

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRELY COSTA MACHADO ROCHA

**ANÁLISE DE CUSTOS PARA PARAMETRIZAÇÃO DE KIT  
ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE UTILIZANDO  
PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

CURITIBA

2011

SANDRELY COSTA MACHADO ROCHA

**ANÁLISE DE CUSTOS PARA PARAMETRIZAÇÃO DE KIT ELISA  
PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE UTILIZANDO PROTEÍNAS  
RECOMBINANTES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de mestre e em Bioprocessos e Biotecnologia, área de concentração: Saúde Humana e Animal.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2011

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, por permitir a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Corpo docente do Programa de Pós-graduação pelos ensinamentos durante o curso.

À Professora Dr<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol, orientadora desta dissertação, por seu apoio, compreensão e paciência durante esta jornada.

À Secretaria da Saúde do Paraná e Secretaria de Ciência e Tecnologia que através de um convênio com a UFPR propiciaram esta oportunidade de aprimoramento aos servidores públicos do Estado do Paraná.

Aos diretores e funcionários do Hospital São Sebastião da Lapa- PR, por sua colaboração, hospitalidade e atenção quando das realizações das coletas de sangue. Um agradecimento especial à enfermeira Yuri Moribe que sempre foi muito atenciosa e colaborativa junto às necessidades.

A todos as pessoas que participaram deste trabalho fornecendo material para análise (pacientes, funcionários, amigos) sem os quais este projeto não poderia ter acontecido.

À Diretoria do Centro Hospitalar de Reabilitação Ana Carolina Moura Xavier por sua compreensão em permitir a participação neste mestrado.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Química e de Biologia Molecular do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, principalmente o Engenheiro Bioquímico Gilberto Delinski pela sua importante ajuda e apoio durante a realização deste mestrado.

À amiga e colega de trabalho Luciana Kordiaka que me auxiliou nas coletas do Hospital.

A todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

---

Dedico este trabalho a minha família: meu marido, que teve paciência e compreensão durante esta jornada; aos meus filhos, que demonstraram carinho e preocupação nos momentos mais difíceis; e aos meus pais, que como pais... não me deixaram desistir!

## RESUMO

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa que ainda hoje representa um grave problema de saúde pública. O conhecimento e aplicação das técnicas diagnósticas, bem como a correta interpretação dos seus resultados, são fundamentais para o rápido controle da doença. A introdução de métodos diagnósticos, sensíveis, precisos e de baixo custo pode contribuir para a diminuição do número de casos a nível mundial. Nos últimos tempos houve um grande avanço no desenvolvimento de testes imunodiagnósticos com o surgimento dos anticorpos monoclonais e o aprimoramento na análise e identificação dos principais antígenos responsáveis pela ativação do sistema imunológico na presença do agente causador da tuberculose. Tais antígenos podem ser preparados em larga escala por síntese protéica e tecnologia recombinante, aumentando a especificidade do teste. O objetivo deste trabalho foi analisar o custo de produção de um kit diagnóstico utilizando a proteína recombinante ESAT 6 de *Mycobacterium tuberculosis* bem como padronizar e avaliar o reconhecimento desta proteína recombinante por anticorpos séricos da classe IgG em pacientes portadores de tuberculose doença através de método imunoenzimático indireto (ELISA). Utilizou-se como controle positivo para esta análise amostras de soro de pacientes em início de tratamento, com diagnóstico confirmado pelos métodos convencionais de baciloscopia, cultura, raios-X e PPD. Verificou-se que a proteína recombinante ESAT 6 foi reconhecida pelos anticorpos IgG séricos destes pacientes e apresentou reprodutibilidade satisfatória quando utilizada como antígeno de reação em concentração de 500ng por cavidade, numa diluição de amostra de 1:25 e concentração do conjugado de 1:10000. O cálculo do custo de produção de um kit diagnóstico ELISA utilizando esta proteína recombinante apresentou um valor aproximado de R\$ 0,18 por análise o que torna o teste altamente viável para ser implementado em saúde pública quando comparado com o custo dos testes utilizados rotineiramente.

Palavras-chave: Tuberculose, diagnóstico, antígeno recombinante, ESAT 6.

## ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease that still represents a serious public health problem. The knowledge and application of diagnostic techniques, as well as the correct interpretation of their results, are essential for rapid disease control. The introduction of diagnostic methods, sensitive, accurate and low cost can help to reduce the number of cases worldwide. In recent times there has been a major breakthrough in the development of immunodiagnostic tests with the advent of monoclonal antibodies and improvement in the analysis and identification of key antigens responsible for immune system activation in the presence of the causative agent of tuberculosis. Such antigens can be prepared in large scale for protein synthesis and recombinant technology, increasing the specificity of the test. The objective of this study was to analyze the cost of production of a diagnostic kit using recombinant ESAT 6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* as well as standardize and evaluate the recognition of this recombinant protein by serum IgG antibodies in patients with tuberculosis disease by microparticle enzyme immunoassay (ELISA). It was used as positive control for this analysis serum samples from patients starting treatment, as confirmed by conventional methods of microscopy, culture, x-rays and ppd. It was found that the recombinant protein ESAT 6 was recognized by serum IgG antibodies and these patients showed satisfactory reproducibility when used as used as antigen reaction 500ng concentration per wells in a 1:25 dilution of sample and conjugate concentration of 1:10000. The calculation of the cost of producing ELISA Diagnostic kit using this recombinant protein had an aproximate value US\$ 0,11 per analysis which makes the TST highly feasible to be implemented in public health when compared to the cost the tests used routinely.

Key Words: Tuberculosis, diagnostic, recombinant antigens, ESAT 6.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
≥	Maior ou igual
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
G	Gramma
ADA	Adenosina deaminase
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
CFP10	Culture filtrate protein
CNCT	Consenso Nacional de Combate à Tuberculose
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOT	Tratamento Diretamente Observado
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESAT 6	Early secretory antigen target
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN-g	Interferon Gama
ILTB	Infecção Latente de Tuberculose
LB	Luria Bertani
LJ	Löwenstein-Jensen
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Poli(etil)enoglicol
PET	Tomografia com emissão de Positrons
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCT	Plano Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	Derivado Protéico Purificado
PT	Prova Tuberculínica
qsp	Quantidade Suficiente Para...
rpm	Rotações por Minuto
RM	Ressonância Magnética
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato De Sódio
STOP TB	Plano Global contra a Tuberculose
SUS	Sistema Único de Saúde
TAAN	Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos
TB	Tuberculose
TB-MR	Tuberculose Multiresistente
TCAR	Tomografia Computadorizada de Alta Resolução
TRIS	Hidroximetilamônio Metanol
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNAIDS	Joint Unites Programmed on HIV/AIDS
v/v	Volume / Volume
WHO	World Health Organization



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - BACIOS ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTE - COLORAÇÃO ZIEHL-NEELSEN.....	17
FIGURA 2 - COLÔNIA DE <i>M.TUBERCULOSIS</i> EM MEIO DE CULTIVO LÖWENSTEIN-JENSEIN.....	18
FIGURA 3 - NÚMERO APROXIMADO DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE NO MUNDO EM 2009.....	22
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA TAXA DE INCIDÊNCIA DE TUBERCULOSE (CASOS POR 100.000 HABITANTES) BRASIL 2007.....	24
FIGURA 5 - COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DA TUBERCULOSE NO ESTADO DO PARANÁ PARA O ANO DE 2010 (MÉDIA: 23 CASOS/100.000 HAB). ....	26
FIGURA 6 - COEFICIENTE DE MORTALIDADE POR TUBERCULOSE DO PARANÁ (2001 A 2010*). * DADOS PRELIMINARES.....	27
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DOS EXAMES DIAGNÓSTICOS PARA TB. ....	28
FIGURA 8 –APLICAÇÃO DO PPD.....	37
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO PROCESSO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE. ....	37
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE. ....	37
FIGURA 11 – ETAPAS PARA REALIZAÇÃO DO ELISA.....	437
FIGURA 12 – PLACA REPRESENTANDO LEITURA EM ABSORBÂNCIA USANDO PROTEÍNA RECOMBINANTE.ESAT 6.....	46
FIGURA 13 PLACA REPRESENTANDO COLORAÇÃO DA REAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO USANDO PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	46
FIGURA 14 –REATIVIDADE SEGUNDO LOTE PROTEÍNA. ....	46
FIGURA 15 - MODELO DE RÓTULO EM ESTUDO.....	52
FIGURA 16 - FOTO DO PROTÓTIPO DO KIT TB TEST COM SEUS FRASCOS NUMERADOS SEQUENCIALMENTE.....	55
FIGURA 17 - FOTO DO PROTÓTIPO DO KIT COMPLETO.....	54
FIGURA 18 - FOTO DO PROTÓTIPO DO KIT COMPLETO.....	56

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CUSTO MÉDIO DO TRATAMENTO DE CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE, POR UNIDADE DE SAÚDE NO ESTADO DA BAHIA EM REAIS NO ANO DE 1999.....	14
TABELA 2 – SÉRIE HISTÓRICA DA TAXA DE INCIDÊNCIA DE TUBERCULOSE NO BRASIL A CADA 100.000 HABITANTES POR REGIÃO E UNIDADE DE FEDERADA DE RESIDÊNCIA POR ANO DIAGNÓSTICO.....	25
TABELA 3 - CUSTO TOTAL DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NECESSÁRIA PARA 5000 PLACAS ANUAIS .....	49
TABELA 4 - CUSTOS REAGENTES PARA ETAPA DE ELISA DO KIT .....	50
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO TB –TEST .....	51
TABELA 6 - CUSTO DOS COMPONENTES DA EMBALAGEM.....	52
TABELA 7 - CUSTO TOTAL DE PRODUÇÃO DO KIT PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE UTILIZANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE ESAT6 - CÁLCULO PARA PRODUÇÃO DE 5000 KITS ANUAIS .....	54
TABELA 8 - SUMÁRIO DE ESTUDOS REALIZADOS VISANDO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE POR TESTES IMUNO-SOROLÓGICOS .....	59
TABELA 9 - COMPARATIVO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS MAIS UTILIZADOS, SUAS VANTAGENS E DESVANTAGENS .....	60

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
1.1	OBJETIVO GERAL	16
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO DA TUBERCULOSE	17
2.2	A DOENÇA	18
2.3	TRANSMISSÃO	20
2.4	EPIDEMIOLOGIA	21
2.4.1	Tuberculose no Mundo	21
2.4.2	Tuberculose no Brasil	23
2.4.3	Tuberculose no Paraná	26
2.5	DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE	27
2.5.1	DIAGNÓSTICOS BACTERIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE	29
2.5.1.1	Exame Direto	29
2.5.1.2	Cultura	29
2.5.2	DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO	30
2.5.2.1	Raio x	30
2.5.2.2	Exames de imagem	31
2.5.3	PROVA TUBERCULÍNICA (PT) OU PPD	31
2.5.4	HISTOPATOLÓGICO	33
2.6	OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	33
2.6.1	Testes imunológicos - Ensaio para detecção de gama interferon (IGRAs)	33
2.6.2	Adenosinadeaminase (ADA)	34
2.6.3	Testes moleculares	34
2.6.4	Teste Xpert MTB / Rif (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA)	35
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
3.1	TRANSFORMAÇÃO DA CÉLULA COMPETENTE POR CHOQUE TÉRMICO	38
3.2	PROPAGAÇÃO DOS PLASMÍDEOS	38
3.3	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ESAT 6	39

3.4	PURIFICAÇÃO .....	40
3.4.1	Separação e lise das células .....	40
3.4.2	SDS-PAGE .....	40
3.4.3	Cromatografia de Afinidade .....	41
3.4.4	Remoção de endotoxinas .....	41
3.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA .....	42
3.5.1	Amostras de soros positivos e negativos .....	42
3.5.2	Teste ELISA.....	43
3.6	ANÁLISE ECONÔMICA .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
4.1	PARAMETRIZAÇÃO DO TESTE .....	45
4.2	CÁLCULO DE CUSTO PARA MONTAGEM DO KIT DIAGNÓSTICO .....	47
4.2.1	Custo de produção da proteína recombinante – antígeno da reação .....	48
4.2.2	Custo do reagente para realização do ELISA.....	49
4.2.3	Custo da embalagem.....	50
4.2.4	Custo total do exame para tuberculose utilizando proteína recombinante e método de enzimoimunoensaio .....	53
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>
	<b>ANEXO 1 – CÁLCULOS DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO 2 - CÁLCULO DO CUSTO TOTAL DO KIT ELISA – REAGENTES E EMBALAGEM.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO 3 - BULA DO KIT TB TEST .....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO 4 – FÓRMULAS DOS REAGENTES UTILIZADOS .....</b>	<b>90</b>
	<b>ANEXO 5 - AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SESA ...</b>	<b>94</b>
	<b>ANEXO 6 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das doenças mais antigas relatadas e identificadas no ser humano. Existem evidências dessa patologia em esqueletos desde 8000 a.C. bem como foram encontradas múmias egípcias datando de 3000 a.C. com lesão na coluna vertebral características de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (VERONESI, 2010).

Povos orientais, como os Hindus e Chineses, já descreviam quadros clínicos semelhantes à tuberculose desde 2000 a.C. Hipócrates, o pai da medicina, descreveu em 380 a.C. a doença como “tísica”, que significa “derreter-se”, devido às lesões caseosas que ela provocava.

A doença tomou proporções de epidemia na Europa durante a Revolução Industrial quando os proletários, sem condições financeiras, se aglomeravam em cidades extremamente populosas, sem infra-estrutura sanitária e exerciam atividades extenuantes sem as mínimas condições de higiene. Posteriormente atingiu as Américas e África (RIBEIRO, 1955).

Em 1882, Robert Koch isolou o agente causal desta tão temida doença: o *Mycobacterium tuberculosis*, conhecido a partir daí como bacilo de Koch.

Experimentos para produção de uma vacina contra a tuberculose vieram mais tarde, em 1921 quando Albert Calmette e Camile Guérin (do Instituto Pasteur - França) estudaram a ação de uma cepa atenuada de *M. bovis* com finalidade imunológica - denominada de BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) – surgia então a primeira vacina antituberculose.

Em nosso país, a tuberculose surgiu junto com o descobrimento, trazida pelos colonizadores, padres jesuítas e escravos africanos (RIBEIRO, 1955). Os povos indígenas que aqui habitavam facilmente adquiriam a tuberculose, pois não tinham imunidade contra esta doença. Morriam rapidamente o que contribuiu para a extinção de muitas tribos. Seguindo a evolução ocorrida na Europa, aqui também se tornou endemia com o crescimento urbano e populacional ocorridos nos séculos posteriores ao descobrimento.

O primeiro esquema de tratamento medicamentoso foi desenvolvido nos anos 60 e utilizava simultaneamente três antibióticos: estreptomicina, isoniazida e ácido

aminossalicílico e tinha duração de 12 a 24 meses. Posteriormente na década de 80 foi modificado quando se passou a utilizar as drogas rifampicina, isoniazida e pirazinamida e o tratamento foi encurtado para seis meses. Esse esquema de tratamento para a tuberculose foi revisto recentemente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Ministério da Saúde (MS) reforçando o esquema anterior com o medicamento etambutol na sua fase de ataque, e reduzindo as posologias dos medicamentos isoniazida e da pirazinamida. Esta alteração foi proposta tendo em vista o aumento da resistência das micobactérias ao medicamento isoniazida, fato este observado mundialmente(OMS, 2010).

Atualmente a tuberculose (TB) continua sendo um desafio de saúde pública e merece atenção tanto dos profissionais de saúde quanto da sociedade em geral. De acordo com o MS (2010) é uma doença que obedece a todos os critérios necessários para priorização de um agravo em saúde pública, ou seja, grande magnitude, transcendência e vulnerabilidade.

Nos países em desenvolvimento, as condições sanitárias e socioeconômicas da população facilitam sua disseminação e, em países desenvolvidos, o ressurgimento da tuberculose coincide com os grandes fluxos migratórios e com o surgimento da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), além do problema da multirresistência aos medicamentos devido ao abandono de tratamento.

A clínica da tuberculose foi desde o começo muito bem conhecida e esclarecida. Porém, os métodos utilizados para o diagnóstico já não eram tão confiáveis e se baseavam principalmente nos sintomas clínicos do paciente que, quando apareciam, já indicavam a doença em estado avançado (RIBEIRO, 1971). Somente na segunda metade do século XX é que o diagnóstico pode ser feito através do isolamento do bacilo da *M. tuberculosis* em cultura (SANT'ANNA, 2001).

Desde então a maioria dos países utiliza como métodos diagnósticos a baciloscopia de secreções, a prova tuberculínica (PPD) e o exame de raio x, ferramentas estas com pouca especificidade para uma doença tão importante em saúde pública.

O diagnóstico precoce da doença possibilita o início imediato do tratamento reduzindo a disseminação do bacilo na comunidade e os riscos para o paciente. Em indivíduos com a Síndrome da Deficiência Imunológica Adquirida (AIDS), a

identificação da tuberculose e o imediato tratamento específico podem significar maiores chances de sobrevivência. Para a população em geral significa a possibilidade de diminuir o número de novos casos e atingir um maior número de cura dos indivíduos infectados (VERONESI, 2010).

Segundo levantamento efetuado pelo site do governo pelo DATASUS, hoje o Brasil tem um gasto razoável no tratamento, diagnóstico e prevenção da tuberculose. Segundo Costa *et al.* (2005) o Estado da Bahia gastou em 1999 aproximadamente R\$ 185,93 por internação de paciente com tuberculose. Dentre estes gastos foram contabilizados custos com os profissionais envolvidos no atendimento, exames diagnósticos, medicamentos e depreciação conforme apresentado na Tabela 1. Além do custo para o Estado o estudo demonstrou que as famílias dos pacientes acometidos pela doença também perciam no decorrer do tratamento da doença com gastos com exames complementares, alimentação, transporte e diminuição de renda de trabalho (COSTA *et al.*, 2005).

TABELA 1 - CUSTO MÉDIO DO TRATAMENTO DE CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE, POR UNIDADE DE SAÚDE NO ESTADO DA BAHIA EM REAIS NO ANO DE 1999.

ITEM DE CUSTO	2º	%	3º	%	5º	%	6	%	14º	%	CSP¹	%
	CENTRO		CENTRO		CENTRO		CENTRO		CENTRO			
PROFISSIONIS EXCLUSIVOS	25,55	16,5	86,05	41,60	85,00	31,9	49,95	22,50	57,22	29,9	49,95	27,90
PROFISSIONAIS PARCIALMENTE												
NO PROGRAMA DE	12,53	8,10	17,43	8,40	78,56	29,50	74,74	33,60	24,32	12,70	19,32	10,80
PROFISSIONAIS ADMINISTRATIVOS	7,63	4,90	6,33	3,310	4,70	1,80	6,07	2,70	9,07	4,70	8,71	4,90
DEPRECIÇÃO	14,12	9,10	2,20	1,10	3,69	1,40	1,38	0,60	1,07	0,60	3,39	1,90
DESPESAS CORRENTES NA	7,72	5,00	7,77	3,80	7,67	2,90	3,11	1,40	12,75	6,70	10,69	6,00
RAIO X E BACILOSCÓPIA	8,98	5,80	8,98	4,30	8,98	3,40	8,98	4,40	8,98	4,70	8,98	5,00
MEDICAMENTO (78,00)	78,00	50,50	78,00	37,70	78,00	29,30	78,00	35,10	78,00	40,80	78,00	43,60
TOTAL	154,53	100,0	206,76	100,00	266,60	100,0	222,23	100,0	191,40	100,0	179,0	100,0
PACIENTES ATENDIDOS NO	1006		563		158		204		284		269	
CUSTO TOTAL ANUAL	155457,92		116408,61		42122,66		45334,56		54357,38		4865,02	185,93
												(US\$ 103)

¹CUSTO MÉDIO UNITÁRIO ( MÉDIA PONDERADA PELO N DE PACIENTES)

FONTE: SECRETARIA DA SAÚDE DA BAHIA (1999).

