals". *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175(7):737-42.

31. Rangaka MX, Wilkinson KA, Seldon R, Van Cutsem G, Meintjes GA, Morroni C, *et al.* "Effect of HIV-1 infection on T-Cell-based and skin test detection of tuberculosis infection". *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175(5):514-20.

32. Toossi Z, Mayanja-Kizza H, Hirsch CS, Edmonds KL, Spahlinger T, Hom DL, *et al.* "Impact of tuberculosis (TB) on HIV-1 activity in dually infected patients". *Clin Exp Immunol.* 2001; 123(2):233-8.

33. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, *et al.* "Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study". *Lancet* 2006; 367(9519):1328-34.

34. Germano NM. "O papel do teste da tuberculina no diagnóstico da TB em Portugal" [Tese de Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes]. Universidade de Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa; 2006.

35. Aiken AM, Hill PC, Fox A, McAdam KP, Jackson-Sillah D, Lugos MD, *et al.* "Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases". *BMC Infect Dis.* 2006; 6:66.

36. Gooding S, Chowdhury O, Hinks T, Richeldi L, Losi M, Ewer K, *et al.* "Impact of a T cell-based blood test for tuberculosis infection on clinical decision-making in routine practice". *J Infect. 2007*; 54(3):e169-74.

37. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, *et al.* "Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells". *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(4):824-8.

38. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. "Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24(8):529-36.

39. Nicol MP, Pienaar D, Wood K, Eley B, Wilkinson RJ, Henderson H, *et al.* "Enzyme-linked immunospot assay responses to early secretory antigenic target 6, culture filtrate protein 10, and purified protein derivative among children with tuberculosis: implications for diagnosis and monitoring of therapy". *Clin Infect Dis.* 2005; 40(9):1301-8.

40. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, *et al.* "Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment". *J Immunol.* 2001; 167(9):5217-25.

41. Scholvinck E, Wilkinson KA, Whelan AO, Martineau AR, Levin M, Wilkinson RJ. "Gamma interferon-based immunodiagnosis of tuberculosis: comparison between whole-blood and enzyme-linked immunospot methods". *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):829-31.

42. Graham NM, Nelson KE, Solomon L, Bonds M, Rizzo RT, Scavotto J, *et al.* "Prevalence of tuberculin positivity and skin test anergy in HIV-1-seropositive and -seronegative intravenous drug users". *JAMA.* 1992; 267(3):369-73.

43. Markowitz N, Hansen NI, Wilcosky TC, Hopewell PC, Glassroth J, Kvale PA, *et al.* "Tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group". *Ann Intern Med.* 1993; 119(3):185-93.

44. Arend SM, Engelhard AC, Groot G, de BK, Andersen P, Ottenhoff TH, *et al.* "Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact". *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(6):1089-96.

45. Hill PC, Jackson-Sillah D, Fox A, Franken KL, Lugos MD, Jeffries DJ, *et al.* "ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia". *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5):2070-4.

46. Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, Skjot RL, Subronto YW, van Dissel JT, *et al.* "Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10".

J Infect Dis. 2000; 181(5):1850-4.

47. Liu XQ, Dosanjh D, Varia H, Ewer K, Cockle P, Pasvol G, *et al.* Evaluation of T-cell responses to novel RD1- and RD2-encoded Mycobacterium tuberculosis gene products for specific detection of human tuberculosis infection. Infect Immun. 2004; 72(5):2574-81.

48. Dheda K, Lalvani A, Miller RF, Scott G, Booth H, Johnson MA, *et al.* "Performance of a T-cell-based diagnostic test for tuberculosis infection in HIV-infected individuals is independent of CD4 cell count". *AIDS. 2005*; 19(17):2038-41.

Agradecimentos

Os nossos agradecimentos são devidos aos doentes e aos profissionais de saúde que voluntariamente participaram neste estudo, à Enfermeira Manuela Cordeiro e à Mestre Sara Sousa pelo apoio e incentivo durante toda a realização deste trabalho.

Este projecto foi financiado através da Bolsa de estudo Prof. Doutor Carvalho Araújo, da Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas e Abbott Laboratórios.

Conflito de interesses

Os autores declaram não possuir qualquer conflito de interesse que possa envolver este manuscrito.