

Marilda Casela Batista

PROCESSOS INTERATIVOS  
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



**PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS  
COM DIAGNÓSTICO DE  
TUBERCULOSE INFECÇÃO LATENTE  
E TUBERCULOSE A ANTÍGENOS DE  
*Mycobacterium Tuberculosis* no  
*Quantiferon®-TB GOLD TEST IN TUBE*  
- *Cellestis Limited, Carnegie, Austrália***



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (ICS) - UFBA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS  
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

**MARILDA CASELA BATISTA**

**PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS  
COM DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE INFECÇÃO  
LATENTE E TUBERCULOSE A ANTÍGENOS DE  
*Mycobacterium Tuberculosis* no *Quantiferon®-TB*  
GOLD TEST IN TUBE - *Cellestis Limited*, Carnegie,  
Austrália**

**Salvador  
2011**

**MARILDA CASELA BATISTA**

**PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS COM  
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE INFECÇÃO LATENTE E  
TUBERCULOSE A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium Tuberculosis* no  
*Quantiferon®-TB* GOLD TEST IN TUBE - CELLESTIS LIMITED,  
CARNEGIE, AUSTRÁLIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção de grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Songeli Menezes Freire.

**Salvador**

**2011**

B 328      Batista, Marilda Casela.  
latente      Perfil de citocinas de indivíduos com diagnóstico de infecção  
e tuberculose a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* NO  
QuantiFERON-TB GOLG TEST IN TUBE – Cellestis Limited,  
Carnegie, Australi/Marilda Casela Batista – Salvador, 2011.  
89f fl..  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Songeli Menezes Freire  
Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e  
Sistemas) - Universidade Federal da Bahia.

1. *Mycobacterium tuberculosis*, citocinas. 2. Citocinas.  
3. QuantiFERON<sup>®</sup> TB Gold In Tube. 4. IFN- $\gamma$ . 5. TGB- $\beta$ . 6. Teste  
Cutâneo da Tuberculina. 7. PPD I. Marilda Casela Batista II. Título.

CDD.: 616.99522

# TERMO DE APROVAÇÃO

MARILDA CASELA BATISTA

**PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE  
TUBERCULOSE INFECÇÃO LATENTE E TUBERCULOSE A ANTÍGENOS DE  
*Mycobacterium tuberculosis* NO *QuantiFERON®-TB* GOLD TEST IN  
TUBE - Cellestis Limited, CARNEGIE, AUSTRÁLIA**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre em  
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia.

Banca Examinadora

Dr<sup>a</sup> Eliana Dias Matos \_\_\_\_\_  
Doutorado em Medicina – Universidade Federal da Bahia - Brasil(2006)

Dr<sup>a</sup> Selma Maria Bezerra Jerônimo \_\_\_\_\_  
Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) – Universidade Federal  
de São Paulo (Brasil, 1994)

Prof<sup>a</sup> Dra. Songeli Menezes Freire \_\_\_\_\_  
Doutora em Imunologia - Universidade Buenos Aires – Argentina (1996)  
Orientadora

Salvador, 28 de novembro de 2011

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família por todo incentivo;

A minha orientadora pelo apoio, incentivo, orientação científica e por acreditar no meu trabalho;

Aos meus amigos Rosa, Terezita e Alex por estarem sempre presentes;

A Ana Tereza, Valdirene, Juliana pela amizade e incentivo;

Aos estudantes de iniciação científica que contribuíram para a realização deste trabalho,

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia ICS;

Aos funcionários do IBIT e HEOM pelo auxílio no recrutamento de pacientes em especial a Hilma e Silvânia,

A todos os meus amigos por sempre estarem presentes e pelo carinho;

A todos que gentilmente doaram suas amostras sanguíneas para a realização deste trabalho;

Ao INCT DT e Laboratório Imunologia (ICS) pelo suporte financeiro e técnico fornecido ao projeto;

Àqueles (as) cujos nomes involuntariamente não foram citados.

Deves aprender a ser verdadeiro em tudo: no pensamento, na palavra e na ação.