No estado do Paraná, segundo a Central de Medicamentos do Paraná - CEMEPAR - anualmente são gastos R\$ 24.317.02 na aquisição de reagentes para a prova tuberculínica (PPD) e R\$ 582.583,80 na aquisição de vacinas BCG.

Com relação aos custos do diagnóstico, o SUS repassa aos laboratórios um valor equivalente a R\$ 4,50 por baciloscopia de escarro para pesquisa de BAAR, R\$ 5,63 por cultura de *M. tuberculosis* e R\$ 15,3 por exame de Raio X pulmonar (DATASUS, 2011). O internamento para tratamento da tuberculose em hospitais especializados paranaenses não sai por menos de R\$ 87,00/dia sendo que o tempo de internamento fica em torno de 30 dias no mínimo (Hospital São Sebastião da Lapa, Lapa - Pr).

Segundo estudo de Costa *et al.*(1999) os achados apontaram que, dos gastos públicos com a tuberculose, cerca de 65% foram direcionados aos internamentos. A inexistência de uma unidade de controle de custos para as atividades de combate à tuberculose e a fragmentação do envolvimento das entidades públicas municipais, estaduais e federais que financiam a execução do Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) gera uma dificuldade na visão macro dos recursos envolvidos, o que pode levar à ineficiência na execução e no controle do programa e a não percepção dos custos globais da tuberculose no âmbito nacional.

Os programas desenvolvidos pelo Ministério da Saúde nas esferas federais, estaduais e municipais através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose, apesar dos investimentos, treinamentos e acompanhamento dos doentes, ainda não conseguiram atingir 100% dos objetivos para interromper a transmissão da doença e conseqüentemente reduzir o número de casos (MS, 2010).

Diante disto, o desenvolvimento de novas tecnologias na área de diagnóstico da tuberculose, que sejam mais sensíveis, específicas, rápidas, de baixo custo e de fácil execução seria de grande valia para a redução das taxas de incidência e mortalidade da tuberculose. Isto permitiria que o Brasil atingisse as metas preconizadas pela Organização Mundial da Saúde tendo em vista a erradicação desta doença a nível mundial.

O teste de imunodiagnóstico ELISA utilizando proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* tem sido objeto de estudo pelo grupo da Universidade Federal do Paraná. Dentre estes estudos, Malaghini (2008) produziu proteínas recombinantes,



dentre elas a proteína ESAT 6 que se mostrou com grande potencial diagnóstico de Tuberculose doença.

Neste trabalho foi avaliado o valor diagnóstico do reconhecimento da proteína recombinante ESAT 6 de *M. tuberculosis* por anticorpos IgG de soro de pacientes com Tuberculose doença através de técnicas de enzimoimunoensaio indireto com a finalidade de desenvolver e avaliar os custos de um novo teste nacional para diagnóstico desta doença.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e analisar a viabilidade econômica da produção de um kit ELISA indireto para diagnóstico de tuberculose utilizando uma proteína recombinante e tecnologia brasileira.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o reconhecimento do antígeno recombinante ESAT 6 de *Micobacterium tuberculosis* por anticorpos séricos de indivíduos com tuberculose ativa através de técnicas de ELISA indireto;
- b) Verificar a viabilidade econômica de produção em escala comercial de um teste ELISA para diagnóstico pelo método indireto utilizando proteína recombinante.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO DA TUBERCULOSE

A tuberculose é uma doença endêmica causada por microrganismos que pertencem à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium*. A característica principal deste grupo de micobactérias é sua resistência à descoloração com álcool acidificado pelo procedimento de coloração a quente com fucsina fenicada (técnica de Ziehl-Neelsen). A coloração da bactéria torna-se avermelhada quando observadas em esfregaços ao microscópio óptico e por isso são denominados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Figura 1). Essa propriedade se deve principalmente aos lipídeos que compõem a parede celular do microrganismo (KONEMAN, 2001).

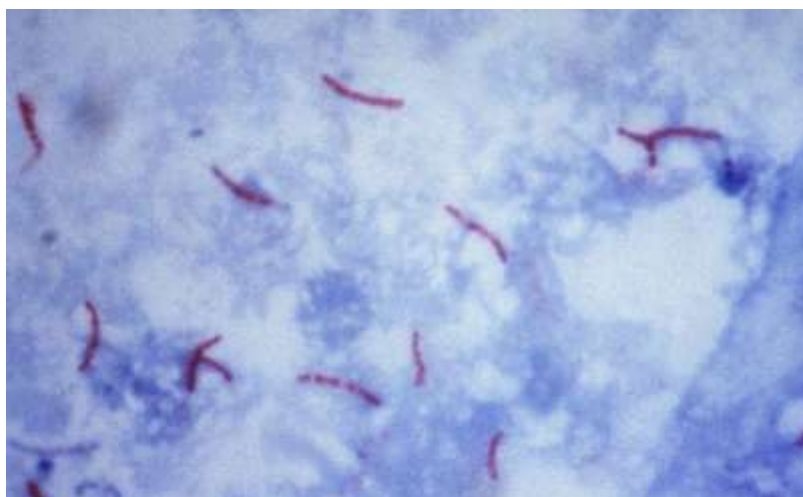


FIGURA 1 - BACILOS ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTE - COLORAÇÃO ZIEHL-NEELSEN

FONTE: [http:// eeciencia.com/recursos/enciclopédia\(2011\)](http://eeciencia.com/recursos/enciclopédia(2011))

Várias espécies de *Mycobacterium* foram descobertas, sendo elas diferenciadas entre si através de sua velocidade de crescimento e produção de pigmentos, além do estudo de suas propriedades fenotípicas, genotípicas e sua estrutura celular (RUNYON, 1970). A morfologia celular típica de *M. tuberculosis* é a de um bacilo delgado, ligeiramente curvo, medindo de 0,3 a 0,6 por 1 a 4 µm, são

classificados como micobactérias não pigmentadas de crescimento lento. Além disto, os bacilos se agrupam, formando ramos longos e tortuosos, conhecidos como cordas fato este peculiar à espécie *M. tuberculosis* (MS-FNS, 1994). Sua parede celular induz a formação do granuloma (KUBICA; WAYNE, 1984). O bacilo da tuberculose é aeróbio estrito e é considerado um parasito intracelular facultativo, devido a sua capacidade de sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos (KUBICA; WAYNE, 1984).

As colônias são de aspecto rugoso, não pigmentado, cor camurça após 14 a 28 dias de incubação a 37°C em meio de Löwenstein-Jensen (Figura 2) ou Middlebrook (KONEMAN, 2001). Este bacilo pode ainda entrar em estado de latência após a infecção e sobreviver no organismo humano durante anos sem se dividir ou multiplicar-se.



FIGURA 2 - COLÔNIA DE *M. TUBERCULOSIS* EM MEIO DE CULTIVO LÖWENSTEIN-JENSEIN  
FONTE: [HTTP://BIOMEDICINABRASIL.BLOGSPOT.COM/2011/07/MICOBACTERIAS.HTML](http://biomedicinabrasil.blogspot.com/2011/07/micobacterias.html)

## 2.2 A DOENÇA

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, crônica, e acomete em especial os pulmões, mas pode atingir outros tecidos como a pele, rins, fígado, cérebro, ossos, assim como pode invadir a corrente sanguínea com disseminação por todo o corpo, sendo chamada então de tuberculose miliar.

É um problema de saúde pública secular, pela sua gravidade e facilidade de propagação, podendo comprometer a saúde de pessoas em qualquer faixa etária (GOLDMAN, 2005). A apresentação pulmonar é a mais freqüente e a mais importante em termos de saúde pública, pois é responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença.

Como é uma doença de evolução crônica, a sintomatologia tende a ser crescente, podendo apresentar períodos de diminuição dos sintomas e relativo bem estar. Quando pulmonar, a tosse está presente em todos os pacientes e é resultante de um processo inflamatório alveolar ou pelo comprometimento das vias aéreas. No início a tosse é seca, podendo tornar-se produtiva com expectoração de muco, pus e às vezes sangue (VERONESI, 2010). Em função da destruição do parênquima alveolar pode haver dispnéia e dor torácica (quando comprometimento da pleura), febre vespertina e sudorese noturna também são sintomas característicos desta doença.

A TB latente ou infecção pode ser definida como uma síndrome clínica causada pela exposição ao *M. tuberculosis* seguida de infecção evidenciada pela presença da prova tuberculínica (PPD) positiva (leitura superior a 10 mm), mas com ausência de sinais e sintomas clínicos e radiológicos da doença, já que existe uma resposta imunológica eficaz do organismo para controlar o crescimento da micobactéria impedindo assim sua manifestação. O bacilo permanece em estado latente no tecido afetado, há redução do metabolismo bacteriano, mas, nem sempre ele é erradicado.

A evolução para doença ativa está relacionada a alguns fatores de risco como idade (pessoas idosas e crianças) e doenças ou condições imunossupressoras (co-infecção pelo HIV, doenças auto-imunes, desnutrição, neoplasia, diabetes, insuficiência renal crônica, dentre outras) ou ainda ao uso de medicações que interfiram na imunidade. Na maioria dos casos, a infecção fica latente e o indivíduo se torna um reservatório para futuros casos, criando um grande problema epidemiológico.

A probabilidade de um indivíduo adoecer numa primeira infecção depende também do grau de virulência da cepa, da fonte infectante e das características dos indivíduos infectados. Em novo contato, após uma infecção natural ou induzida pelo BCG, a resistência depende da resposta imunológica individual isto é, da

capacidade do próprio organismo em produzir anticorpos suficientes para combater o bacilo.

Todos os grupos etários são atingidos, embora 85% dos casos ocorram em adultos e destes 90% apresentam a forma pulmonar. De cada 100 pessoas que se infectam com o bacilo 10 a 20% adoecerão. Cepas resistentes são responsáveis por vários surtos da doença, principalmente em ambiente hospitalar e como consequência, geram alto índice de infecção em trabalhadores da área de saúde e produção (WEISS, 1993).

### 2.3 TRANSMISSÃO

O indivíduo adulto bacilífero é o responsável pela transmissão do agente etiológico o qual elimina bacilos para o ambiente através de gotículas de saliva expelidas com a tosse e a fala (ROM ; GARAY, 1995). As crianças por sua dificuldade em expectoração e por serem paucibacilares (apresentarem número de bacilos reduzidos) dificilmente transmitem a infecção (MACIEL *et al.*, 2006).

Essas gotículas podem permanecer em suspensão por vários dias, em condições favoráveis, e uma vez aspiradas, as partículas infectantes maiores são retidas pelo sistema mucociliar do sistema respiratória, sendo removidas dos brônquios, deglutidas e eliminadas pelas fezes. Por outro lado, as partículas menores, com cerca de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, podem alcançar os pulmões (BARROSO, 2001).

A chance de transmissão da infecção em famílias de baixa renda é maior devido às escassas condições de moradia (aglomeração) e nutrição (BARROSO, 2001).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA

### 2.4.1 Tuberculose no Mundo

Segundo a OMS (2005), o aumento global da incidência da TB, observada desde o início dos anos 90 alcançou seu pico em 2004 e foi seguido de uma queda lenta, associada à obtenção de cura de 85% dos casos notificados em países que adotaram a estratégia DOTS (*directly observed treatment, short-course*) proposta em 1993. Porém, entre 2000 e 2007, houve um aumento de 65% de casos de tuberculose multirresistente (TB-MR). Em 2005, as taxas de TB-MR primária e adquirida foram respectivamente de 2,9% (variação: 2,2-3,6%) e de 15,3% (variação: 9,6-21,1%). Ocorreram cerca de 500.000 casos e, desse, apenas 30.000 (8,5%) foram diagnosticados, sendo que uma proporção menor deles teve acesso ao tratamento adequado. Já em 2009 aproximadamente 4.900.000 pessoas ficaram doentes no mundo e destas 1,7 milhões morreram por tuberculose.

Em seu relatório anual sobre tuberculose, publicado em 2010 a OMS estimou que dois bilhões de pessoas estivessem infectadas pelo bacilo e, destas, aproximadamente oito milhões desenvolverão a doença e dois milhões morrerão anualmente. Destes casos aproximadamente 95% ocorrerão e países em desenvolvimento onde o acesso aos cuidados em saúde é mais difícil e onde a presença de pessoas infectadas pelo vírus HIV é mais freqüente (OMS, 2010).

Diante destes dados um novo modelo epidemiológico vem sendo implantado pela OMS, UNAIDS e STOP TB visando direcionar suas ações para a prevenção, o tratamento e um maior monitoramento dos pacientes HIV positivos facilitando o acesso a antirretrovirais e tuberculostáticos procurando assim reduzir o número de pessoas afetadas pela doença.

Constata-se através do mapa a seguir retirado do relatório anual da OMS (2010) que regiões de grandes aglomerados de pessoas como a África e a Ásia destacam-se pelo grande número de casos de tuberculose.

Abaixo observa-se o mapa com dados de 2009 fornecido pela OMS em seu relatório anual onde os países são identificados por cores de acordo com a distribuição dos casos de tuberculose a cada 100.000 habitantes.

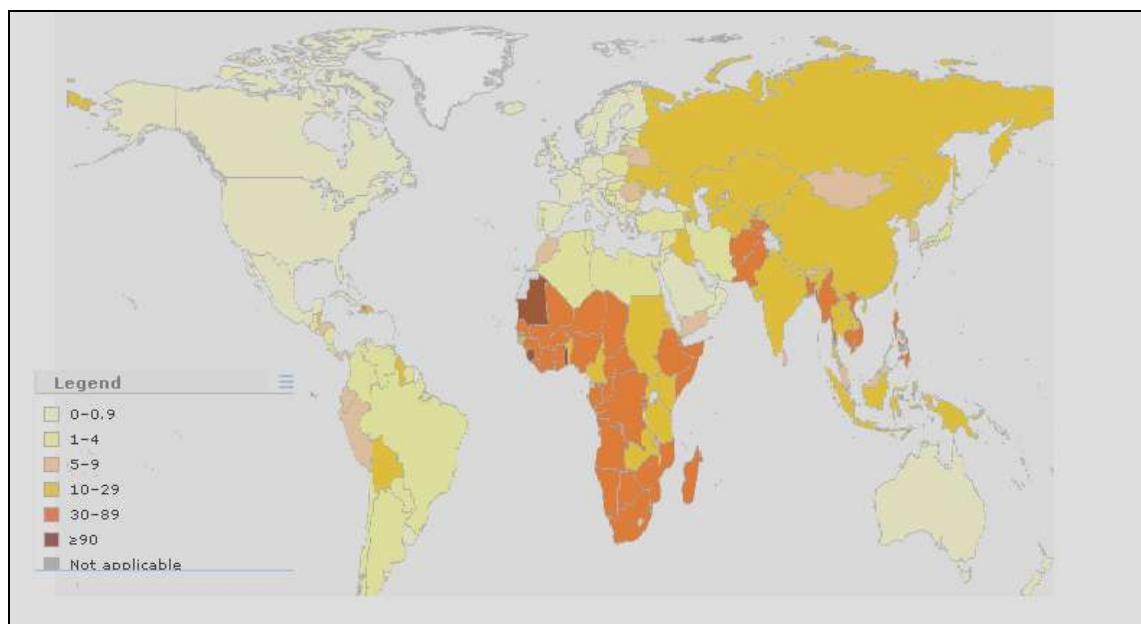


FIGURA 3 - NÚMERO APROXIMADO DE NOVOS CASOS DE TB NO MUNDO EM 2009.  
FONTE: OMS (2010)

Nota: Número de Casos por 100.000 habitantes

#### 2.4.2 Tuberculose no Brasil

A constituição federal brasileira em seu artigo 196 preconiza que “a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação”. Também o artigo 2º e 5º, inciso III, da Lei nº. 8.080/90, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, dos objetivos e princípios do SUS, explicitam que “a saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício”, além de esclarecer que é objetivo do SUS dar assistência às pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas (MS, 2010).

Desta forma o Ministério da Saúde, como órgão máximo do sistema de saúde, tem como preocupação estabelecer, entre seus programas, estratégias articuladas para o controle das doenças e de comorbidades que afetam a saúde individual e/ou coletivas dos cidadãos. Assim sendo, procura descentralizar as medidas de controle de doenças transmissíveis tais como TB e AIDS articulando-se com organizações não governamentais e da sociedade civil, visando ampliar o acesso da população, principalmente das parcelas mais vulneráveis como moradores de rua, presidiários e comunidades indígenas, aos serviços de saúde. Ao reconhecer a TB como problema de saúde pública torna-se necessário readequar o sistema de saúde para garantir a equidade no acesso e no atendimento visando o bem estar, a recuperação da saúde dos pacientes e a proteção da parcela saudável da população através das medidas preventivas.

Tendo em vista que o controle da tuberculose baseia-se na interrupção da transmissão da doença, o Plano Nacional de Controle à Tuberculose (PNCT) estabeleceu como meta prioritária o diagnóstico precoce dos casos de TB, o tratamento adequado até a cura através do fortalecimento da adesão à estratégia DOTS (tratamento diretamente observado). Desta forma direciona seus esforços para o controle da associação tuberculose e HIV, investigando os contatos,



monitorando a tuberculose resistente (TR) e incentivando a pesquisa operacional em todos os níveis do Plano Nacional de Controle da Tuberculose (MS, 2010).

Através dos dados fornecidos pelo Ministério da Saúde (2007) pode-se observar que o número de casos por 100 mil habitantes no Brasil varia entre as regiões, sendo que a região norte apresenta a maior concentração de casos (Figura 4 e tabela 2).

A figura 4 ilustra a distribuição da taxa de incidência da tuberculose no Brasil em 2007, a cada 100.000 habitantes.

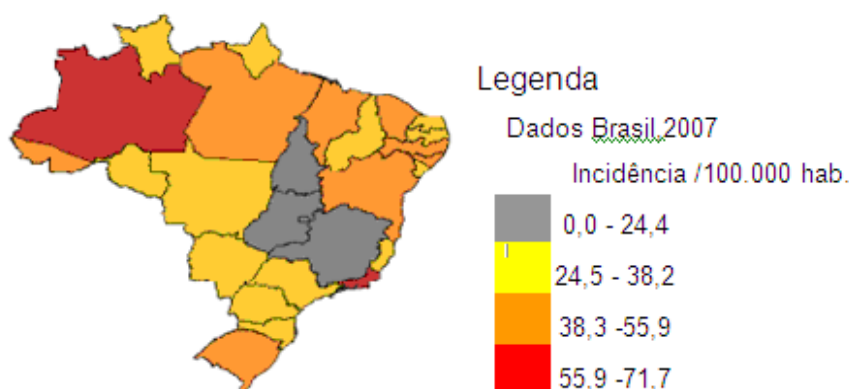


FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA TAXA DE INCIDÊNCIA DE TUBERCULOSE (CASOS POR 100.000 HABITANTES) BRASIL 2007.

FONTE: OMS, 2009

A tabela 2 apresenta um resumo da taxa de incidência da tuberculose no Brasil no período de 1993 a 2010, por regiões, destacando alguns Estados que apresentaram um número elevado de casos.

TABELA 2 – SÉRIE HISTÓRICA DO NÚMERO DE CASOS DE TUBERCULOSE NO BRASIL A CADA 100.000 HABITANTES POR REGIÃO E ANO DE DIAGNÓSTICO COM ÊNFASE EM NOSSO ESTADO.

Região e UF	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Região Norte	70,60	65,96	60,83	61,47	58,22	53,97	52,18	51,00	51,16	51,02	49,97	50,80	47,23	45,89	45,35	48,37	47,62	45,41
Amazonas	93,34	90,94	87,10	84,54	79,90	79,82	79,16	73,78	78,37	71,07	67,14	68,87	64,50	65,36	67,10	71,29	68,98	69,21
Roraima	83,79	72,68	78,57	75,26	83,30	79,02	79,80	57,85	38,84	41,80	45,08	50,31	33,22	30,25	29,14	32,70	31,32	30,56
Região NE	64,92	64,79	63,29	58,18	52,97	53,31	55,55	47,60	45,99	44,14	46,14	45,88	45,39	40,05	38,83	38,84	38,84	37,30
,Maranhão	64,45	64,66	69,87	61,66	62,64	57,10	63,30	52,00	46,02	46,98	44,66	44,89	45,22	41,13	39,57	35,08	33,98	32,27
Piauí	70,44	68,03	69,47	52,80	49,82	51,48	48,06	43,85	40,85	38,08	35,40	37,37	38,18	32,67	27,70	25,74	27,38	24,85
Ceará	68,75	68,19	67,04	58,17	53,31	51,84	55,84	48,04	48,07	48,94	50,46	49,03	49,36	42,90	41,99	45,25	45,38	41,89
Bahia	74,87	77,04	68,78	62,98	61,41	61,12	58,44	49,58	55,36	47,02	51,01	49,82	48,12	43,94	40,71	38,90	39,86	39,28
Região SE	41,85	41,45	65,23	61,42	58,43	50,54	55,23	55,11	44,22	49,72	47,28	45,21	42,71	41,25	40,58	42,14	41,00	41,42
Minas Gerais	43,14	40,72	40,33	37,00	32,82	34,48	35,37	34,78	8,55	27,42	27,77	27,66	28,22	24,08	23,77	22,91	21,20	19,73
Espírito Santo	55,21	55,08	52,39	52,77	49,73	51,70	55,48	41,03	42,31	41,63	40,64	38,88	37,28	34,67	35,80	39,32	35,76	37,79
Rio de Janeiro	0,00	0,00	128,79	111,88	112,09	98,62	89,91	98,27	93,90	92,25	89,25	86,16	80,14	74,43	72,41	74,82	74,08	71,79
São Paulo	58,82	57,14	54,29	54,32	50,87	52,09	55,09	40,18	43,70	42,78	41,98	39,98	38,77	37,38	38,53	39,08	38,23	42,50
Região Sul	38,71	38,08	37,23	37,57	36,11	38,36	39,72	33,47	32,23	34,83	35,40	34,11	32,41	30,42	31,67	32,71	33,19	32,80
<b>Paraná</b>	<b>29,16</b>	<b>29,26</b>	<b>28,52</b>	<b>27,22</b>	<b>24,63</b>	<b>27,80</b>	<b>32,66</b>	<b>24,04</b>	<b>27,18</b>	<b>28,58</b>	<b>28,99</b>	<b>28,12</b>	<b>28,08</b>	<b>23,48</b>	<b>24,68</b>	<b>23,95</b>	<b>22,66</b>	<b>23,31</b>
St.Catarina	28,51	31,23	30,04	29,74	28,44	30,71	33,52	25,24	24,81	27,81	28,11	28,65	25,31	25,85	28,15	27,59	28,98	27,63
Ri. G. do Sul	47,75	49,58	50,59	51,21	50,75	52,16	49,54	48,85	40,89	44,97	45,34	45,33	42,23	39,50	41,32	44,11	44,98	45,27
Região C.O	42,17	39,23	38,05	36,01	38,56	34,98	35,02	30,84	28,71	28,29	27,08	24,70	25,29	23,97	23,02	23,28	21,88	22,77
Ma Gr Sul	60,10	52,18	5238	46,22	50,95	48,15	47,62	42,59	39,70	35,83	40,56	39,25	39,52	33,88	35,39	38,08	37,58	33,52
Brasil	49,79	49,28	58,41	54,66	52,19	51,26	51,44	47,81	42,50	43,90	44,02	42,88	41,07	38,65	37,93	38,82	38,41	37,90

FONTE: BRASIL (2011)

### 2.4.3 Tuberculose no Paraná

No Estado do Paraná a situação assemelha-se ao resto do país como pode ser avaliado na Figura 5 sendo que a região litorânea é a que apresenta maior coeficiente de incidência de Tuberculose (Secretaria Estadual da Saúde do Paraná, 2010).

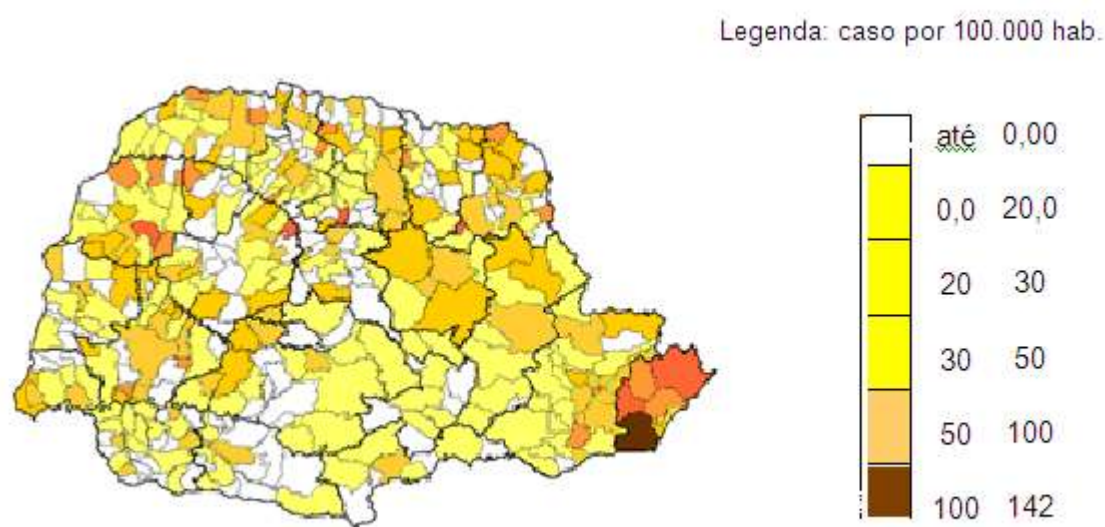


FIGURA 5 - COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DA TUBERCULOSE NO ESTADO DO PARANÁ PARA O ANO DE 2010 (MÉDIA: 23 CASOS/100.000 HAB).

FONTE: SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO PARANÁ, 2010.

Com relação ao coeficiente de mortalidade por tuberculose no Paraná observa-se através dos dados apresentados pela Secretaria de Saúde do Estado (2010) que houve uma redução nos índices de mortalidade no estado após 2003 quando as ações sugeridas pela OMS e pelo do Ministério da Saúde brasileiro contempladas no PNCT foram implementadas (Figura 6).

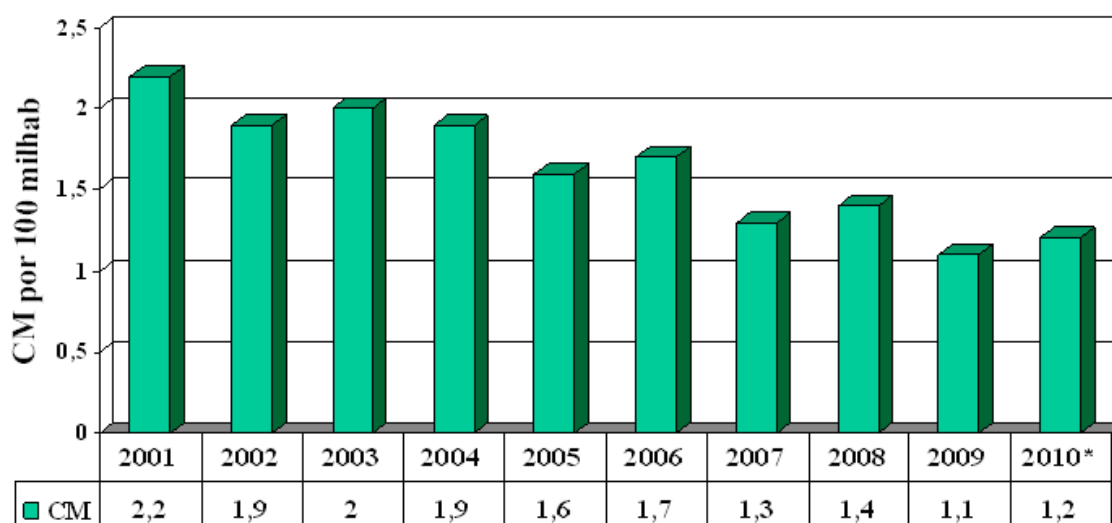


FIGURA 6 - COEFICIENTE DE MORTALIDADE POR TUBERCULOSE DO PARANÁ (2001 A 2010\*).

FUNTE: SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO PARANÁ (2010)

NOTA: \* DADOS PRELIMINARES

A Secretaria Estadual da Saúde do Paraná, em sintonia com o Programa Nacional de Controle da Tuberculose vem implementando ações visando reduzir ainda mais os índices de mortalidade no Estado. Para isso tem direcionado seus esforços visando o aumento da adesão ao tratamento diretamente observado de 50% para 75%, à busca de suspeitos e contatos e também ao aumento do número de exames de baciloscopia e cultura para BAAR realizados nos laboratórios especializados.

## 2.5 DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

Na tuberculose, como em qualquer outra doença infecto-contagiosa, a suspeita clínica começa com um quadro clínico de febre baixa, geralmente vespertina, sudorese noturna, indisposição e perda de peso. De acordo com a localização da doença podem surgir outros sinais e sintomas que podem estar relacionadas ao órgão acometido. Quando a doença é pulmonar a tosse produtiva e sangramento respiratório são os principais indícios além dos dados citados acima

podendo ocorrer outros sintomas que devem ser valorizados na investigação diagnóstica individualizada. Já na forma extrapulmonar estes sinais e sintomas serão direcionados ao órgão afetado (VERONESI, 2010).

Por ser uma doença infecciosa, a confirmação diagnóstica é dada pela identificação do agente etiológico em material da lesão. Até pouco tempo atrás, isso só era possível por meio de exames bacteriológicos (pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes - BAAR) e principalmente através da cultura (RIBEIRO,1955).

Hoje, com o desenvolvimento de técnicas imunológicas e de métodos de imagem, outros recursos podem ser usados para legitimar o diagnóstico.

Os métodos utilizados para o diagnóstico da TB podem ser divididos em bacteriológicos, radiológicos, histopatológicos e imunológicos. Destes métodos, os reconhecidos, recomendados pelo Ministério da Saúde e utilizados na rede brasileira de assistência à saúde seriam a baciloscopia de escarro (BAAR) - exame direto, a cultura, o raio x e a prova tuberculínica ou PPD (MS, 2010)

Na figura 7 fica demonstrado os exames diagnósticos mais utilizados para confirmação da suspeita clínica de tuberculose:

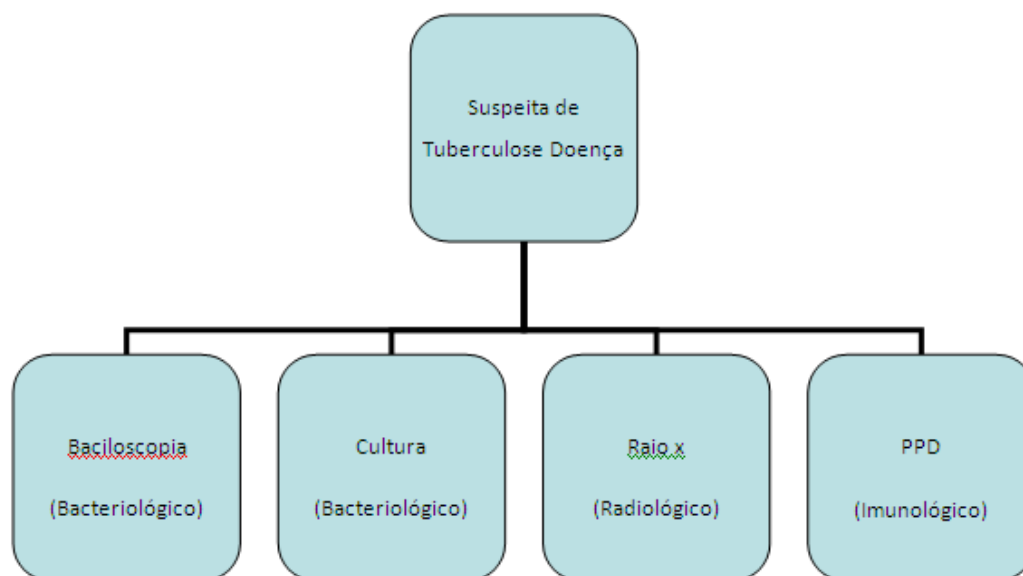


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DOS EXAMES DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS PARA CONFIRMAÇÃO DE CASOS DE TUBERCULOSE DOENÇA

FONTE: O autor

## 2.5.1 DIAGNÓSTICOS BACTERIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE

### 2.5.1.1 Exame Direto

O exame direto é feito através da análise do material da lesão ou de secreções. O material é corado com uma técnica específica (coloração de Ziehl-Neelsen), que permite identificar o Bacilo de Kock como uma micobactéria. É um método simples, rápido e de baixo custo, que não exige laboratórios sofisticados. No entanto, este exame só é positivo quando há grande número de bactérias no material examinado. Deve haver pelo menos 5.000 bacilos por mililitro, isto é, em pacientes paucibacilares ele poderá ser um falso negativo. Aproximadamente 60 a 80% dos doentes com lesão pulmonar são positivos à baciloscopia. Este exame também é utilizado para controle do tratamento (MS, 2010)

A baciloscopia de escarro deve ser realizada em, no mínimo, duas amostras: uma, por ocasião da primeira consulta, e outra, independentemente do resultado da primeira, na manhã do dia seguinte, preferencialmente ao despertar. Nos casos em que há indícios clínicos e radiológicos de suspeita de TB e as duas amostras de diagnóstico apresentem resultado negativo, podem ser solicitadas amostras adicionais.

### 2.5.1.2 Cultura

Os métodos de cultura de micobactérias utilizam a semeadura da amostra, em meios de cultura sólidos à base de ovo (meios de Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh – anexo 4). É o meio de menor custo e que apresenta um índice de contaminação cruzada pequena. O tempo de detecção do crescimento bacteriano nestes meios é muito longo podendo variar de 14 a 30 dias e se estender por até oito semanas. Permite identificar o bacilo como *Mycobacterium tuberculosis* e não

são necessários muitos bacilos no material examinado para se ter crescimento positivo. Este exame permite identificar a espécie da bactéria e testar sua sensibilidade aos quimioterápicos, exigindo assim maior sofisticação laboratorial que a baciloscopia (GOLDMAN, 2005).

A cultura para micobactéria é indicada nos casos de suspeita clínica e/ou radiológica de TB com baciloscopia repetidamente negativa, em suspeitos de TB com amostras paucibacilares (poucos bacilos) ou com dificuldades de obtenção da amostra (como em crianças), em suspeitos de TB extrapulmonar e em casos suspeitos de infecções causadas por Micobactérias Não Tuberculosas (MS,2010).

## 2.5.2 DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO

### 2.5.2.1 Raio x

O estudo radiológico é um método de diagnóstico para pacientes com suspeita de TB pulmonar e extrapulmonar, indicado também para pacientes imunodeprimidos e para doentes com sintomas respiratórios e baciloscopia negativa (OLIVEIRA, 2009).

Podem identificar uma doença em atividade ou uma doença do passado. Deve ser solicitada sempre que existir suspeita clínica de TB pulmonar. Todavia, até 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente em pacientes imunodeprimidos. Nos pacientes com suspeita clínica o exame radiológico permite a diferenciação de imagens sugestivas de tuberculose ou de outra doença, porém o exame bacteriológico e a cultura continuam indispensáveis (MS, 2010).

O estudo radiológico auxilia na diferenciação de formas de tuberculose de apresentação atípica e no diagnóstico de outras pneumopatias quando o paciente é portador de HIV/AIDS ou de outras situações de imunodepressão (MARAIS; PAI, 2007).

Em paciente com baciloscopia positiva, funciona para exclusão de outras doenças pulmonares associadas (como por exemplo, câncer de pulmão) que necessite de tratamento concomitante, além de permitir avaliação da evolução da doença.

#### 2.5.2.2 Exames de imagem

Algumas tecnologias inovadoras como tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR), ressonância magnética (RM) e tomografia com emissão de pósitrons (PET) podem auxiliar no diagnóstico de TB ativa e latente, tanto na forma pulmonar ou na extrapulmonar. Porém, devido ao alto custo, não são utilizadas rotineiramente (MS, 2010).

#### 2.5.3 PROVA TUBERCULÍNICA (PT) OU PPD

A prova tuberculínica (PT) consiste na inoculação intradérmica de um derivado protéico de *M. tuberculosis*. Esta prova serve para medir a resposta imunocelular a estes antígenos. É utilizada tanto em adultos como em crianças, para o diagnóstico de infecção latente por *M. tuberculosis* (ILTB). Na criança também é muito importante como método coadjuvante para o diagnóstico da tuberculose doença porém não diferencia infecção bacilar de doença em curso.

No Brasil, a tuberculina usada é o PPD-RT 23, derivado de uma partícula tuberculínica de Seibert para o State Serum Institute, na Dinamarca, que é aplicada por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1 mL, que contém 2 UT (unidades de tuberculina), e guarda equivalência biológica com 5 UT de PPD-S, utilizada em outros países (VERONESI, 2010).

A técnica de aplicação, de leitura e o material utilizado são padronizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A leitura deve ser realizada 48 a 72



horas após a aplicação, podendo este prazo ser estendido até 96 horas caso o paciente falte ao agendamento da leitura (GOLDMAN , 2005).

Para o resultado da leitura deve ser medido o maior diâmetro transverso da área intumescida e palpável, com régua milimetrada transparente e o resultado deve ser registrado em milímetros (MS, 2010).