Krishnamur

BATISTA, Marilda Casela. Perfil de citocinas de indivíduos com diagnóstico de Tuberculose infecção latente e a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* no QuantiFERON®-TB Gold In Tube- Cellestis Limited, Carnegie, Austrália. Salvador, 2011. 89f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

## RESUMO

A tuberculose continua sendo um grave problema social e de saúde pública. O diagnóstico da tuberculose, em seus estágios iniciais, e da tuberculose, infecção latente, pode contribuir para o controle da doença. Novos métodos, conhecidos como IGRA, detectam a infecção tuberculosa latente, medindo interferongama em resposta à liberação de antígenos presentes no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mas ausente na vacina BCG e em micobactérias saprófitas. Estudos vêm demonstrando uma possível superioridade na especificidade desses testes em relação ao teste tuberculínico (PPD). O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de citocinas de indivíduos com diagnóstico de Tuberculose infecção latente e os antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* no QuantiFERON®-TB Gold Test In Tube- Cellestis Limited, Carnegie, Austrália (QFT-IT). Os níveis plasmáticos das citocinas interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), foram avaliados com o método ELISA do kit *QuantiFERON®-TB Gold Test In Tube*, enquanto que os de fator de necrose tumoral (TNF), fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e interleucina-12/23 (IL-12/23) foram quantificados pelo método de ELISA (Duo-Set-R&D Systems-USA) nos grupos estudados. Cerca de 30% dos indivíduos do grupo controle foram responsivos, produzindo IFN- $\gamma$ , quando estimulados com os antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). No grupo latente, 29% dos indivíduos ficaram abaixo do *cut-off* do kit QFT-IT. Indivíduos do grupo tuberculose em tratamento responderam menos aos antígenos de Mtb, quando comparados com grupo sem tratamento. A produção de TGF- $\beta$  foi elevada em todos os grupos. Em indivíduos com tuberculose sem tratamento, a produção mostrou-se elevada em relação ao grupo de indivíduos com tuberculose em tratamento. Os níveis de TNF dos indivíduos com tuberculose sem tratamento foram menores em comparação aos grupos controle e latente, ratificando dados anteriores sobre a importância desta citocina na formação e manutenção do granuloma. Observou-se também que a resposta a fitohemaglutinina (PHA) não difere significativamente entre os grupos, porém o grupo latente apresentou resposta mais baixa. A citocina IL-12/23 não foi detectada nos grupos estudados. O índice de estímulo entre o TST e o QFT-IT mostrou uma concordância moderada (0,6) pelo índice kappa. Os resultados obtidos sugerem que, em nossa população vacinada e endêmica, esses antígenos não são bons preditores de doença, portanto mais estudos são necessários para avaliar a resposta celular utilizando o QFT-IT em nossa população.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*. Citocinas. QuantiFERON® TB Gold In Tube. IFN- $\gamma$ . TGF- $\beta$ . TNF. Teste Cutâneo da Tuberculina. PPD.



BATISTA, Marilda Casela. Profile cytokines of individuals diagnosed with Tuberculosis and Tuberculosis infections latent antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in QuantiFERON® TB Gold In Tube. Cellestis Limited, Carnegie, Australia. Salvador, 2011. 89f. Theses (Master's Degree) – Institute of Health Sciences, Federal University of the Bahia, Salvador, 2011.

## ABSTRACT

Tuberculosis remains a serious social and public health problem. The diagnosis of tuberculosis in its early stages and latent tuberculosis infection may contribute to infection control. New methods, known as IGRAs, detect latent tuberculosis infection by measuring interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) release in response to antigens present in *Mycobacterium tuberculosis complex* but missing in BCG vaccine and most of saprophytic mycobacterias. Studies have shown a possible superiority in specificity of IGRAs in relation to the tuberculin skin test (TST). **Objective:** To evaluate the cytokine profile from persons diagnosed with tuberculosis and latent infection to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in the QuantiFERON®-TB Gold in tube test-Cellestis Limited, Carnegie, Australia (QFT-IT). **Methods:** Plasma levels of cytokines interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) were evaluated by ELISA kit QuantiFERON®-TB Gold test - IT, while those of tumor necrosis factor (TNF), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and interleucina-12/23 (IL-12/23) were quantified by ELISA (Duo-Set, R & D Systems, USA) in all groups. **Results:** about 31% of individuals from the control group were responsive, producing IFN- $\gamma$  when stimulated with specific antigens of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). In the latent group, 29% of individuals were below the cut-off of the kit. Individuals in TB treatment's group responded less to Mtb antigens compared with the untreated group. The production of TGF- $\beta$  was high in all groups. In the group of untreated TB the production was in the range while in the group of TB in treatment. The levels of TNF from untreated TB individuals were lower compared to the control and latent groups, confirming previous data about the importance of this cytokine in the formation and maintenance of granuloma. It was also observed that the response to phytohemagglutinin (PHA) did not differ significantly between groups, but the latent group showed lower response. IL-12/23 cytokine was not detected in both groups. The index stimulation between the TST and QFT-IT showed a moderate agreement (0.6) by kappa index. **Conclusion:** The results suggest that in our vaccinated population these antigens are not good predictors of disease, so more studies are needed to evaluate the cellular response by using the QFT-IT in our vaccination and endemic population.