De acordo com a leitura o resultado é classificado em:

- a) 00 mm a 04 mm - não reator
- b) 05 mm a 09 mm - reator fraco
- c) 10 mm ou mais - reator forte

A figura 8 retrata o momento de aplicação da solução do derivado protéico no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo na região mediana do antebraço, por via intradérmica.



FIGURA 8 - APLICAÇÃO DO PPD PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE  
FONTE: WWW.RIOBRANCO.AC.GOV.BR/V4/IMAGES/STORIES/2011

Reações falso-negativas podem ocorrer em idosos, crianças com menos de três meses, em pacientes com febre ou neoplasias, imunodepressão acentuada, gravidez, desnutrição, entre outros (MS, 2010)

#### 2.5.4 HISTOPATOLÓGICO

Por ser um método invasivo, é utilizado principalmente na investigação das formas extrapulmonares, ou nas formas pulmonares que se apresentam radiologicamente como doença difusa ou em indivíduos imunossuprimidos (MS, 2010). Nos pacientes comuns, a baciloscopia do tecido usualmente é negativa e a presença de um granuloma, com necrose de caseificação, é compatível com o diagnóstico de TB. Nos imunossuprimidos, o granuloma é menos freqüente, mas a positividade da baciloscopia no material de biopsia acontece freqüentemente. Não é considerado confirmatório para a espécie *M. tuberculosis* necessitando para isso cultura do material analisado (MS, 2010).

### 2.6 OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

#### 2.6.1 Testes imunológicos - Ensaio para detecção de gama interferon (IGRAs)

São baseados na estimulação da resposta celular utilizando peptídeos ausentes no BCG e em outras micobactérias atípicas como a ESAT6 e o CFP 10. O teste sorológico detecta a produção de gama interferon (interferongamma release assays – IGRAs) e utiliza amostras de sangue periférico do paciente. Também não distingue tuberculose infecção de tuberculose doença (MS, 2010).

Martire (2009), sugere que a eficácia deste teste em populações especiais como em indivíduos infectados pelo HIV e em crianças foi pouco avaliada.

### 2.6.2 Adenosinadeaminase (ADA)

Em amostras clínicas (fluidos), a detecção da ADA, enzima intracelular presente particularmente no linfócito ativado, pode auxiliar no diagnóstico da TB ativa (VOIGT *et al*,1989). O teste é colorimétrico baseado na técnica de Giusti comercializado, é de fácil execução em qualquer laboratório que disponha de espectrofotômetro. O aumento da atividade da ADA no líquido pleural associado a alguns parâmetros como idade (<45anos), predomínio de linfócitos (acima de 80%) e proteína alta (exsudados), é indicadora de pleurite tuberculosa. É um método barato, simples e rápido, de grande importância na investigação do derrame pleural e tuberculose peritoneal, no entanto, não é recomendado para o diagnóstico da meningoencefalite tuberculosa (MS, 2010).

### 2.6.3 Testes moleculares

São baseados na amplificação e detecção de seqüências específicas de ácidos nucleicos do complexo *M. tuberculosis* em amostras clínicas, fornecendo resultados em 24 a 48 horas, chamados testes de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN).

A complexidade dos TAAN comerciais existentes dificulta o seu uso e avaliação em países de elevada carga de tuberculose como o Brasil. Por seu elevado custo, sua complexidade na execução, necessidade de laboratórios altamente equipados e profissionais treinados seu uso rotineiro ainda não foi testado (MARTIRE, 2009).

Os TAAN foram aprovados em países industrializados apenas para uso em investigação de TB pulmonar, em pacientes adultos, sem história prévia de tratamento antituberculose, não substituindo o exame de cultura para micobactérias (M.S, 2010).

#### 2.6.4 Teste Xpert MTB / Rif (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA)

Baseia-se na purificação, concentração, amplificação de ácidos nucleicos e identificação de seqüência do gene *rpoβ*. Pode fornecer resultados em menos de 2 horas, sem necessitar de recursos humanos especializados em biologia molecular. Utiliza escarro como amostra a ser analisada. Está em fase de validação, porém, o teste Xpert MTB / Rif, no diagnóstico de TB pulmonar apresentou sensibilidade de 90,0% e especificidade de 97,9%.

Nos pacientes com suspeita de TB resistente a rifampicina, o teste Xpert MTB / Rif apresentou sensibilidade de 96,1% e especificidade de 98,6% para a definição terapêutica com maior potencial de cura (WHO, 2010).

Uma das dificuldades na utilização deste teste reside em seu custo, tanto do kit (em torno de R\$ 310,00 a unidade), como do equipamento necessário para realização do teste que tem um custo aproximado de R\$ 230.000,00 (Fonte: Luiz Gustavo Bastos – Médico Gerente de Projetos TB e Malária –MS –Brasil, junho/2010 informação pessoal).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a produção das proteínas recombinantes seguiu-se os procedimentos utilizados por MALAGHINI (2008) com modificações. O trabalho foi iniciado já com os plasmídeos construídos para a proteína ESAT 6.

A figura 9 resume as etapas realizadas no estudo de Malaghini (2008) desde o isolamento e preparação do DNA do bacilo da tuberculose até a introdução do DNA recombinante no vetor escolhido .

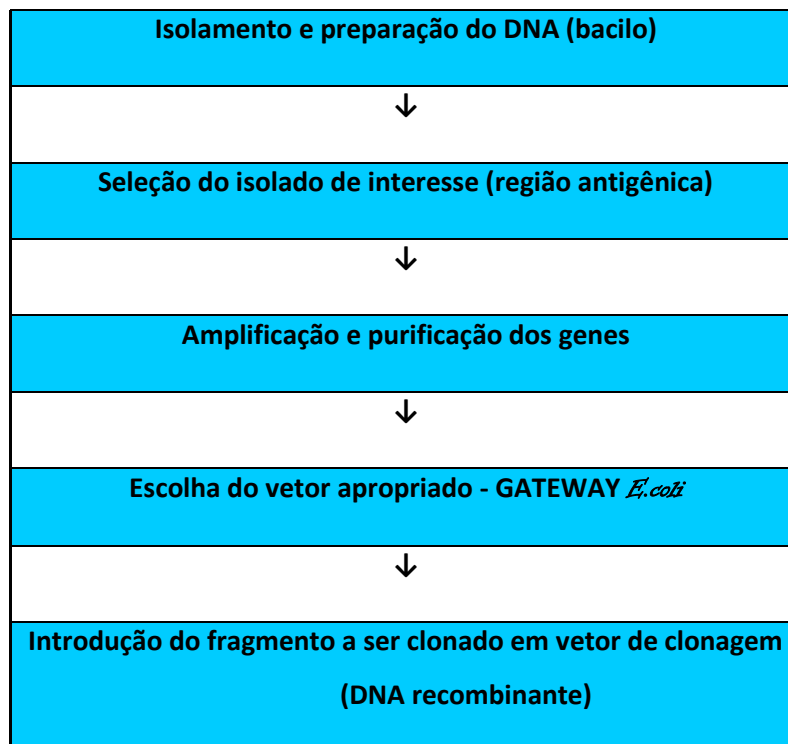


FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO PROCESSO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE,

FONTE: O autor

As etapas retrabalhadas segundo Malaghini (2008) e realizadas neste trabalho foram identificadas pela coloração turquesa na figura 10 e descritas a seguir.

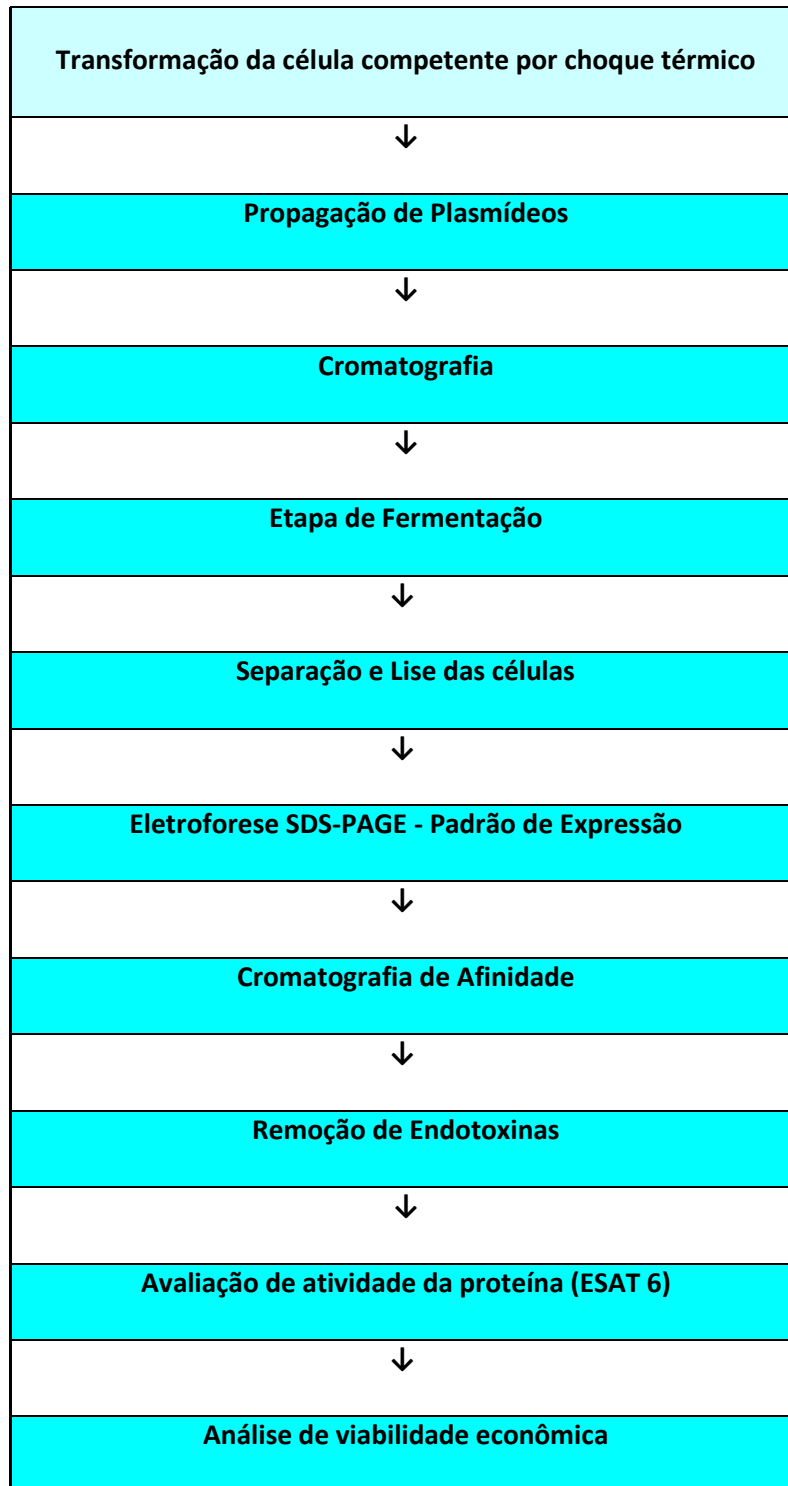


FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO PROCESSO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

FONTE: O autor

### 3.1 TRANSFORMAÇÃO DA CÉLULA COMPETENTE POR CHOQUE TÉRMICO

Esta etapa teve por objetivo transformar a célula competente, no caso a *E.coli* através do choque térmico, preparando-a para a fase de inoculação do plasmídeo.

Em 50 µl de células *E.coli* BL21pLysS, foram adicionados 5 µl de plasmídeo de expressão. As células foram mantidas em banho de gelo por 30 minutos e, em seguida, incubadas a 42° C por um minuto, retornando-se ao gelo por mais um minuto e 30 segundo. A seguir, foi acrescentado 1 mL de meio Luria Bertani (LB) e incubado a 37°C por uma hora, sob agitação de 220 rpm. A seguir as células foram semeadas em Agar Luria Bertani (LB) contendo ampicilina (100mg/mL) e mantidas a 37°C por 18 horas

### 3.2 PROPAGAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Após a transformação, 2 mL de meio LB com ampicilina (100 mg/ mL) foram inoculados com uma colônia de *E.coli* e mantida por 8 horas a 37°C numa agitação de 300 rpm. Em seguida, a cultura de células diluída 1:500 em meio LB com ampicilina foi cultivada a 37° C por 18 horas a 300 rpm.

As células foram recuperadas por centrifugação a 6000 g por 15 minutos a 4° C. A seguir deu-se início ao processo de purificação dos plasmídeos utilizando o kit comercial QIAprep Spin Miniprepe (Qiagen) conforme descrito por Malaghini (2008) no final do qual obtivemos um sobrenadante rico em plasmídeos .

### 3.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ESAT 6

Para a expressão da proteína ESAT 6, 100mL de cultura de *E. coli* BL21 pLysS foram adicionadas a 5uL de plasmídeo. A suspensão de células foi mantida em gelo por 30 minutos e em seguida incubada a 42 °C por dois minutos, retornando ao gelo por mais três minutos. A seguir foi adicionado 1 mL de meio LB e incubadas a 37° C por 1 hora , sob agitação constante a 220 rpm. A seguir as células foram inoculadas em 9 mL de meio LB contendo cloranfenicol (25mg/mL) e ampicilina (100mg/mL) e incubar a 37°C por 6 horas sob agitação de 220 rpm a 37°C. Após 6 horas, 90 mL de meio LB com cloranfenicol ( 25mg/mL) e ampicilina (100mg/mL) foram adicionado e a cultura foi mantida nas condições acima por 15 horas.

Após este período foi inoculado 900 mL de meio LB contendo cloranfenicol (25 mg/L) e ampicilina (100 mg/L) e incubado a 37°C sob agitação de 220 rpm a 37°C;

Após uma hora e 30 minutos foi monitorada a densidade óptica até que se obteve um valor de absorbância entre  $0,8 \pm 0,1$ .

Uma alíquota de 2 mL, denominada amostra não induzida, foi retirada e em seguida foi adicionado Isopropil- $\beta$ -D-Tiogalactopiranosídeo 0,1Mm (IPTG) visando à indução da expressão da proteína. A cultura juntamente com a amostra não induzida foi incubada a 37°C por duas horas sob agitação de 220 rpm. As células foram recuperadas por centrifugação a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C e armazenadas a -20°C.



## 3.4 PURIFICAÇÃO

### 3.4.1 Separação e lise das células

As células foram ressuspensas em tampão de sonicação (50 mM TRIS-HCL, pH 8,0) e a suspensão foi submetida à sonicação em potência 8 por 5 ciclos de 20 segundos em banho de gelo. Uma alíquota de 50 uL denominada amostra total, foi retirada e reservada. O restante da suspensão foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 4°C para obtenção das frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis. A fração solúvel foi armazenada a -20°C.

A fração insolúvel (pelete) foi ressuspensa em tampão de solubilização (uréia 8 M, imidazol 10 mM, NaCl 300 mM) e submetido à sonicação conforme descrito anteriormente. O material sonicado foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, denominado fração insolúvel foi armazenado a -20°C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.

### 3.4.2 SDS-PAGE

O padrão de expressão da proteína foi avaliado por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Para tanto amostras de proteínas das frações não induzidas, total, solúvel e insolúvel foram solubilizadas em tampão redutor, aquecidas por 10 minutos em banho-maria fervente e aplicada em gel de poliacrilamida de 15% a 30 mA. A coloração foi realizada por azul de Coomassie R-250, como solução de descoloração: metanol 30%, ácido acético 10%.

### 3.4.3 Cromatografia de Afinidade

A proteína recombinante ESAT 6 foi purificada através de cromatografia por afinidade (QIAGEM, 2003). As proteínas marcadas com histidina foram incubadas com resina contendo ácido nitriloacético em complexo de níquel (Ni-NTA) conforme indicação do fabricante. Para tanto, o extrato protéico foi aplicado à coluna pré-equilibrada com a solução de lise (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl e 10 mM imidazol). O eluente foi removido e a coluna foi lavada cinco vezes com a solução de 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl e 20 mM de imidazol. A proteína ligada foi recuperada por cinco eluições com 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl e 250 mM imidazol. A concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford e em seguida os eluatos foram analisados por SDS-PAGE para verificar a qualidade da purificação.

### 3.4.4 Remoção de endotoxinas

Esta fase teve como objetivo a remoção das endotoxinas de *E.coli* que poderiam ter contaminando a proteína produzida através da utilização do detergente TRITON X-114. O detergente foi adicionado à preparação protéica em uma concentração final de 1% v/v. A mistura foi incubada a 4°C por 30 minutos sob constante agitação e em seguida permaneceu em banho-maria a 37°C por 10 minutos sendo então centrifugar por 20000 g. A fase aquosa, com a proteína recombinante, foi cuidadosamente removida e o processo de remoção de endotoxinas foi repetido por mais duas vezes.

### 3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA

#### 3.5.1 Amostras de soros positivos e negativos

Para a execução dos testes ELISA foram necessárias coletas de amostras de sangue total de pacientes com diagnóstico confirmado para Tuberculose doença (controle positivo) e também de sangue total de pessoas saudas sem sintomatologia sugestiva de tuberculose doença (controle negativo). Estas amostras foram coletadas após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Trabalhador (anexo 5) .

As amostras utilizadas como controles positivos foram coletadas no Hospital São Sebastião da Lapa localizado no município da Lapa – PR., hospital referência em tisiologia no estado. Foram analisados os prontuários dos pacientes, identificando os pacientes em início de tratamento que apresentavam os critérios exigidos pelo Ministério da Saúde para diagnóstico de tuberculose ativa ou seja: tosse produtiva, baciloscopia ou cultura positiva para *M. tuberculosis* e exame de raio X sugestivo.

Já as amostras negativas foram coletadas de voluntários saudas, sem sintomatologia de tuberculose doença, moradores da cidade de Curitiba - Pr.

Nos dois casos a coleta foi realizada após assinatura do termo de consentimento informado exigido pelo Comitê de ética em Pesquisa. (Anexo 6). Foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue total de cada voluntário, sem utilização de anticoagulantes. Após a coleta as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos . A fração de soro de cada amostra foi identificada, aliquotada e armazenada a -20 °C até a realização do teste.

### 3.5.2 Teste ELISA

A imunorreatividade da proteína frente aos soros positivos e negativos foi realizada através do teste ELISA. Placas para ELISA (Cornig 2592, Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas com 100  $\mu$ L de proteína recombinante diluída em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6 *overnight* a 4° C. Para a padronização, diferentes concentrações de proteína (250, 500 e 1000  $\eta$ g por cavidade ) foram testadas. As placas foram lavadas três vezes com tampão Tween-salina 0,05 % (NaCl 0,9%- Tween 20 0,05%) e em seguida bloqueadas com 100  $\mu$ L de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS - Tween 20 0,5%) durante uma hora a 37°C. As placas foram lavadas e depois incubadas durante uma hora a 37°C com amostras de soro positivas e negativas diluídas em tampão de incubação ( 0,25% de caseína em PBS- Tween 20 0.05%). Para a padronização, as diluições de 1:200, 1:100, 1:50, 1:25 e 1:10 foram avaliadas. Após seis lavagens, adicionou-se anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugado à peroxidase (A0170, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído em tampão de incubação e incubou-se durante uma hora a 37°C. Quatro diferentes concentrações (1:2500, 1:5000, 1:10000 e 1:20000) foram avaliadas. As placas foram lavadas seis vezes e a reação foi revelada adicionando solução substrato (0,2 mg/mL de OPD em tampão citrato pH 5,0 contendo 0,2  $\mu$ L/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 %). Após a incubação de 15 minutos a temperatura ambiente a reação foi interrompida por adição de 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%. A leitura da absorbância foi realizada a 492  $\eta$ m. Os resultados foram expressos como média da absorbância de duplicatas.