**Keywords:** Mycobacterium tuberculosis. QuantiFERON® TB Gold in Tube cytokines. IFN- $\gamma$ . TGB- $\beta$ . TNF. Specificity of the Skin Test with the Purified Protein Derivative (PPD).OK

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Mapa de distribuição da tuberculose no mundo.....   | 21 |
| Figura 2 – Taxa de incidência da tuberculose por Unidades da Federação, Brasil...21  |    |
| Figura 3 – Taxa de incidência da tuberculose por capitais, Brasil.....   | 22 |
| Figura 4 – Diferentes processos envolvidos na patogênese da tuberculose humana. ....   | 25 |
| Figura 5 – Mecanismos envolvidos na resposta imune inata e imune celular.....  | 29 |
| Figura 6 – Curso da infecção da doença e ativação da resposta imune na tuberculose. Produção de IFN- $\gamma$ , interleucinas, linfotoxinas, NO/ROI, reativo intermediário de oxigênio/nitrogênio, TNF e Toll like receptor..... | 31 |
| Figura 7 – Coloração de Ziehl-Neelsen, a seta mostra o BAAR corado.....  | 33 |
| Figura 8 – Cultura do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio Ogawa Kudoh .....  | 34 |
| Figura 9 – a) Técnica de aplicação do PPD no antebraço esquerdo; b) Reação positiva com formação da pápula após 72-96 horas e c) Leitura do diâmetro do endurecimento transversal em milímetros.....                             | 39 |
| Figura 10 – Presença ou ausência de genes da região de diferença 1 (RD1) em micobactérias. ....  | 40 |
| Figura 11 – Interpretação dos resultados do QTF-IT .....   | 49 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Dados sociodemográficos da população estudada nos grupos analisados ..... | 53 |
| Tabela 2 – Correlação do QUANTIFERON® -TB GOLD TEST IT e TST .....                   | 58 |

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Distribuição dos valores e medianas da produção de IFN- $\gamma$  em cultura de células de sangue heparinizado no tubo NIL sem estímulo (puro) do QFT- IT do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ). .....54
- Gráfico 2 – Distribuição dos valores e medianas da produção de IFN- $\gamma$  em cultura de células de sangue heparinizado, estimuladas *in vitro* com PHA do QFT- IT de indivíduos do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ). .....55
- Gráfico 3 – Distribuição dos valores e medianas da produção de IFN- $\gamma$  em cultura de células de sangue heparinizado estimulados *in vitro* com antígenos do *M. tuberculosis* do QFT-IT do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ). .....56
- Gráfico 4 – Índice de estímulo com antígenos Mtb na produção de IFN- $\gamma$  na população estudada indivíduos controle (n=32), TB em tratamento (n=14) e TB sem tratamento (n=17). .....57
- Gráfico 5 – Distribuição dos valores e medianas da produção de TNF dosadas por ELISA (Duo-Set-R&D Systems-USA) no plasma do QTF-IT, não estimulado (puro), do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ). .....59
- Gráfico 6 – Distribuição dos valores e medianas da produção de TNF dosadas por ELISA no plasma do QFT-IT estimulados *in vitro* com PHA, do grupo controle (n=32), TB latente (n=34), TB em tratamento (14) e TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ). .....60

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 7 – Distribuição dos valores e medianas da produção de TNF dosadas por ELISA no plasma do QFT-TI estimulados <i>in vitro</i> com antígenos do Mtb do grupo controle (n=32), grupo latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n= 17) (Kruskal-Wallis p<0,05).<br>.....   | 61 |
| Gráfico 7 – Distribuição dos valores e medianas da produção de TGF-β dosadas por ELISA no plasma não estimuladas (puro). do QFT-IT do grupo controle n=32) TB latente (n=34),TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17) (Kruskal-Wallis p<0,05).....                                      | 62 |
| Gráfico 9 – Distribuição dos valores e medianas da produção de TGF-β dosadas por ELISA no plasma estimulados <i>in vitro</i> com PHA do QFT-IT do grupo controle (n = 32) TB latente ( n = 34),TB em tratamento (n =14), TB sem tratamento (n = 17) (Kruskal-Wallis p<0,05).....                 | 63 |
| Gráfico 10 – Distribuição dos valores e medianas da produção de TGF- β dosadas por ELISA no plasma estimulados <i>in vitro</i> com antígenos do Mtb do QTF-IT do grupo controle (n=32) grupo Tb latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), Kruskal-Wallis p<0,05). ..... | 64 |

## QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1 – Ações moduladas pelos antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....      | 24 |
| Quadro 2 – Interpretação dos possíveis resultados a serem obtidos com o<br>Kit QFT-IT..... | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, NOTAÇÕES E SIGLAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
BAAR - Bacilo Álcool-ácido Resistente  
BCG - Bacilo de Calmette Guérin  
CFP-10 - Cultura de Proteína Filtrada 10 kDa  
ESAT-6 - Antígeno Secretório 6 kDa  
ELISA - Ensaio de Absorção Imunoensaio  
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana  
IFN-  $\gamma$  - Interferon -Gama  
IGRA - Ensaio de Liberação de Interferon -Gama  
IL - Interleucina  
KDa -Kilodalton  
M. - Mycobacterium  
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade  
Mtb - Mycobacterium Tuberculosis  
NK - Células Matadoras Naturais  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PNCT - Programa Nacional de Controle de Tuberculose  
PPD - Derivado Protéico Purificado  
RD - Região de Diferenciação  
TB - Tuberculose  
TGF- $\beta$  - Fator de Transformação do Crescimento Beta  
Th - Células T Helper  
TLR - Receptores do Tipo Toll  
TNF - Fator de Necrose Tumoral  
TST - Teste Cutâneo daTuberculina

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                  | <b>19</b> |
| 2.1 A TUBERCULOSE NO MUNDO E NO BRASIL.....                           | 20        |
| 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO .....   | 22        |
| 2.2.1 <i>Principais Proteínas do Mycobacterium Tuberculosis</i> ..... | 23        |
| 2.3 IMUNOPATOGENÊSE DA TUBERCULOSE .....                              | 25        |
| 2.3.1 <i>Tuberculose Primária</i> .....                               | 26        |
| 2.3.2 <i>Tuberculose Secundária</i> .....                             | 27        |
| 2.3.3 <i>Tuberculose Infecção Latente</i> .....                       | 27        |
| 2.4 RESPOSTAS IMUNES AO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....               | 28        |
| 2.4.1 Vacina BCG.....   | 31        |
| 2.5 DIAGNÓSTICO .....   | 32        |
| 2.5.1. <i>Baciloscopia</i> .....                                      | 32        |
| 2.5.2 <i>Cultura Bacteriológica</i> .....                             | 33        |
| 2.5.3 <i>Exame Radiológico</i> .....                                  | 34        |
| 2.5.4 <i>Exame Anátomo-Patológico</i> .....                           | 35        |
| 2.5.5 <i>Testes Bioquímicos</i> .....                                 | 35        |
| 2.5.6 <i>Método Molecular</i> .....                                   | 35        |
| 2.5.7 <i>Testes Imunológicos</i> .....                                | 36        |
| 2.5.8 <i>Teste Cutâneo da Tuberculina</i> .....                       | 37        |
| 2.5.9 <i>Ensaio de Liberação de INF-<math>\gamma</math></i> .....     | 39        |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>   | <b>41</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....  | 42        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                       | 42        |
| <b>4 HIPÓTESES.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                     | <b>45</b> |
| 5.1 ASPECTOS ÉTICOS.....  | 46        |
| 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 46        |
| 5.3 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO .....                              | 46        |
| 5.4 COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA .....                           | 47        |



|   |           |
|---|-----------|
| 5.5 PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ EM RESPOSTA AOS ANTÍGENOS PRESENTES NO QFT-IT .....                 | 48        |
| 5.5.1 <i>Interpretação dos Resultados</i> .....   | 48        |
| 5.5.2 <i>Dosagem do Fator de Crescimento de Transformação beta (TGF-<math>\beta</math>)</i> ..... | 50        |
| 5.5.3 <i>Dosagem do Fator de Necrose Tumoral (TNF)</i> .....                                      | 50        |
| 5.5.4 <i>Dosagem de Interleucina 12/23 (IL12/23)</i> .....  | 50        |
| 5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....   | 51        |
| <b>6 RESULTADOS</b> .....   | <b>52</b> |
| 6.1 IFN- $\gamma$ PRODUZIDO EM RESPOSTA AO QuantiFERON® TB Gold IT .....                          | 54        |
| 6.1.1 <i>Produção em Resposta ao Tubo Nil</i> .....   | 54        |
| 6.1.2 <i>Produção em Resposta ao Tubo com Mitógeno PHA</i> .....                                  | 55        |
| 6.1.3 <i>Produção em Resposta ao Tubo com Antígeno do Mtb</i> .....                               | 56        |
| 6.1.4 <i>Índice de Estímulo</i> .....   | 57        |
| 6.1.5 <i>Correlação entre o Teste Cutâneo da Tuberculina e QuantiFERON® TB Gold IT</i> .....      | 57        |
| 6.2. TNF PRODUZIDO EM RESPOSTA AO QuantiFERON® TB Gold IT .....                                   | 58        |
| 6.2.1 <i>Produção em Resposta ao Tubo Nil</i> .....   | 58        |
| 6.2.2 <i>Produção em Resposta ao Tubo com Mitógeno Fitohemaglutinina (PHA)</i> .....              | 59        |
| 6.2.3 <i>Produção em Resposta ao Tubo com Antígeno do Mtb</i> .....                               | 60        |
| 6.3 TGF- $\beta$ PRODUZIDO EM RESPOSTA AO TUBO DO QuantiFERON® TB Gold IT .....                   | 62        |
| 6.3.1 <i>Produção em Resposta ao Tubo Nil</i> .....   | 62        |
| 6.3.2 <i>Produção em Resposta ao Tubo com Mitógeno PHA</i> .....                                  | 63        |
| 6.3.3 <i>Produção em Resposta ao Tubo com Antígeno Mtb</i> .....                                  | 64        |
| 6.4 PRODUÇÃO DE IL12/23 EM RESPOSTA AO TUBO QFT-IT .....  | 65        |
| <b>7 DISCUSSÃO</b> .....  | <b>67</b> |
| 8 CONCLUSÕES .....  | 72        |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>74</b> |
| ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....  | 80        |
| ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....                                       | 82        |
| ANEXO III - FICHA CLÍNICA.....  | 86        |
| ANEXO IV – ATESTADO DE CORREÇÃO DAS REGRAS DA ABNT E REVISÃO LINGUÍSTICA .....                    | 89        |