As etapas do ELISA foram representadas na Figura 11.

SENSIBILIZAÇÃO DAS PLACAS COM A PROTEÍNA
↓ incubação 4° C – OVER NIGHT
ELIMINAÇÃO DO EXCESSO DAS PROTEÍNAS
↓ Lavagem
BLOQUEIO DA PLACA
↓ 37° C 60 MIN - LAVAGEM
DILUIÇÃO E APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS
↓ 37° C 60 MIN - LAVAGEM
DILUIÇÃO E APLICAÇÃO DO CONJUGADO
↓ 37° C 60 MIN - LAVAGEM

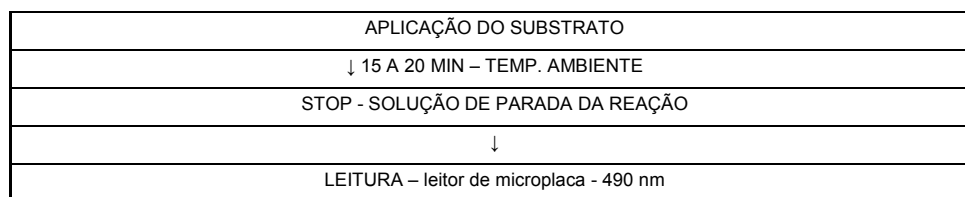


FIGURA 11 - ETAPAS PARA REALIZAÇÃO DO ELISA

FONTE: O autor

### 3.6 ANÁLISE ECONÔMICA

Para calcular o custo de produção de um kit ELISA para detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium tuberculosis* foi necessário estipular a produção suficiente para prover o mercado nacional. Para tal cálculo levou-se em consideração a série histórica de casos de tuberculose existentes no Brasil e o número de testes diagnósticos utilizados para identificação estes casos.

Como se trata de um kit diagnóstico que visa identificação de casos de tuberculose doença tomou-se como referência o exame de baciloscopia utilizado como primeiro exame para identificação dos casos.

Além da proteína recombinante - antígeno da reação - outros reagentes e produtos foram incluídos no cálculo para compor o valor total do custo do produto final. Fez parte desta análise deste kit o diluente do Antígeno (tampão de sensibilização), tampão de lavagem, soros controles positivos e negativos; tampão de bloqueio, tampão de incubação (diluente da amostra); conjugado, tampão do substrato, substrato, solução de parada, placas e embalagens.

Os valores utilizados foram obtidos por cotações em empresas do ramo, de produtos cuja qualidade e procedência eram conhecidas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PARAMETRIZAÇÃO DO TESTE

Para a parametrização do teste ELISA foi utilizada a proteína recombinante ESAT 6 produzida e purificada no laboratório de Bioprocessos da UFPR, em escala de bancada, através das técnicas de Malaghini (2008), utilizando os equipamentos disponíveis. Após esta fase a proteína foi testada frente a um pool de soros controles positivos (+) e soros controles negativos (-) para tuberculose doença.

Para a confecção do pool de soros positivos foram coletadas 100 (cem) amostras de sangue total de pacientes com diagnóstico confirmado de tuberculose doença. Para o pool negativo foram coletados 80 (oitenta) amostras de sangue de pessoas saudáveis, sem sintomatologia de tuberculose. Os parâmetros utilizados na parametrização foram diferentes concentrações de antígeno, diferentes diluições de soro e de conjugado (Figuras 12 e 13).

Para a validação desta proteína para o diagnóstico em humanos foram avaliadas as concentrações que variaram de 250 a 1000 ng de proteína; diluições do soro de 1:10 a 1:200 e quatro diluições do conjugado (1:2500; 1:5000; 1:10000 e 1:20000).

A figura 12 demonstra a tabulação efetuada durante a padronização das concentrações a serem utilizadas e os valores das leituras obtidas em absorbância, com ênfase na região de escolha da padronização.

		SOROS											
AG		+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	CONJ
250ng		1,410	1,325	0,260	0,252	0,938	0,939	0,241	0,223	0,553	0,147	0,182	
		1,323	1,334	0,267	0,311	0,859	0,871	0,277	0,279	0,645	0,160	0,232	
		1,092	1,020	0,205	0,217	0,724	0,740	0,186	0,202	0,498	0,148	0,174	
		0,792	0,811	0,165	0,154	0,491	0,513	0,141	0,130	0,354	0,108	0,097	
500ng		1,535	1,465	0,312	0,286	1,097	1,068	0,231	0,230	0,754	0,224	0,161	
		1,436	1,445	0,268	0,274	1,069	1,063	0,216	0,214	0,713	0,183	0,148	
		1,214	1,245	0,217	0,232	0,989	0,935	0,189	0,186	0,624	0,141	0,158	
		0,947	0,917	0,203	0,198	0,604	0,671	0,179	0,148	0,356	0,097	0,117	
		1:25				1:50				1:100			

FIGURA 12 - PLACA REPRESENTATIVA DAS LEITURAS EM ABSORBÂNCIA

FONTE: O autor

A figura 13 representa a placa do teste ELISA onde foram realizadas as leituras acima informadas, em destaque a concentração de escolha.

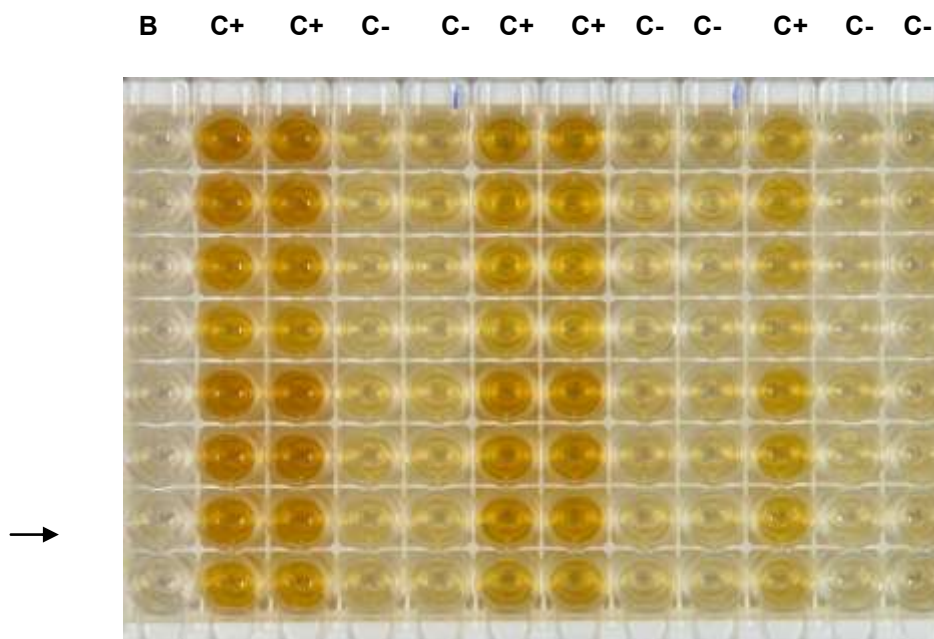


FIGURA 13 - PLACA REPRESENTATIVA DA REAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO USANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE ESAT 6

Optou-se para trabalhar com os parâmetros obtidos na combinação de 500 ng de antígeno, diluição do soro de 1:25 e diluição do conjugado em 1:10000 visto que a relação entre a absorbância do controle positivo e do controle negativo ficou em cinco pontos. Também contribuiu para esta escolha o fato que foram os parâmetros que apresentaram melhor reprodutibilidade na parametrização e que apresentaram menor probabilidade de erro do operador durante a diluição .

Para a confirmação da reatividade da proteína um segundo lote da proteína foi produzido e avaliado novamente nas mesmas condições comprovando a reatividade da proteína frente a dois soros controles positivos e dois soros controles negativos conforme demonstrado na figura 14:

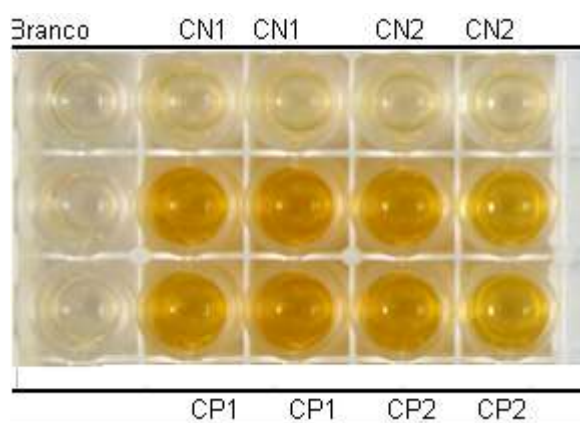


FIGURA 14 - REATIVIDADE DO SEGUNDO LOTE DA PROTEÍNA ESAT 6 FRENTE A SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TUBERCULOSE

NOTA: CN = CONTROLE NEGATIVO

CP = CONTROLE POSITIVO

#### 4.2 CÁLCULO DE CUSTO PARA MONTAGEM DO KIT DIAGNÓSTICO

Hoje, a OMS preconiza a realização de pelo menos duas coletas de amostra de baciloscopia para diagnóstico inicial da tuberculose, podendo ser solicitada a terceira amostra em caso de resultado negativo. Também recomenda o acompanhamento dos resultados do tratamento pelo mesmo exame. Calculando-se em média cinco exames/paciente/tratamento com uma média de 72.200 novos casos/ano no Brasil (OMS, 2010), teremos uma demanda aproximada de 361.000



exames/ano gerando um volume de produção de aproximadamente 5.000 placas de ELISA para suprir a necessidade brasileira anual.

Com base no rendimento de 2,48 mg/L relatado por Malaghini (2008), foi calculado o volume necessário de proteína a ser produzida anualmente para suprir a demanda estimada levando-se em conta uma perda de 20% durante a purificação. Com a finalidade de otimizar a produção de acordo com os tamanhos de reatores disponíveis no mercado e manter o produto com lotes recentes nas prateleiras, optou-se pela divisão da produção anual em três etapas (quadrimestrais) em reatores de 60L com produção de 40L de fermentado por etapa gerando 99,2 mg de proteína purificada.

#### 4.2.1 Custo de produção da proteína recombinante – antígeno da reação

Para a primeira etapa para produção de 120L de fermentado da proteína recombinante ESAT 6 o custo da matéria-prima empregada foi de R\$ 1827,90 Para a segunda fase o gasto foi de R\$ 402,45 para a produção dos Tampões de sonicação e de solubilização. A cromatografia de afinidade gerou um custo de R\$ 2353,00 para a coluna e de R\$ 471,41 para os tampões de ligação e de eluição. Isto se explica pelo alto custo da coluna de *sepharose*, porém este custo não será calculado nos outros dois lotes, pois a coluna poderá ser regenerada( Anexo 1).

Após a cromatografia a proteína foi purificada utilizando Triton e foi acrescido um conservante para evitar sua deterioração. Esta fase teve um custo aproximado de R\$ 1,76 (Anexo 1).

Para concluir o custo de produção da proteína recombinante foi necessário acrescentar ao custo gerado os gastos com mão de obra para execução das fases. Com a otimização dos trabalhos esta fase de produção levou em média cinco dias de trabalho quando contamos com a colaboração de 03 funcionários com um expediente de oito horas diárias (um farmacêutico e dois técnicos). Esta mão de obra teve um custo de R\$ 1.492,00 observando-se a remuneração média destes profissionais no mercado de trabalho( Anexo 1).

Desta forma, para a produção de quantidade de antígeno necessária para 5000 placas obteve-se um custo de R\$ 10.271,33 já incluído o valor de R\$ 2.353,00 correspondente ao preço da coluna de *sepharose* para cromatografia (Anexo 1).

TABELA 3 - CUSTO DIRETO APROXIMADO DE MATÉRIA-PRIMA E MÃO DE OBRA DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NECESSÁRIA PARA 5000 PLACAS ANUAIS

Fases	Custo para 40L (R\$)	Custo para 120 L (R\$)
Reagentes para Incubação	609,30	1.827,90
Sonicação e Solubilização	128,84	402,35
Cromatografia (coluna)	2353,00	2.353,00 (o mesmo)
Tampões cromatografia	471,41	1.414,23
Purificação	0,19	0,57
Conservante	0,396	1,19
Mão de obra	1424,00	4.272,00
TOTAL		10.271,25

FONTE: O autor

#### 4.2.2 Custo do reagente para realização do ELISA

Para realização do elisaimunoensaio foi necessário o antígeno, neste caso, a proteína recombinante e também uma gama de reagentes para que se completasse a reação.

No que diz respeito ao custo dos controles positivos e negativos, como são provenientes de doação, não apresentaram custo mensurável.

O diluente do antígeno (tampão de sensibilização) apresentou um custo de R\$ 33,35 para 5000 placas (Anexo 2).

Já o tampão de lavagem, calculando-se um consumo de um litro por placa apresentou um custo de R\$ 4.425,00 para 50 L volume necessário para 5000 placas (Anexo 2).

O tampão de bloqueio teve um custo de R\$ 212,75 para 5000 placas (Anexo 2).

O diluente da amostra calculando-se uma utilização de 10 mL por placa, num volume de 5L para 5000 placas tem um custo de R\$ 99,00 ( Anexo 2).

Para o conjugado adquirido da empresa Sigma o custo total somando-se diluente e conjugado foi equivalente a R\$ 3.185,00 para as 5000 placas ( Anexo 2)..

O custo do substrato contando todos os seus componentes equivale a R\$ 6.808,42 para 5000 placas e finalmente a solução de parada tem um custo de R\$ 142,50 para 5000 placas (Anexo 2).

A tabela 4 apresenta os custos de reagentes para a etapa de ELISA do kit.

TABELA 4 - CUSTOS REAGENTES PARA ETAPA DE ELISA DO KIT

Reagente	Custo para 5000 placas (R\$)
Diluente do Antígeno	33,35
Tampão de Lavagem	4.425,00
Tampão de Bloqueio	212,75
Tampão de Incubação	99,0
Conjugado	3.185,00
Tampão do Substrato	303,42
Substrato OPD	6.505,0
Solução de Parada	142,5
Total	17.906,02

FONTE: O autor

#### 4.2.3 Custo da embalagem

A embalagem externa do produto foi desenvolvida e confeccionada em papelão resistente e identificada com o nome do produto, componentes, temperatura de armazenamento, número de registro no Ministério da Saúde, fabricante, data de fabricação ,validade e número do S.A.C. para eventuais contatos.

Os frascos escolhido para os reagentes foram de polipropileno, branco leitoso e âmbar, dependendo da necessidade dos reagentes em evitar a luz solar.

Cada componente foi identificado com uma numeração seqüencial de acordo com sua utilização na reação e também foram desenvolvidos rótulos em cores diferentes para facilitar seu reconhecimento diminuindo assim os riscos de trocas durante a manipulação. Fazem parte do produto etiquetas adesivas e bula ( Anexo 3).

Na parte interna da embalagem externa foi impresso um protocolo esquemático para utilização do kit visando facilitar sua utilização.

O produto pronto denominado TB Test será comercializado em forma de Kits refrigerados a temperatura de 2° a 8° C (com o conjugado com conservação a -20°C) embalados em caixas de papelão contendo reagentes suficientes para 88 testes, seis controles e dois brancos.

A validade do produto será avaliada no decorrer dos estudos posteriores levando-se em conta a manutenção da integridade dos reagentes e sua reprodutibilidade de resultados.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO TB –TEST

<b>Numeração do Frasco</b>	<b>Componente</b>	<b>Volume/ Unidade</b>
01	01 Frasco Antígeno - Proteína Recombinante (Tampa Azul)	4 mL
02	01 Frasco Diluente do Antígeno (Tampão de sensibilização)	15 mL
03	01 Frasco Controle Negativo (Tampa Preta)	2 mL
04	01 Frasco Controle Positivo (Tampa Vermelha)	2 mL
05	01 Frasco Tampão de lavagem concentrado 10X	10 mL
06	01 Frasco Tampão de Bloqueio	15 mL
07	01 Frasco Diluente de Amostra	15 mL
08	01 Frasco Conjugado	1 mL
09	01 Frasco Diluente do Conjugado	15 mL
10	01 Frasco Diluente do Substrato	15 mL
11	01 Comprimido de OPD 2mg	Gr
12	01 Frasco Solução de Parada	10 mL
13	Placa com tiras removíveis	01 Placa
14	Etiquetas adesivas	5
15	Bula – Instruções de uso	1
16	Caixa de papelão externa	1

17

Etiqueta transparente para vedação

5

---

 FONTE: O autor

Utilizando este formato para a confecção do kit os gastos com a embalagem foram de R\$ 36.800,00 para 5000 kits, conforme relatado na tabela a seguir:

TABELA 6 - CUSTO DOS COMPONENTES DA EMBALAGEM

Insumo	Quant. Necessária p/5000 placas (unid)	Preços Por milheiro R\$	Preço Total R\$
Frascos plásticos	60.000	500,00	30.000,00
Etiquetas	50.000	35,00	1.750,00
Bula	5000	10,00	50,00
Embal.Secundária	5000	1000,00	5.000,00
Total R\$	-	-	36.800,00

---

FONTE: O autor

Na figura 15 apresentou-se o modelo de rótulos desenvolvidos para o produto visando melhor identificação de seus componentes.