## **1 INTRODUÇÃO**

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* – pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* que inclui *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A transmissão ocorre fundamentalmente por via aérea e atinge principalmente os pulmões, podendo atingir outros órgãos e tecidos. A distribuição da doença é mundial. E, a partir de 1981, com o surgimento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), observa-se, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, um crescente aumento de casos da doença com grande impacto em saúde pública (BRASIL, 2002).

Estima-se que uma pessoa com Tuberculose ativa, bacilífera, que elimina bacilos para o meio exterior, possa infectar de 10 a 15 pessoas por ano na comunidade com a qual mantém contato. Além disso, o risco de contactantes próximos é de 5 a 20% e o de contactantes casuais de 0,2 a 2,0% (SOUZA e VASCONCELOS, 2005). A maioria dos indivíduos saudáveis, exposta ao bacilo, é capaz de combater a doença por meio do sistema imune, porém, em alguns indivíduos, permanece uma infecção latente (Tuberculose infecção latente), assintomática que pode persistir por anos ou sofrer reativação e transformar-se em tuberculose ativa. Portanto, o diagnóstico na fase inicial aliado ao tratamento podem contribuir para o controle da tuberculose infecção latente.

A vacina BCG, utilizada desde 1921, apresenta controvérsias quanto ao seu efeito protetor (PEREIRA et al., 2007). Os métodos diagnósticos utilizados apresentam problemas como: a cultura que requer um longo tempo de incubação, a baciloscopia e o PPD que apresentam baixa sensibilidade.

Novas técnicas para o diagnóstico da TB em menos tempo e com alta sensibilidade e especificidade vêm sendo avaliados, como os métodos de biologia molecular e a pesquisa de citocinas nos ensaios de imunodiagnóstico, os chamados ensaios para detecção de interferon-gama (Interferon-Gamma *Release Assay* - IGRA).

Um desses testes novos testes é o QuantiFERON-TB® Gold Test (Método *in-tube* - QFT-IT) já utilizado nos países desenvolvidos, mas ainda não padronizado no Brasil. Em 2010 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária liberou sua comercialização para pesquisa. O QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT- IT) é um teste para diagnóstico *in vitro* que utiliza um *cocktail* de peptídeos simulando as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), a fim de estimular as células no sangue total heparinizado. A detecção de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) pelo Ensaio de

Imunoabsorção Enzimática (ELISA) é usada para identificar respostas *in vitro* a estes peptídios antigênicos, os quais estão associados à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. QuantiFERON®-TB Gold IT é um teste indireto à infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e deve ser usado em conjunto com a avaliação de riscos, a radiografia e outras avaliações médicas e de diagnóstico.