# TBtest

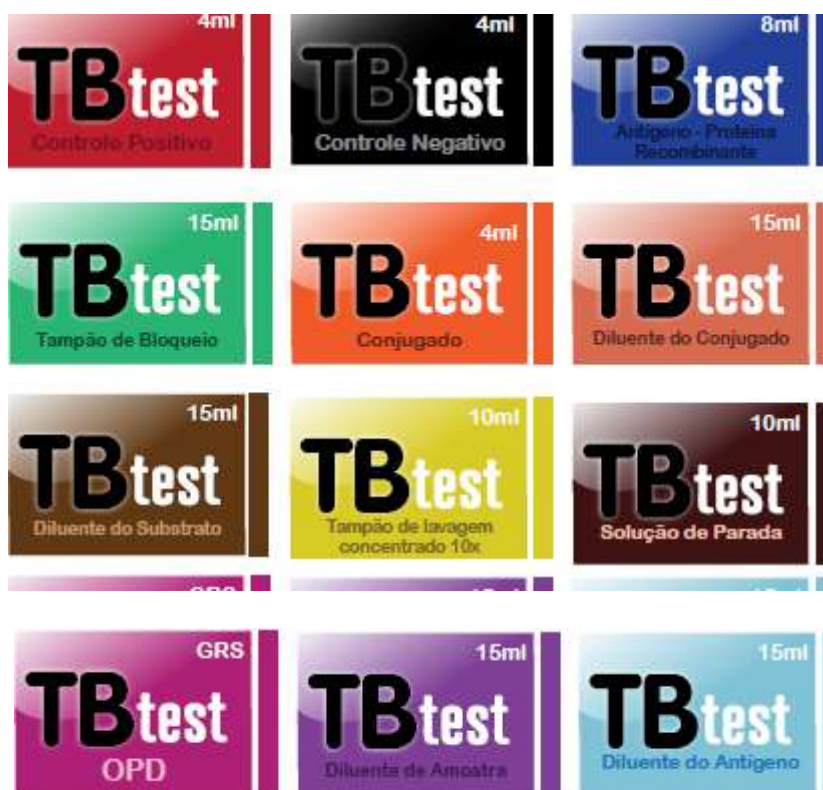


FIGURA 15 - MODELO DE RÓTULO EM ESTUDO

FONTE: O autor

#### 4.2.4 Custo total do exame para tuberculose utilizando proteína recombinante e método de enzimoimunoensaio

Após as análises de custo de produção constatou-se que um teste diagnóstico nos parâmetros apresentados neste trabalho apresentou um custo final de R\$ 15,89 por embalagem do Kit diagnóstico e de R\$ 0,18 por análise. Estes valores seriam possíveis caso fosse fabricado no Brasil, utilizando as instalações de uma indústria pré-existente já que os gastos com instalação, maquinário e

depreciação não foram incluídos nos cálculos, conforme demonstrado na tabela abaixo:

TABELA 7 - CUSTO DE PRODUÇÃO DO KIT PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE UTILIZANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE ESAT6 - CÁLCULO PARA PRODUÇÃO DE 5000 KITS ANUAIS

Fases	Para 5000 kits (440.000 testes) em R\$
Custo da Proteína recombinante	10.271,25
Custo dos Reagentes do Kit	14.906,02
Custo das Placas	17.500,00
Custo das Embalagens	36.800,00
<b>TOTAL</b>	<b>79.477,27</b>

FONTE: O autor

- a) Valor do Kit embalagem com reagentes suficientes para 88 testes: R\$ 15,89
- b) Valor do exame individual: R\$ 0,18

Nas figuras 16, 17 e 18 apresentamos algumas fotos do protótipo do kit desenvolvido .



FIGURA 16 - FOTO DO PROTÓTIPO DO KIT TB TEST COM SEUS FRASCOS NUMERADOS SEQUENCIALMENTE

FONTE: O autor





FIGURA 17 - FOTO DO PROTÓTIPO DO KIT COMPLETO  
FONTE: O autor



FIGURA 18 - FOTO DO PROTÓTIPO DO KIT COMPLETO  
FONTE: O autor

## 5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos mais rápidos de diagnóstico, seguros e sensíveis tornou-se um desafio e um obstáculo ao controle da tuberculose, quer seja sob o ponto de vista de diagnóstico quer seja do ponto de vista de controle epidemiológico.

A OMS tem recomendado e incentivado o desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas e através do programa STOP TB tem fornecido revisões periódicas sobre novos diagnósticos (OMS, 2010).

Como estas pesquisas derivam de um grande corpo de pesquisadores mundiais, estudos individuais apresentam dificuldades para desenvolver evidências para ratificar determinado teste diagnóstico a nível mundial.

Os avanços da genômica desde os anos 90 possibilitaram a identificação de segmentos exclusivos e de proteínas imunogênicas do *M. tuberculosis*. Dentre estas proteínas, a ESAT 6 (*early secretory antigen target*) tem se revelado de grande valor quando utilizadas como base para diagnósticos imunológicos (MARAES ; PAI, 2006).

Atualmente, os métodos de diagnóstico da tuberculose reconhecidos e recomendados pelo Ministério da Saúde são a baciloscopia de escarro (BAAR) - exame direto, a cultura, o raio x e o PPD.

Para o exame direto as vantagens são: simplicidade, rapidez nas análises e baixo custo. Todavia há também algumas desvantagens que merecem ser citadas como: necessidade de um grande número de bacilos na amostra para positividade; não diferencia as espécies de micobactérias, riscos na execução da técnica de coloração e na leitura e de contaminação do manipulador pela formação de aerossóis.

Quanto à cultura, nos casos de baciloscopia negativa, ela pode aumentar em até 30% a sensibilidade do diagnóstico bacteriológico da doença usando como material biológico o escarro. Além disto, ela permite identificar a espécie de micobactéria, pode ser positiva com poucos bacilos e permite avaliar a sensibilidade do bacilo aos quimioterápicos. As desvantagens são a demora dos resultados, ser

falso negativo em casos de coleta e transporte inadequado, necessitar de laboratório mais sofisticado para execução e apresentar risco de contaminação do manipulador.

O diagnóstico radiológico por sua vez auxilia na diferenciação de formas de tuberculose de apresentação atípica e no diagnóstico de outras pneumopatias no paciente portador de HIV/AIDS ou de outras situações de imunodepressão (MARAES ; PAI , 2007). Em paciente com baciloscopia positiva, funciona para exclusão de outras doenças pulmonares associadas além de permitir avaliação da evolução da doença em pacientes. Tem como vantagem permitir suspeita diagnóstica quando a imagem é sugestiva. No entanto, também possui desvantagens, pois não permite firmar o diagnóstico somente com a imagem.

A prova tuberculínica (PT) ou PPD aplicada por via intradérmica é de fácil execução, baixo custo e não necessita infra-estrutura laboratorial. No entanto, não permite distinguir infecção de doença, necessita pessoal treinado para a aplicação e a leitura, o paciente precisa fazer duas visitas à unidade de saúde, apresenta menor sensibilidade em grupo de risco e alta taxa de falso positivo e negativo devido à vacinação com BCG.

A interpretação e conduta diante do resultado da PT vão depender dos critérios epidemiológicos como risco de adoecimento, da idade, do tamanho do endurado e da probabilidade de contato com doentes.

Os testes sorológicos para diagnóstico da tuberculose com base em antígenos protéicos produzidos por *M. tuberculosis* têm sido estudados com resultados promissores. SABLE *et al.*(2005) sugeriram em seus estudos que os antígenos de baixo peso molecular de *M. tuberculosis* têm melhor imunodominância tais como ESAT6, CFP 10, CFP 21, MPT 51, MPT 63, MPT64, GLcB, GroES, HspX e Ag 85. Já em 2003, Singht *et al* testaram um ELISA para avaliar a resposta humoral aos antígenos MPT32 e GLcB com tuberculose ativa obtendo sensibilidade de 68% em MPT 32 e 75% em GLcB. WANG *et al.*(2005) demonstraram a resposta aos antígenos CFP 21, ESAT6, MPT63 e MPT65 frente ao anticorpo IgM – tanto em estudo individual como associados.

Na tabela 8 são apresentados alguns estudos sorológicos e imunológicos e suas respectivas sensibilidades e especificidade. Na tabela 9 fez-se um comparativo entre os testes diagnósticos mais utilizados, suas vantagens e desvantagens.

TABELA 8 - SUMÁRIO DE ESTUDOS REALIZADOS VISANDO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE POR TESTES IMUNO-SOROLÓGICOS

<b>Tipo de Diagnóstico</b>	<b>Autor, Ano</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Sensibilidade.</b>	<b>Especificidade</b>
Sorológico	Riga, 2002	LAN	69,4	94,8
Sorológico	Beck, 2003	Antígeno recombinante TBF6, TBF10, MTB81 e TB6/DPEP	–	–
Resposta imune celular	Tanji, 2005	ESAT-6, antígeno 85b, antígeno hbha	–	–
Reconhecimento dos antígenos recombinantes	Cardoso, 2007	Antígeno MPT-51 E GLCB IGM E IGG	Mpt -67,3	96,0
			GlcB-95,9	8,2 18,2
Diagnóstico imunológico	Van-Lume, 2008	ESAT-6 e CFP-10 2008- proteínas indutoras de IFN- $\alpha$ ELISA	58,8	95,2
Resposta imune e humoral.	Costa <i>et al.</i> , 2011	Antígeno HSP10 ou GroES- proteína secretada em choque térmico	78,3	31,76

FONTE: O autor

TABELA 9 - COMPARATIVO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS MAIS UTILIZADOS, SUAS VANTAGENS E DESVANTAGENS

TESTE DIAGNÓSTICO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
BACILOSCOPIA	simplicidade e rapidez nas análises, baixo custo( R\$ 4,5)	necessidade de um grande número de bacilos na amostra para positividade; não diferencia as espécies de micobactérias; riscos na execução da técnica de coloração e na leitura e de contaminação do manipulador pela formação de aerossóis.
CULTURA	identifica a espécie de micobactéria; pode ser positiva com poucos bacilos; permite avaliar a sensibilidade do bacilo aos quimioterápicos. Baixo custo ( R\$ 5,63)	demora dos resultados; pode ser falso negativo em casos de coleta e transporte inadequado; necessita de laboratório mais sofisticado para execução, risco de contaminação do manipulador
RAIO X	permite a suspeita diagnóstica quando a imagem é sugestiva (custo: R\$15,3)	não permite firmar o diagnóstico somente com a imagem.
EXAME DE IMAGEM	imagens mais específicas	custo elevado não permite firmar o diagnóstico
PPD	fácil execução; baixo custo; não necessidade de infraestrutura laboratorial.	não distinguir infecção de doença; necessário duas visitas à unidade de saúde; necessário pessoal treinado; menor sensibilidade em grupo de risco; alta taxa de falso positivo e negativo devido à vacinação com BCG.

continua

continuação

TESTE DIAGNÓSTICO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
HISTOPATOLÓGICO	auxilia no diagnóstico de formas extrapulmonares;	agressivo, não é confirmatório; riscos na execução para o paciente
DETECÇÃO DE GAMA INTERFERON (IGRAs)	a amostra analisada é de fácil coleta (sangue periférico), rápido (24 horas); paciente visita uma vez o laboratório; não tem interferência da vacinação BCG nem interferência na leitura do resultado.	custo elevado, necessidade de laboratório diferenciado; não distingue tuberculose latente de doença
ADENOSINA DEAMINASE	barato, fácil execução, simples, não bacteriológico (utiliza amostra de líquido ascítico, pleural, etc) não necessita laboratório sofisticado.	não é confirmatório de tuberculose, somente sugestivo .
TESTES MOLECULARES (TAAN)	utilizam pequena quantidade de material para analisar;	elevado custo, complexidade na execução, necessidade de laboratórios altamente equipados e profissionais treinados.
TESTE Xpert™ MTB / Rif	rapidez de resultados, sensibilidade e especificidade elevada	custo do equipamento e do kit, não inclui a cultura para confirmatório (R\$ 230.000,00 e R\$ 310,00)

---

 FONTE: O autor

Neste trabalho procurou-se estimar os custos para produção de um dos antígenos recombinantes de *M.tuberculosis* descritos por Mallaghini (2008), para ser utilizado em um teste diagnóstico sorológico através de técnica de enzimoimunoensaio e também o valor diagnóstico do reconhecimento desta proteína recombinante por anticorpos IgG de soro de pacientes com Tuberculose doença. Nesta estimativa foram considerados os custos diretos (matéria-prima e mão-de-obra) desde a produção da proteína recombinante até a realização final do teste.

Pode-se verificar que a proteína ESAT 6 apresentou reatividade por ELISA diante de um pool de amostras sorológicas humanas positivas para tuberculose através de exames diagnóstico padrões. Também se verificou que a proteína ESAT 6 não apresentou reatividade perante um pool de amostras humanas supostamente negativas.

Através da parametrização da reação de enzimoimunoensaio constatou-se que uma concentração de 500ng desta proteína seria suficiente para padronizar um teste diagnóstico direcionado à identificação de pacientes com tuberculose doença, ou seja, que produzissem anticorpos contra *M. tuberculosis*.

Através dos cálculos efetuados com base em valores reais do mercado atual constatou-se que a produção de um antígeno recombinante é viável à realidade brasileira, obtendo custos abaixo das metodologias convencionais e que uma análise imunoenzimática apresentaria um custo aproximadamente 20 (vinte) vezes menos que uma baciloscopia tradicional.

É claro que este estudo somente delineou parâmetros para a possibilidade da utilização da proteína ESAT 6 recombinante com finalidade diagnóstica. Estudos de sensibilidade e especificidade devem ser conduzidos com um número maior de amostra, multicêntricos, para que se estabeleça a reprodutibilidade dos resultados comparando-os com exames já consagrados pela história.

Outras proteínas recombinantes poderão ser incluídas no estudo visando melhorar a especificidade e sensibilidade do kit, avaliando-as em conjunto visto que o custo de fabricação do kit ficou abaixo do esperado o que não tornaria o produto inviável ao mercado nacional.

Neste contexto podemos concluir que o método diagnóstico ELISA avaliado neste trabalho apresenta como vantagens perante os outros métodos utilizados para diagnóstico da tuberculose a utilização de amostra de sangue como material de análise, rapidez nos resultados, simplicidade na execução, menor risco do manipulador e um custo reduzido. Como desvantagem, necessita de estudos aprofundados com relação a sua capacidade de diagnosticar a tuberculose doença ou infecção e principalmente necessita de uma variedade de estudos com relação a sua especificidade, reprodutibilidade e sensibilidade para que possa vir a ser um dia o referencial para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da tuberculose.



## 6 CONCLUSÃO

- 1) A proteína recombinante ESAT 6 de *M. tuberculosis* produzida segundo MALAGHINI (2008) mostrou-se promissora como antígeno de reação de um teste ELISA para diagnóstico de tuberculose doença.
- 2) Na parametrização do ELISA para identificação de Tuberculose doença utilizando proteína recombinante obteve-se resultados condizentes quando comparados com teste consagrados como baciloscopia e cultura.
- 3) A avaliação dos custos de produção de um kit diagnóstico utilizando proteína recombinante mostrou-se viável à realidade brasileira desde que incorporado a um laboratório pré-existente.
- 4) O desenvolvimento de um método diagnóstico adaptado à realidade brasileira possibilitará um maior avanço nos estudos epidemiológicos da doença e desta forma mapear com maior fidedignidade o perfil epidemiológico da tuberculose em todos os estados do Brasil.
- 5) São necessários estudos suplementares para verificar reatividade com população de imunossuprimidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V.; VALLECILLO, A.J.; GUTIERREZ-PABELLO, J.A.; SUAREZ-GÜEMES, F.; MCNAIR J; CATALDI, A.; ESPITIA, C.; ANDERSEN, P. POLLOCK, J.M. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44(12), p. 4326-4335, 2006.

AIDA, Y.; PABST, M.J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **Journal of Immunological Methods**, v. 132, p. 191-195, 1990.

BAPTISTA, I.M.F.D.; OELEMANN, M.C.; OPRMOLLA, D.V.A.; SUFFYS, P.N. Drug resistance and genotypes of strains of *M. tuberculosis* isolated from human Immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1147-1152, 2002.

BARROSO, WJ. **O trabalhador do setor saúde, a legislação e seus direitos sociais**. Boletim de Pneumologia Sanitária 2001; p. 60-77.

BASSO, A.J. **Genotipagem, utilizando a seqüência de inserção IS6110, de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes portadores da infecção pelo HIV em Moçambique, África**. Campinas, 2006, 70 f. Dissertação (Mestre em Clínica Médica). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

BELLAMY R. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. **Thorax**, v. 53(7), p. 588-593.129

BERGEY'S. **Manual of Systematic Bacteriology**. 9.ed. Baltimore, EUA: Williams & Wilkins, v. 2, p. 1436-1438, 1986.

BIFANI, P.J.; MATHEMA, B.; KUREPINA, N.E.; KREISWIRTH, B.N. Global dissemination of the *M. tuberculosis* W-Beijing family strains. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 45-52, 2002.

BOESEN H.; JENSEN B.N.; WILCKE T.; ANDERSEN, P. Human T-Cell responses to secreted antigen fraction of *M. tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 63(4), p. 1491-1497, 1995.

BOOM, W.H.; CANADAY, D.H.; FULTON, S.A.; GEHRING, A.J.; ROJAS, R.E.; TORRES, M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis**, v.86, p. 98-106, 2003.

BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M.M.; DE GOES MADEIRA, S.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; SILVA, P.E.A.; DELLAGOSTIN, O.A. Molecular characterization of *M.tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1338-1344, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico para o Controle da Tuberculose**, n. 148, 6ª Ed, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tuberculose Todas as Formas: Distribuição de casos novos e óbitos**, Brasil, 1980 – 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde **Distribuição de casos novos e óbitos**, Brasil, 2005

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório da Situação: Paraná**, 3ª Ed, 2007

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano Nacional de Controle da Tuberculose**. Disponível em [HTTP://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional). Acesso em: 05/11/2010.

BRENNAN, P. WHO Tuberculosis Diagnostic Workshop. **World Health Organization Global Tuberculosis Programme. Tests for infection (prevalence surveys) and current technology as applied to low income countries**. Cleveland, EUA, 1997. P.8-9.

CAFRUNE, P.I.; RILEY, L.W.; POSSUELO, L.G.; VALIM, A.R.; BORGES, M.; RIBEIRO, M.O.; ROSSETTI, M.L.; ZAHA, A. Recent transmission of tuberculosis involving retired patients. **Journal of Infection**, v. 53, p. 370-376, 2006

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. **Revue de Tuberculose et de Pneumologie**, v. 27, p. 217, 1963.

CHAN, E. D., REVES, R.; BELISLE, J.T.; BRENNAN, P.J.; HAHN, W.E. Diagnosis of tuberculosis by a visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 1713–1719, 2000.

CHUNG, K.T.; BIGGERS, C.J. Albert Léon Charles Calmette (1893-1933) and the antituberculous BCG vaccination. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 44, p. 379-389, 2001.

CONSENSO BRASILEIRO DE TUBERCULOSE, 2. Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto, v. 30 (1), jun., 2004. 86 p. Suplemento

COSTA J C, SANTOS, A C, RODRIGUES, L C. Tuberculose em Salvador: custos para o sistema de saúde e para as famílias - **Revista de Saúde** 2005

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R; CATALDI, A; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, DM; BUTLER, W.R.; DAWSON, D; RODRÍGUEZ, Dom; LOUREIRO, J; ROMANO, MI; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M. BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *M. tuberculosis* complex: *M. pinnipedii* sp. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1305-1314, 2003.

DALL'STELLA, R. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de tuberculina com cepas brasileiras de *M. tuberculosis* para diagnóstico da tuberculose em humanos**. Curitiba, 2003, 133 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

DALL'STELLA, R.; KRIEGER, M.A.; BURGER, M.; AGOTTANI, .B.; CHAHAD-EHLERS, S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Development of bioprocess for the production of purified protein derivative with Brazilian strains of *M. tuberculosis* for diagnosis use. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 278-287, 2007.

DANIEL, T.M.; DEBANNE, S.M. Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis. **Chest**, v. 88(3), p.388–392, 1985.

DATASUS. Disponível em: [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br) Acesso em: 23/07/2011.

DAVIS,G.D.; ELISEE, C.; NEWHAM, D.M.; HARRISON, R.G. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65(4), p. 382-388, 1999.

FANDINHO, F.C.O.; KRITSKI, A.L.; HOFER, C.; CONDE, J.R.H.; FERREIRA, R.M.C.; SAAD, M.H.F.; SILVA, M.G.; RILEY, L.W.; FONSECA, L.S. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among

hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 271-275, 2000.

FINE, P.E.M. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, p. S353-S359, 1989.

FINKBEINER, W.E. "**Respiratory pathology**. General Features of Respiratory Pathology". In: MURRA, Y.J.F.; NADEL, J.A. *Respiratory Medicine*, 2<sup>a</sup> ed., WB Saunders company, 1994.p. 441-468.

GARAY, S.M. Pulmonary tuberculosis. In: ROM, W.N.; GARAY, S. **Tuberculosis**. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 345-394.

GARCIA-GARCIA M.; PALACIOS-MARTINEZ M.; PONCE-DE-LEO, N.A.; JIMENEZCORONA, M.E.; JIMENEZ-CORONA, A.; BALANDRANO-CAMPOS, S.; OLIVERA-DIAZ, H.; VALDESPINO-GOMEZ, J.L.; SMALL PM. The role of core groups in transmitting *M. tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, p. 12-17, 2000.

GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; FRANKEN, K.L.M.C.; SUBRANTO, Y.W.; WIELES, B.; AREND, S.M.; SAMPAIO, E.P.; BOER, T.D.; FABER, W.R.; NAAFS, B.; OTTENHOFF, T.H.M. Identification and Characterization of the ESAT-6 homologue of *M. leprae* and T-cell cross-reactivity with *M. tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 70(5), p. 2544-2548, 2002.

GOESSENS, W.H.F.; DE MAN, P.; KOELEMAN, J.G.M.; LUIJENDIJK, A.; TE WITT, R.; ENDTZ, H.P.; VAN BELKUM, A. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BD ProbeTec ET Assays for Detection of *M. tuberculosis* in Respiratory Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 2563-2566, 2005.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Doenças Pulmonares. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de Medicina Interna**, 22<sup>a</sup> ed., 2005.

GUINN, K.M.; HICKEY, M.J.; MATHUR, S.K.; ZAKEL, K.L.; GROTZKE, J.E.; LEWINSOHN, D.M.; SMITH, S.; SHERMAN, D.R. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/ CFP-10 and for virulence of *M. tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 359-370, 2004.

HESS, J.; KAUFMANN, S.H.E. Development of novel tuberculosis vaccine. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences** v. 2, p. 953-958, 1999.

HUEBNER, R.E.; SCHEIN, M.F.; BASS, J.B.Jr. The tuberculin skin test. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 968-975, 1993.

INVITROGEN. Gateway® Technology. **A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems.** Ed E. USA: Invitrogen, 2003.

JANKNECHT, R.; DE MARTYNOFF, G.; LOU, J.; HIPSKIND, R.A.; NORDHEIM, A.; STUNNENBERG, H.G. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 8972-8976, 1991.

KATOMAEDA, M.; Small P.M. User's guide to tuberculosis resources on the Internet. **Journal of Clinical Investigation**, v. 10, p. 533-537, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. W. C. **Diagnóstico microbiológico**, texto e atlas colorido. 5.ed. São Paulo: Medsi, p. 903-96;2001

KRITSKI, A.L.; CONDE, M. B; de SOUZA, G.R.M. **Tuberculose**: do ambulatório à enfermaria. São Paulo: Atheneu, 2000.

KUBICA; G P; WAYNE, L G The mycobacteria - a sourcebook, Marcel Dekker, New York, p. 721-760.1984

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Basingstoke, v.227, n.5259,p.680-685, aug.1970.

LIGHTBODY KL, RENSHAW PS, COLLINS ML, WRIGHT RL, HUNT DM, GORDON SV, HEWINSON RG, BUXTON RS, WILLIAMSON RA, CARR MD. Characterization of complex formation between members of the *M. tuberculosis* complex CFP-10/ESAT-6 protein family: towards an understanding of the rules governing complex formation and thereby functional flexibility. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 255-262, 2004.

LINDWALL, G.; CHAU, M.; GARDNER, S.R.; KOHLSTAEDT, L.A. A sparse matrix approach to the solubilization of over expressed proteins. **Protein Engineering**, v. 13(1), p. 67-71, 2000.

LIPSKY, BA; GATES, J; TENOVER, FC; FLORDE, JJ. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 6(2), p. 214-222, 1984.

LIU, S.; TOBIAS, R.; MCCLURE, S.; STYBA, G.; SHI, Q.; JACKOWSKI, G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. **Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 455-463, 1997.

MALAGHINI, M. **Proteínas Recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* para auxílio diagnóstico da tuberculose**, 2008.

MARAIS BJ, PAI M 2006. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. **Archives of Disease in Childhood** 92: 446-452.2007

MARIANI, F.; PICCOLELLA, E.; COLIZZI, V.; RAPPUOLI, R.; GROSS, R. Characterization of an IS-like element from *M. tuberculosis*. **Journal of General Microbiology**, v. 35, p. 273-277, 1997.

MARKS, G.L. Genetics of Tuberculosis. In: BASS, J.B. Tuberculosis. **The Medical clinics of North America**. v. 77; p. 1219-1233, 1993.

MARTIRE, T.M. Diagnóstico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos. **Pulmão RJ** 2009; supl 1:20-S27.

METCHOCK, B.G.; NOLTE, F.S.; WALLACE, R.J. M. In: MURRAY, P.K. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington DC: American Society for Microbiology, p.399-439, 1999.

MILTGEN, J.; MORILLON, M.; KOECK, J.L.; VARNEROT, A.; BRIANT, J.F.; NGUYEN, G.; VERROT, D.; BONNET, D.; VINCENT, V. Two Cases of Pulmonary Tuberculosis Caused by *M. tuberculosis* subsp. *canetti*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8(11), p. 1350-1352, 2002.

MURTHY, M.K.; PARASA, R.R.V.; DEENADAYALAN, A.; SHARMA, P.; RAJA, A. Evaluation of the diagnostic potential of region of deletion-1–encoded antigen culture filtrate protein-10 in pulmonary tuberculosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 295–302, 2007.

ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD. **Tuberculosis**: hoja informativa 2004, Américas. Ginebra; 2004. Disponível em: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tbfact/sheet-2004.html>; Acesso em: 25/09/2011. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005.

PAI, M.; RILEY, L.W.; COLFORD, J.M. Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4(12), p. 761-776, 2004.

PALOMINO, J.C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **European Respiratory Journal**, v. 26, p. 339-350, 2005.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Número De Casos Novos De Tuberculose Pulmonar Bacilífero, Todas As Formas e Coeficiente de Incidência por 100.000 Habitantes.** Disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br/>> Acesso em 21/05/2011.

PETERSON, E.M.; NAKASONE, A.; PLATON-DELEON, J.M.; JANG, Y.; DE LA MAZA, L.M.; DESMOND, E. Comparison of Direct and Concentrated Acid-Fast Smears To Identify Specimens Culture Positive for Mycobacterium spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 3564-3568, 1999.

RENSHAW, P.S.; PANAGIOTIDOU, P.; WHELAN, A.; GORDON, S.V.; HEWINSON, R.G.; WILLIAMSON, R.A.; CARR, M.D. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *M. tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10 and the ESAT-6/CFP-10 complex: Implications for pathogenesis and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 21598–21603, 2002.

RIBEIRO, L. **Medicina no Brasil Colonial.** Rio de Janeiro: Sul Americana, 1971.

RIBEIRO, L. **Tisiólogos ilustres.** Rio de Janeiro: Sul Americana, 1955.

RIBEIRO, L **A luta contra a tuberculose no Brasil** (apontamentos para sua história). 1955

RIBEIRO, S.N.; GERHARDT FILHO, G.; LAPA e Silva, J.R.; SOUZA, G.R. Tuberculose. In: **Bethlem, N. Pneumologia.** São Paulo: Atheneu, 4<sup>a</sup> ed., 1995. p. 379-448.

RICHELDI, L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v 174, p. 736–742, 2006.

RIGA, M Testemunho da tuberculose anti lipoarabinomannan, 2002 ***Mycobacterium tuberculosis.***

ROM, W N, GARAY, S. **The origins of and the notion of its contagiousness.** Boston: Little, Brown and Company; 1995.



RUFFINO-NETTO, A. Tuberculosis: the neglected calamity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35(1), p. 51-58, 2002.

RUNYON, 1970, SOMMERS; GOOD, 1985 tuberculosis pathogenesis, protection and control, ed. Barry R Bloom 1994. **American Society for Microbiology Washington DC 2005** Cap. 7

SABLE *et al*, **Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis***. 2005

SANT'ANNA, C C 2001 Dificuldades e desafios do diagnóstico da tuberculose pulmonar na infância. **Revista Pediátrica Ceará**, 2001.

SCHIRM, J.; OOSTENDORP, L.A.; MULDER, J.G. Comparison of Amplicor, in-house PCR, and conventional culture for detection of *M. tuberculosis* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33(12), p. 3221-3224, 1995.

SOINI, H.; MUSSER, J.M. Molecular diagnosis of mycobacterium. **Clinical Chemistry**, Washington, DC. v. 47, p. 809-814, 2001.

SOUZA, WV; ALBUQUERQUE, MFM; BARCELLOS, CC; XIMENES, RAA; CARVALHO, MS. Tuberculosis in Brazil: construction of a territorially based surveillance system. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 1, 2005.

STEWART, G.R.; ROBERTSON, B.D.; YOUNG, D.B. Tuberculosis: a problem with persistence. **Nature**, v. 1, p. 97-105, 2003.

STRASSLE, A.; PUTNIK, J.; WEBER, R.; FEHR-MERHOF, A.; WUST, J.; PFYFFER, G.E. Molecular epidemiology of *M. tuberculosis* strains isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p.374-378, 1997.

TDR; FIND. **Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential**. Geneva: WHO Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2006.

TORREA, G.; OFFREDO, C.; SIMONET, M.; GICQUEL, B.; BERCHE, P.; PIERREAUDIGIER,C. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *M. tuberculosis* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1043-1049, 1996.

VAN LUMEN ,D .S.M **Diagnostico imunológico da tuberculose infantil** ,2008

VAN PINXTEREN; LAH, RP, AGGER EM, POLLOCK J, ANDERSEN, P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 7: 155-160 2000

VERONESI, R; FOCACCIO. R. Tratado de infectologia: v.1. São Paulo, Atheneu, 2010.

VOIGT, MD; TREY, C; LOMBARD, C *et al.* Diagnostic value of ascites deaminase in tuberculosis peritonitis. *Lancet*. 1989.

WANG J Y, HSUEH PR, LEE LN, *et al.* ***Mycobacterium tuberculosis* inducing disseminated intravascular coagulation.** 2005.

WEISS, S, BODMER, T ; SCHOPFER, K; MORDASINI, C. **Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community.** *Lancet*, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control. Country profile-Brazil.** Geneva: Switzerland; 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report 2006: Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning financing.** World Health Organization. Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing.** Geneva: WHO Report, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing.** Geneva: WHO Report, 2010.

YOUNG, D. B. M. protein antigens: a compilation. **Molecular Microbiology**, v. 6(2), p. 133- 45, 1992.

YOUNG, D.B. Ten years of research progress and watch's to come. **Tuberculosis**. v. 83, p.77-81, 2003.

**ANEXO 1 – CÁLCULOS DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

**Custo total de Matéria prima para produção de 40 litros de fermentado:**

Insumo	Quant. Necessária (40 LITROS)	Preços por gr (R\$)	Preço Total (R\$)
TRIPTONA	400 gr	0,78	312,00
NaCl	400 gr	0,05	20
EXTRATO DE LEVEDURA	50 gr	1,01	50,5
CLORANFENICOL	1 gr	8,07	8,07
AMPICILINA	4 gr	20,6	82,4
IPTG	0,953 gr	140	133,42
ANTIESPUMANTE	2 gr	1,44	2,9088
TOTAL	-	-	609,30

**Segunda fase: tampão de sonicação e solubilização**

Tampão de sonicação (1,125 litros)

Insumo	Quant. Necessária (40 LITROS)	Preços por gr	Preço Total (R\$)
TRIS HCl	10 gr	0,59	5,9

Tampão de solubilização (1,125 litros)

Insumo	Quant. Necessária (40 LITROS)	Preços por gr (R\$)	Preço Total (R\$)
URÉIA	600gr	0,19	114
IMIDAZOL	1 gr	13,0	13
NaCl	25 gr	0,05	1,25
Total			128,25

**Terceira fase:**

Cromatografia de Afinidade

Insumo	Quant. Necessária (120 LITROS) *	Preços por gr (R\$)	Preço Total (R\$)
Resina:	: 40 mg de proteína/ml de resina		
Coluna de níquel 5 ml : sepharose 6 fast flow			
Total			R\$ 2.353,00

\* Custo para uso em todo o processo de produção (120 litros)

Tampão de Ligação: 500 ml

Insumo	Quant. Necessária (40 LITROS)	Preços por gr (R\$)	Preço Total (R\$)
TAMPÃO (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )FOSFATO	20MMOL(141,95)	0,308	0,874
NaCl	0,1 M(58,44gr)	0,05	0,292
IMIDAZOL	30MMOL(68,08)	13	26,55
PH 7 -total	-	-	27,72

Tampão de Eluição: 250 ml

Insumo	Quant. Necessária (40 l)	Preços por gr (R\$)	Preço Total (R\$)
TAMPÃO FOSFATO	20MMOL(141,95)	0,308	0,874
NaCl	0,1M (58,44gr)	0,05	0,292
IMIDAZOL	500MMOL(68,08)	13	442,52
PH 7 total			443,69

**Quarta fase :Purificação: TRITON X114**

Insumo	Quant. Necessária (40 l)	Preços por ml (R\$)	Preço Total (R\$)
Triton X114	1 ml	0,19	0,19

**Quinta fase - adição de conservante : Sulfato de Hidroxiquinolina  
potássica : 0,1g/l**

Insumo	Quant. (40 l)	Necessária	Preços por gr (R\$)	Preço Total (R\$)
Conservante	0,1gr		3,96	0,396

**Sexta fase: Cálculo do tempo de produção de 01(um) lote**

FASE	TEMPO PROCEDIMENTO	DO	PROFISSIONAIS ENVOLVIDOS	CUSTO /HORA
INÓCULO	16HS		2 TECNICOS 1 FARMACÊUTICO	
1º BIORREATOR	2 HORAS		2 TECNICOS 1 FARMACÊUTICO	
2º BIORREATOR	4HORAS		2 TECNICOS 1 FARMACÊUTICO	
SEPARAÇÃO DA BIOMASSA	4 HORAS		2 TECNICOS 1 FARMACÊUTICO	
SONICAÇÃO/CENTRIFUGAÇÃO SOLUBILIZAÇÃO/ CROMATOGRAFIA	8 HORAS		2 TECNICOS 1 FARMACÊUTICO	
TRITON/ELETROFORESE/ DOSAGEM DASPROTEÍNAS	8 HORAS		2 TECNICOS 1 FARMACÊUTICO	
PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS	8 HORAS'		2 TECNICOS 1 FARMACÊUTICO	

Tempo Produção	de	Profissional Envolvido	Custo/mês (R\$)	Custo total (R\$)
5 dias		Farmacêutico (1)	R\$ 21,6 Hora(R\$5200,00)	864,00
5 dias		Técnico de laboratório(2)	R\$7,00(R\$1650,00)	560,00
Total		-	-	1424,00

**Custo Total de produção da proteína recombinante necessária para 5000 placas anuais:**

<b>Fases</b>	<b>Custo para 40litros R\$</b>	<b>Custo para 120 litros R\$</b>
Reagentes para Incubação	609,30	1827,90
Sonicação e Solubilização	134,15	402,45
Cromatografia (coluna)	2353,00	2353,00( o mesmo)
Tampões cromatografia	471,41	1414,23
Purificação	0,19	0,57
Conservante	0,396	1,19
Mão de obra	1424,00	4272,00
TOTAL em R\$	-	10271,33

**ANEXO 2 - CÁLCULO DO CUSTO TOTAL DO KIT ELISA – REAGENTES E  
EMBALAGEM**



**Diluyente do Antígeno (Tampão de sensibilização):**

Insumo	Quant. Necessária p/ 5000 placas (g)	Preços por gr (R\$)	Preço Total R\$
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	45,83g	0,323	14.80
NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6	175 g	0,106	18.55
Total em R\$	-	-	33,35

**Tampão de Lavagem**

Insumo	Quant. Necessária p/ 5000 placas g	Preços por gr (R\$)	Preço Total R\$
NaCl	45 000 g	0,05	2250
TWEEN 20	2.500ml	0,87	2175
Total R\$	-	-	4425

**Tampão PBS**

Insumo	Quant. Necessária p/ 1000 ml	Preços por Gr(R\$)	Preço Total (Litro) R\$
NaCl	8,77g	0,05	0,438
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,92g	0,308	0,59
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.39g	0,502	0,196
Total R\$	-	-	1,224

**Tampão de Bloqueio**

Insumo	Quant. Necessária p/ 5000 placas	Preços por g ou ml	Preço Total
Caseína 2%	1000g	0,13	130
TWEEN 20 0,05%	25 ml	0,87	21,75
PBS	50.000ml	0,00122	61,0
Total R\$			212,75

**Tampão de Incubação (Diluyente da Amostra)**

Insumo	Quant. Necessária p/ 5000 placas	Preços por Gr	Preço Total
Caseína 0,25%	125	0,13	16,25
TWEEN 20 0,05%	25 ml	0,87	21,75
PBS	50.000	0,00122	61,00
Total R\$			99,00

**Conjugado**

Insumo	Quant. Necessária p/ 5000 placas	Preços por ml	Preço Total( R\$)
Conjugado Sigma	5 ml	637,00	3185,00

**Tampão do Substrato**

Insumo	Preços por Gr (R\$)	Preço Total (R\$)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,308	134,90
AC. Cítrico	0,634	164,52
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,4 ml	4,00
Total R\$		303,42

**Substrato**

Insumo	Quant. Necessária p/ 5000 placas	Preços por gr	Preço Total R\$
OPD	10g	605,5	6505,00

**Solução de Parada**

Insumo	Quant. Necessária p/ 5000 placas	Preços por ml (R\$)	Preço Total R\$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%	1250 ml	0,114	142,5

**Placa tiras removíveis**

Insumo	Quant. Necessária p/ 5000 placas	Preços por placa	Preço Total R\$
Placas	5.000	3,5	17.500,00

### Custos Reagentes para etapa de ELISA do kit

Reagente	Preço em R\$ para 5000 placas
Diluyente do Antígeno	33,35
Tampão de Lavagem	4425,00
Tampão de Bloqueio	212,75
Tampão de Incubação	99,0
Conjugado	3185,00
Tampão do Substrato	303,42
Substrato OPD	6505,00
Solução de Parada	142,50
Total	14906,02

### Componentes da Embalagem

Insumo	Quant. Necessária p/5000 placas (unid)	Preços Por milheiro R\$	Preço Total R\$
Frascos plásticos	60.000	500,00	30.000,00
Etiquetas	50.000	35,00	1750,00
Bula	5000	10,00	50,00
Embalagem Externa	5000	1000,00	5000,00
Total R\$	-	-	36.800,00

### Custo Total de produção do Kit para diagnóstico de Tuberculose utilizando a proteína recombinante ESAT6 - cálculo para produção de 5000 kits anuais

Fases	Para 5000 kits (440.000 testes) em R\$
Custo da Proteína recombinante	10.271,25
Custo dos Reagentes do Kit	14.906,02
Custo das Placas	17.500,00
Custo das Embalagens	36.800,00
TOTAL	79.477,27

Valor do Kit embalagem com reagentes suficientes para 88 testes: R\$15,89. Valor do exame individual: R\$ 0,18

**ANEXO 3 - BULA DO KIT TB TEST**

## TB TEST – ELISA para TUBERCULOSE (TB)

### INSTRUÇÕES DE USO

#### 1. EXPLICAÇÃO DO TESTE

##### Introdução

A tuberculose é uma doença altamente infecciosa causada pela *Mycobacterium tuberculosis* e é uma doença potencialmente fatal para o ser humano. É transmitida quase que exclusivamente via aerossol, a partir de secreções respiratórias dos pacientes aos seus contatos. A tuberculose pode afetar vários órgãos do organismo, no entanto mais de 80% dos casos de tuberculose estão limitados aos pulmões. Recentemente a tuberculose associada ao HIV e a tuberculose resistente a esquemas multi-droga estão aumentando. Não é fácil detectar a tuberculose no início da infecção, considerando que existem poucos sintomas. O teste de tuberculina na pele ou raio x do tórax pode ser utilizado para rastrear a tuberculose. No entanto, estes métodos requerem procedimentos complexos ou podem não confirmar que uma pessoa apresenta a tuberculose. Os testes sorológicos podem suplantar estas desvantagens com seus métodos simples e rápidos.