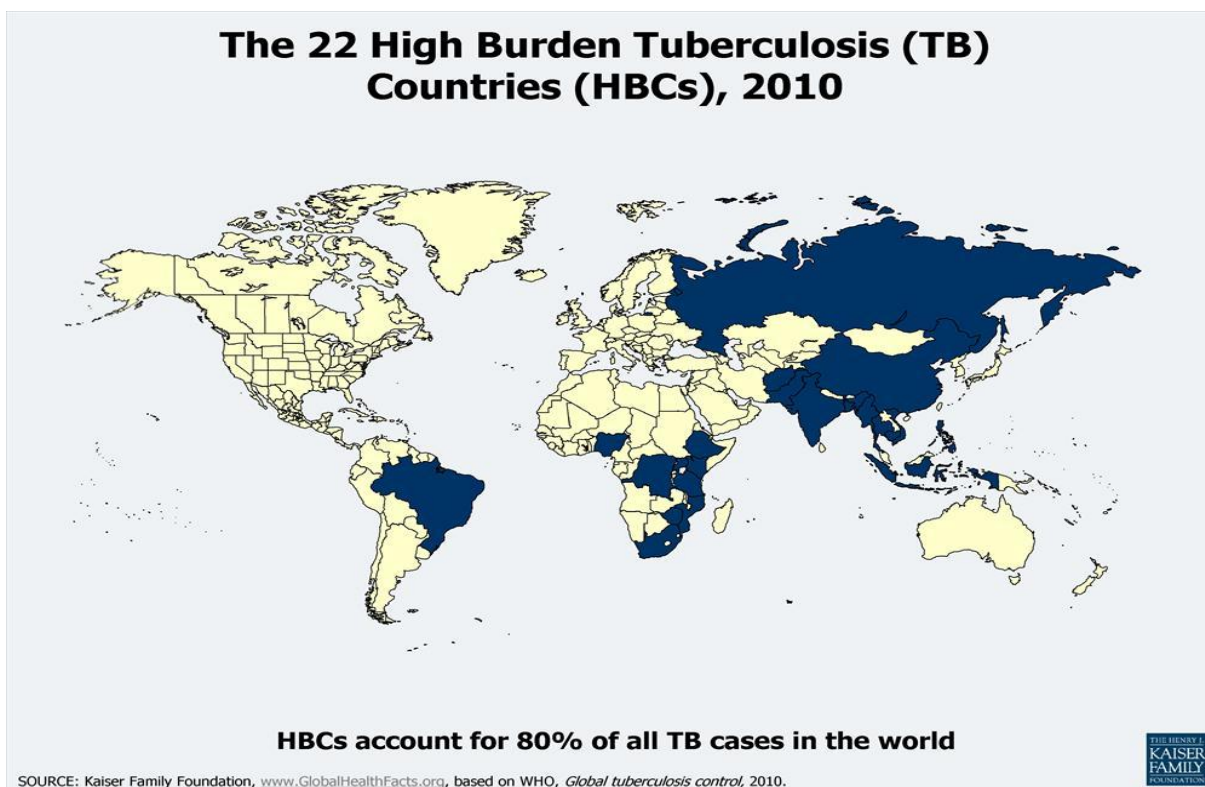
## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 A TUBERCULOSE NO MUNDO E NO BRASIL

A tuberculose continua a merecer especial atenção dos profissionais de saúde e da sociedade, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle, considerando aspectos humanitários, econômicos e de saúde pública. Diante de tais fatos, a OMS declarou a TB como emergência mundial. Visando o combate da TB foi lançada, em 2000, a Parceria Global para Combater a Tuberculose (*Global Partnership to Stop TB*), que inclui várias organizações e instituições mundiais. Entre as estratégias de controle temos: o tratamento supervisionado de curto prazo (DOTS), multirresistência a medicamentos, pesquisa sobre novas vacinas, novos métodos diagnósticos e fármacos (World Health..., 2009; PNCT, 2010; STOP-TB, 2010).