##### Princípio

O dispositivo do teste TB TEST tornar-se-á visível de resultados se houver anticorpos suficientes contra a proteína Esat 6 de *M. tuberculosis* na amostra. Se os anticorpos contra a proteína ESAT 6 de *M.tuberculosis* não estiverem presentes ou estiverem presentes em níveis muito baixos na amostra, nenhuma cor irá aparecer.

##### Uso

O TB test é um imunoensaio cromatográfico para a detecção qualitativa de anticorpos contra *M. tuberculosis* em soro humano. Este teste destina-se ao uso profissional como um recurso auxiliar na detecção de anticorpos contra *M. tuberculosis* no soro humano. Uma proteína recombinante especificamente a ESAT 6 é utilizada no teste como material de captura dos anticorpos e um conjugado anti-IgG humana possibilita que TB TEST identifique anticorpos contra TB no soro humano, com um alto grau de precisão.

## 2. MATERIAIS FORNECIDOS

O teste TB TEST contém os seguintes itens e material suficiente para 88 (oitenta e oito) TESTES DIAGNÓSTICOS, 2(dois)BRANCOS, 3(três) CONTROLES NEGATIVOS, 2(dois) CONTROLES POSITIVOS e 1(um) CONTROLE INTERNO.

### TESTE:

1. TB TEST

2. Instruções de uso

Composição:

Numeração do Frasco	Componente	Volume/ Concentração
01	01 Frasco Controle Negativo (Tampa Preta)	2 mL
02	01 Frasco Controle Positivo (Tampa Vermelha)	2 mL
03	01 Frasco Antígeno Proteína Recombinante (Tampa Azul)	4mL
04	01 Frasco Diluente do Antígeno (Tampão de sensibilização)	15 mL
05	01 Frasco Tampão de Bloqueio	15 mL
06	01 Frasco Diluente de Amostra	15 mL
07	01 Frasco Conjugado	2mL
08	01 Frasco Diluente do Conjugado	15 mL
09	01 Frasco Diluente do Substrato	15 mL
10	01 Comprimido de OPD	g
11	01 Frasco Tampão de lavagem concentrado 10X	10 mL
12	01 Frasco Solução de Parada	10 mL
13	Placa com tiras removíveis	01 Placa
14	Etiquetas adesivas	5
15	Bula orientativa	1
16	Caixa de papelão externa	1
	Etiqueta transparente para vedação	5

## 3. MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO INCLUIDOS NO KIT

a) Micropipetas e pipeta multicanal (opcional).

- b) Ponteiros descartáveis para micropipetas.
- c) Água destilada ou deionizada.
- d) Sistema de lavagem automática de microplacas (opcional)
- e) . Estufa com temperatura regulável a 37°C..

#### 4. PRECAUÇÕES E CUIDADOS

O teste é sensível ao calor.

Não utilizar após o vencimento de seu prazo de validade.

#### 5. ESTOCAGEM E ESTABILIDADE

O KIT TB TEST deve ser estocado em geladeira à temperatura de 2°C e 8°C.e o CONJUGADO deve ser mantido a -20°C até o momento do uso.

Estável até a data indicada na embalagem quando mantido na embalagem não aberta entre 2°C e 8°C e o CONJUGADO a -20°C.

Validade: em estudo

#### 6. COLETA E ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS

- a) O teste deve ser realizado utilizando soro humano.
- b) Se as amostras não forem testadas imediatamente, devem ser refrigeradas entre 2-8°C. Para períodos de estocagem acima de três dias recomenda-se o seu congelamento. Devem estar na temperatura ambiente quando da realização do teste.
- c) Congelamentos e descongelamentos repetitivos podem causar resultados errôneos.
- d) As amostras contendo precipitados podem fornecer resultados de teste inconsistentes.
- e) O uso de amostras hemolisadas, lipêmicas ou bacteriologicamente contaminadas deve ser evitado. Podem ocorrer resultados errôneos.

## 7. AVISOS

- a) Exclusivamente para uso diagnóstico in vitro.
- b) Não comer ou fumar enquanto manipular as amostras.
- c) Utilizar luvas de proteção ao manusear as amostras. Após a finalização do teste, lavar as mãos.
- d) Limpar completamente os respingos utilizando um desinfetante apropriado.
- e) Descontaminar e descartar todas as amostras, dispositivo de teste e materiais potencialmente contaminados como se fossem dejetos contaminados em coletor específico para materiais biológicos.
- f) Não utilizar o teste se sua embalagem estiver danificada ou a selagem rompida.

## 8. PROCEDIMENTO

- a) Retirar o Kit da geladeira e aguardar até que atinja a temperatura ambiente.
- b) Colocar 100 µl, por cavidade, de solução de antígeno diluído em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6 (coating buffer) gerando uma concentração de 500ng por poço
  - Incubar a placa durante 14 horas à temperatura de 4 a 8 °C.;
  - Lavar a placa, três vezes, com solução de lavagem (NaCl 0,85%, tween 20 0,05%);
  - Bloquear a reação com a adição de 100 µl, por cavidade, de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS com 0,05% de tween 20);
  - Incubar a placa por uma hora a 37 °C;
  - Lavar a placa, três vezes, com tampão de lavagem ;
  - Diluir o soro 1:25 em tampão de incubação (0,25% de caseína, 0,05% de tween 20, em PBS), adicionar 100 µl por cavidade;
  - Incubar a placa por uma hora a 37 °C;
  - Lavar a placa, seis vezes, com solução de lavagem;



- Adicionar de 100 µl, por cavidade, do conjugado anti-IgG peroxidase (sigma A-6154) diluído em tampão de incubação a 1:10.000;
- Incubar por uma hora a 37 °C;
- Lavar a placa, seis vezes, com solução de lavagem;
- Adicionar de 100 µl, por cavidade, de substrato/cromógeno contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OPD (Ortofenilelodiamino);
- Incubar durante 15 minutos a 25 °C ou a temperatura ambiente na ausência de luz;
- Interromper a reação com 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5%;
- Leitura da absorbância, empregando comprimento de onda de 492 nm até no máximo 30 minutos após a parada da reação.

## 8. INTERPRETAÇÃO DO TESTE

### Cálculo do «cutoff» (ponto de corte)

Logo após a leitura, deve-se calcular o valor de «cut off» a partir dos valores de absorbância dos poços correspondentes aos controles positivos e negativos.

O «cut off» se determina utilizando a seguinte equação:

$$\text{«Cut off»} = (\text{média controles positivos} + \text{média controles negativos}) \times 0,35$$

### Determinação de resultados

Uma amostra será positiva quando sua absorbância for maior que o «CUT off». Um soro será negativo quando sua absorbância for menor que o «cut off». As amostras cuja absorbância encontre-se em uma categoria de «cut off» ± 10% devem ser consideradas duvidosas e deverão ser novamente analisados em duplicata.

## 9. LIMITAÇÕES DO TESTE

. Como todos os testes diagnósticos, um diagnóstico clínico definitivo não de e se basear nos resultados de um único teste, mas só deve ser

estabelecido pelo médico após todos os dados laboratoriais e clínicos terem sido avaliados.

#### 10. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O TB TEST está em fase de validação, não apresentando até o momento dados suficientes para esta análise.

Produzido por: UFPR- PR

CNPJ Fone/Fax: (0xx41) XXXX-XXXX

Téc. Resp. Dra Sandrely C.M. Rocha / CRF-PR: 4239

Para uso exclusivo diagnóstico "in vitro"

Reg. ANVISA nº XXXXXXXXXXXXX

KIT - CONSERVAR ENTRE +2°C e 8°C.

CONJUGADO - CONSERVAR a -20°C

POTENCIALMENTE INFECTANTE.

PARA DESCARTE, CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO

SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE:

Quaisquer dúvidas técnicas no manuseio deste kit ou no seu procedimento, contatar a ASSESSORIA CIENTÍFICA.

Atendimento ao consumidor - Fone (0XX) XXXXXXXX

## **ANEXO 4 – FÓRMULAS DOS REAGENTES UTILIZADOS**

## a) Lista de reativos utilizados para o teste ELISA

- Ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ );
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ );
- Bicarbonato de sódio ( $Na_2HPO_4$ );
- Caseína;
- Carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ );
- Cloreto de sódio ( $NaCl$ );
- Fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4$ );
- Hidróxido de sódio ( $NaOH$ );
- Ortofenilenodiamino (OPD);
- Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ );
- Tween 20

b) Solução de Sensibilização ou Tampão Carbonato 0,005M  
(coating buffer)

- Solução A: 1,1 g  $Na_2CO_3$  para 200 ml de  $H_2O$  deionizada
- Solução B: 4,2 g  $NaHCO_3$  para 1000 mL  $H_2O$  deionizada
- Adicionar A em B acertar o pH para 9,6

## c) Solução de Lavagem

- $NaCl$  – 9 g
- Tween 20 – 0,5 mL
- Água deionizada q.s.p 1000 mL

## d) Solução de Bloqueio

- Caseína 2 % -20g
- Tween 20- 0,05% - 0,5 g
- PBS (pH 7,4 )q.s.p 1000 mL

- e) PBS pH 7,4 (Tampão fosfato)
- NaCl – 8,77g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,92g
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,39
  - Água deionizada q.s.p 1000 mL
  - Acertar o pH em 7,4
- f) Solução de diluição de Soro e Conjugado (Tampão de incubação)
- Caseína – 0,25% -2,5 g
  - Tween 20 – 0,05% -0,5 g
  - PBS qsp. 1000 mL
- g) Solução para diluição do substrato (Tampão Citrato)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 7,1 g
  - Ácido cítrico – 5,19g
  - Água deionizada q.s.p. 1000 mL
  - Ajustar pH 5,0
- h) Solução Substrato- OPD 2mg
- OPD – 2mg
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 2 µl
  - Tampão citrato - 13 mL
  - OBS: solução fotossensível – preparar no momento do uso
  - Manter ao abrigo da luz
- i) Solução de Parada (Ácido)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1 mL
  - Água deionizada – 19 mL

j) Meio de Cultura para Bacilos de Koch . Löwenstein Jensen

- FÓRMULA / PRODUTO
- Ovos de galinha frescos
- Meio base - fórmula:
- Fosfato monopotássico 1,2 g
- Sulfato de magnésio 0,12 g
- Citrato de magnésio 0,3 g
- L-asparagina 1,8 g
- Fécula de batata 15,0 g
- Glicerol 6,0 mL
- Ovos totais 500 mL
- Solução de Verde de malaquita a 2% 10 mL

**ANEXO 5 - AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA  
SESA**

Curitiba, 29 de Junho de 2010.


**Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos  
SESA/HT**

<b>Protocolo:</b> CEP-SESA/HT n.º 196/2010	<b>CAAE:</b>
<b>Projeto de Pesquisa:</b> Produção de Tuberculifa Recombinante de Mycobacterium Tuberculosis em Escala Bancada e Piloto para Elaboração de Kits de Diagnóstico da Tuberculose	
<b>Pesquisador:</b> Sandrely Costa Machado Rocha	
<b>Patrocinador:</b> não consta	
<b>Instituição:</b> Regionais de saúde/Hosp: Regional Lapa e Hemepar	
<b>Área Temática Especial:</b> Grupo 1	
<b>Data de apresentação ao CEP:</b> 10/06/2010	<b>Data de Entrega do Parecer:</b> 29/06/2010

O Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná/Hospital do Trabalhador analisou na sessão de dia **24 de Junho de 2010** o processo N.º **196/2010**, referente ao projeto de pesquisa: **"Produção de Tuberculifa Recombinante de Mycobacterium Tuberculosis em Escala Bancada e Piloto para Elaboração de Kits de Diagnóstico da Tuberculose"**, tendo como pesquisador (a) **Sandrely Costa Machado Rocha**.

Mediante a importância social e científica que o projeto apresenta e a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável a realização do projeto classificando-o como **APROVADO**. O mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS. Solicita-se ao pesquisador o envio a este CEP de relatórios sobre o andamento da pesquisa bem com o envio de relatório final.

Atenciosamente,



Dr. Mauro Batista Albano

Vice-coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos - SESA/HT



**ANEXO 6 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**Título do Projeto: ENGENHARIA ECONÔMICA PARA A PRODUÇÃO**  
**DE UM KIT ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE UTILIZANDO**  
**PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

PESQUISADOR: Sandrely Costa Machado Rocha

ORIENTADOR: Vanete Thomaz Soccol

LOCAL DA COLETA DE AMOSTRAS PARA A PESQUISA: Unidades da Secretaria Estadual da Saúde do Paraná direcionados ao Controle, Tratamento e Investigação da doença TUBERCULOSE no Paraná: - Hospital Regional São Sebastião da Lapa – Lapa-PR, Regionais de Saúde, Paranaguá-PR e Hemepar (controles negativos)

LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS RELACIONADOS À PESQUISA: Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Biologia Molecular da UFPR – End: Francisco H dos Santos, 200 -Jardim das Américas – Curitiba-PR

**PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO**

Você esta sendo convidado (a) a participar de um estudo científico sobre tuberculose que está sendo desenvolvida pelo Departamento de Biotecnologia do programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), por um profissional de saúde, agora denominado PESQUISADOR.

Para participar, é necessário que você leia este documento com muita atenção. Caso você não entenda alguma palavra ou frase, por favor, peça aos responsáveis pelo estudo que expliquem detalhadamente as palavras ou procedimentos que você não tenha entendido claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará sua permissão para usar uma amostra de seu sangue para ser utilizada no estudo. O documento descreve o objetivo do estudo, os procedimentos,

benefícios e eventuais riscos ou desconfortos que podem ocorrer caso queira participar.

Você só deve participar do estudo se quiser. Você pode se recusar a participar deste estudo a qualquer momento.

## INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das doenças infecciosas documentadas desde a mais longa data e que continua a afligir a humanidade nos dias atuais. É causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. É considerada uma doença socialmente determinada, pois sua ocorrência está diretamente associada à forma como se organizam os processos de produção e de reprodução social, assim como à implementação de políticas de controle da doença.. A tuberculose pulmonar é a forma mais frequente e generalizada da doença. Uma avaliação médica completa para a tuberculose inclui um histórico médico, um exame físico, a baciloscopia, o teste subcutâneo (PPD), uma radiografia do tórax e culturas microbiológicas que são demoradas. Todos os anos 60 milhões de pessoas são infectadas com tuberculose. Embora atualmente esta doença seja tratável, ainda mata anualmente 2.5 milhões de pessoas. Sem um controle muito mais eficaz, cerca de 1.5 bilhão de pessoas serão infectadas e 3.5 milhões morrerão de tuberculose até 2020. O Brasil é, segundo dados de 2010 do Ministério da Saúde, o 19º país com maior número de casos da doença.

## PROPÓSITO DO ESTUDO

Com este estudo pretende-se validar um Teste de Diagnóstico para confirmação da Tuberculose por Enzimoimunoensaio (ELISA), utilizando como antígeno as proteínas recombinantes do bacilo, obtidas através de biologia molecular, buscando identificar os anticorpos presentes no soro de pacientes afetado pela doença.

## SELEÇÃO

Para ser incluído na pesquisa você precisa ser diagnosticado Tuberculose Positivo através de alguns dos exames a seguir: Raio X do Tórax Positivo, PPD reativo, cultura para tuberculose Positivo ou ter sido diagnosticado sintomaticamente. A coleta de sangue será realizada pela Pesquisadora Sandrely C.M.Rocha. Na ocasião da coleta serão feitas algumas perguntas sobre o tempo que você tem a doença, os medicamentos que está utilizando, onde você contraiu a doença, seu nome endereço e outras perguntas importantes e relacionadas a esta enfermidade.

## PROCEDIMENTO PARA A COLETA DA AMOSTRA DE SANGUE

Serão coletados cerca de 10 a 15 mL de sangue de seu braço, este material será encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular da UFPR - Jardim Botânico – Curitiba –PR onde será centrifugado , separado a porção denominada soro onde serão realizados os testes propostos. Na ocasião da coleta, o paciente poderá sentir a dor da picada da agulha, que é passageira e, alguns pacientes poderão apresentar hematomas(manchas roxas) no local da punção. Isto é perfeitamente normal e poderá ser solucionado com compressas de gelo no local. Caso o hematoma persista favor entrar em contato com o pesquisador pelo telefone 041-3281-2624 ou comparecer no Laboratório de Biologia Molecular da UFPR – End: Francisco H dos Santos, 200 - Jardim das Américas –Curitiba –Paraná , no período das 13:30 às 17:30 HS às terças e quintas-feira.. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como as indenizações legalmente estabelecidas.

#### PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar deste estudo. Uma vez que você decidiu participar deste estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao que você tenha direito. – Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

#### CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

#### PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS

O Pesquisador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você, relativas ao período de tempo de sua doença, cidades onde morou, se mais alguém da família já teve a doença, sintomas e outras perguntas relacionadas à tuberculose. Todos estes dados serão usados para a avaliação do estudo, membros do Comitê de Ética e Autoridades de Saúde podem revisar os dados fornecidos. Os dados podem ser utilizados em publicações científicas sobre o assunto estudado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância. Você tem direito de acesso aos seus dados.

#### CONTATO PARA PERGUNTAS E DÚVIDAS

Se você ou seus parentes tiver(em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos dos pacientes ou no caso de danos relacionados ao estudo , você deve contactar com o pesquisador (investigador) do estudo pelo telefone 041-3281-2624 ou seu orientador – Prof. Vanete – telefone 041-3361-3191. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como paciente de pesquisa , você poderá contatar com o Comitê de Ética em Pesquisa da SESA/HT pelo telefone: 041-32125700.

#### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Eu declaro que li e discuti com o pesquisador (investigador) responsável pelo estudo, Sandrely Rocha, os detalhes descritos neste documento. Entendo que sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu li a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas á pesquisadora e todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

Data

---

Nome Do Paciente

Assinatura

Data

---

Nome da Testemunha

Assinatura

Data

---

Nome Do Investigador

Assinatura