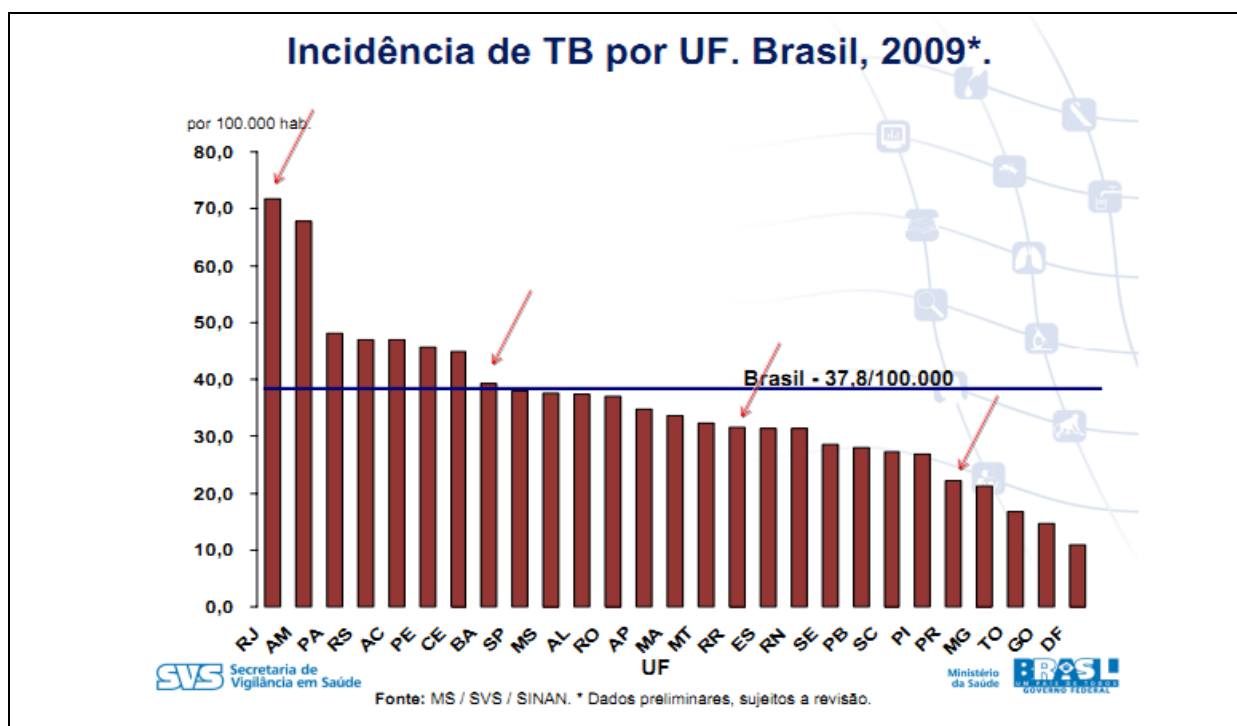
A Organização Mundial de Saúde (OMS) prioriza 22 países que representam 80% da carga mundial de TB, sendo o Brasil um deles. Em 2007, o Brasil notificou 72.194 casos novos, correspondendo a um coeficiente de incidência de 38/100.000 habitantes. Destes, 41.117 foram bacilíferos (casos com baciloscopias de escarro positiva), apresentando um coeficiente de incidência de 41/100.000 habitantes. Em consequência da TB, ocorrem 2,5 mil mortes por ano e ela representa 7<sup>a</sup> causa em custos com internação no SUS por doença infecciosa e a 1<sup>a</sup> causa de morte em pacientes com Síndrome da imunodeficiência Adquirida (AIDS). Estes indicadores colocam o Brasil na 19<sup>a</sup> posição em relação ao número de casos e na 104<sup>a</sup> posição em relação ao coeficiente de incidência (INCT 2009; BRASIL, 2009). Na Bahia, a incidência de TB é de 6.000 casos/ano e em Salvador 2.500 casos/ano (PCT-BA, 2009). A dispersão e a concentração da tuberculose no mundo por Unidades da Federação (UF) e capitais do Brasil podem ser visualizadas nas figuras 01, 02 e 03.

Figura 1 – Mapa de distribuição da tuberculose no mundo.



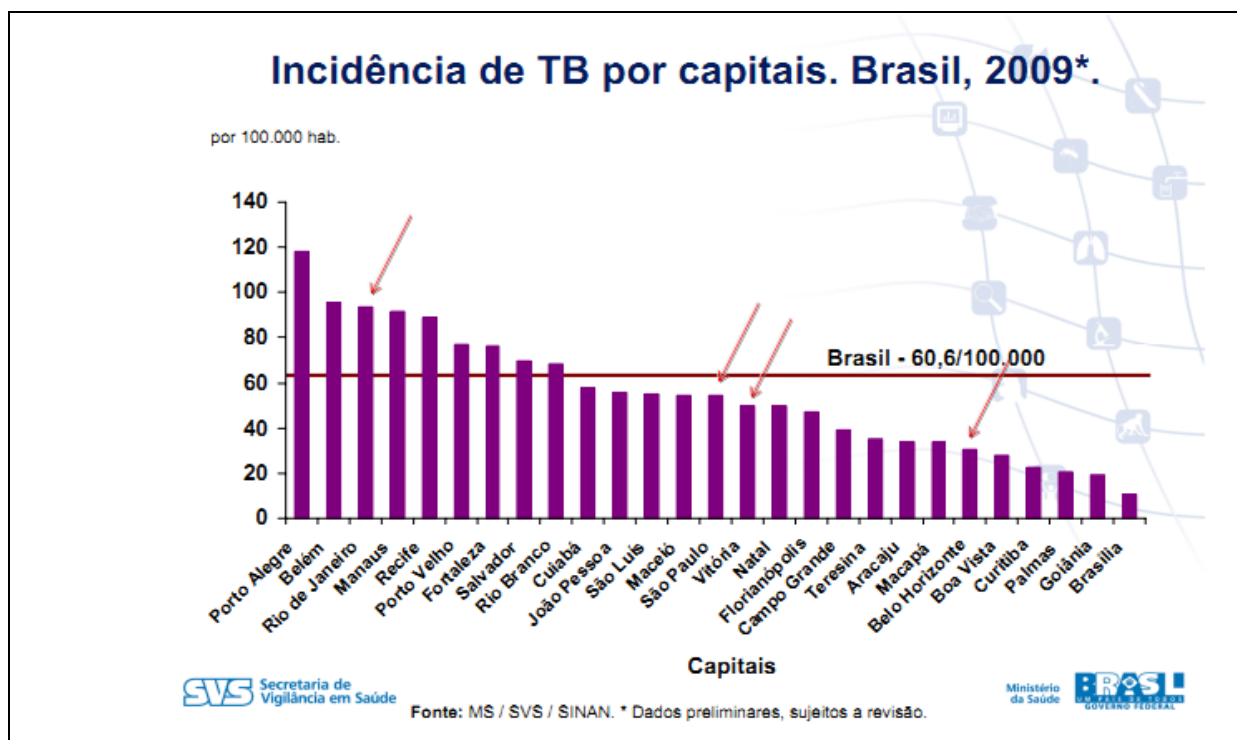
Fonte: World Health Organization, Global Tuberculosis Control, 2011.

Figura 2 – Taxa de incidência da tuberculose por Unidades da Federação, Brasil.



Fonte: Ministério da Saúde- BRASIL, 2010.

Figura 3 – Taxa de incidência da tuberculose por capitais, Brasil.



Fonte: Ministério da Saúde – BRASIL, 2010.

## 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

As micobactérias pertencem à ordem dos *Actinomyces*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. O *Mycobacterium tuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo, aeróbio obrigatório de crescimento lento (16 a 24 horas) que pode se multiplicar dentro dos macrófagos e em outras células do organismo humano. Possui uma cápsula que o protege de agentes químicos e infecta preferencialmente os pulmões. É destruído por agentes físicos como o calor, raios ultravioleta da luz solar e radiações ionizantes – e não sobrevive por muito tempo no meio externo. Caracteriza-se por ser um bacilo reto, fino, não formador de esporo, flagelo e toxina. Mede de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de comprimento por 0,2 a 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro e é dependente do pH do meio, disponibilidade de nutrientes e de oxigênio. A baixa replicação explica a tendência à cronicidade (TEIXEIRA et al., 2007). O envelope do Mtb é constituído por membrana plasmática, cápsula e parede celular. A parede celular é importante para a viabilidade da micobactéria e confere resistência à desidratação, proteção à ação de agentes químicos e a sobrevivência por anos no granuloma formado no hospedeiro.



A parede celular das micobactérias é constituída principalmente por um complexo de ácidos micólicos, arabinogalactanas e peptídeoglicano, glicopeptídeos, como a lipoarabinomanana, ancorados à membrana plasmática que constituem uma barreira periférica hidrofóbica que retém a fuccina durante a coloração de Ziehl Neelsen. Os ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeias longas) parecem ser o suporte molecular do álcool-ácido resistência (BAAR). Os glicopeptídeos induzem a formação da necrose caseosa e podem estar envolvidos na virulência das diferentes espécies de micobactérias. A micobactéria possui numerosos antígenos capazes de induzir diferentes respostas imunológicas (ARAUJO, 2008).

### 2.2.1 Principais Proteínas do *Mycobacterium Tuberculosis*

Com o sequenciamento do genoma do Mtb H37Rvem (1998) e a definição de regiões que codificam antígenos específicos, foram encontradas novas proteínas que podem contribuir para um melhor entendimento da patogenicidade, virulência e mecanismo de evasão do bacilo. Essas regiões são conhecidas como regiões de diferença (RDs), tendo sido caracterizadas 16 RDs (COLE et al, 1998). Essas proteínas são secretadas pelo Mtb e têm a capacidade de estimular a resposta do hospedeiro. Dentre essas proteínas temos: *Culture Filtrate Proteins* 10 KDa (CFP-10) e *Early Secreted Antigenic Target* 6 KDa (ESAT-6. Esses antígenos são codificados na região RD-1 do gene de espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e não são encontrados na cepa vacinal do *Mycobacterium bovis* (BCG) ou em outras espécies de micobactérias do meio ambiente exceto *Mycobacterium (M) kansasii*, *M. marinum* e *M.szulgai*. (SINGH et al., 2006; WANG et al., 2009). O CFP-10 do Mtb possui uma grande capacidade de induzir resposta imune mediada por células T. Esse complexo protéico pode se ligar à superfície dos macrófagos e estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (TNF). Ao contrário de outras proteínas secretadas pelo Mtb, o CFP-10 tende a estabelecer uma sinergia com o INF- $\gamma$  com produção de agentes microbicidas do fagócito mononuclear, como o óxido nítrico (GUO S. et al., 2010).

O ESAT-6 estimula células T ao induzir um aumento na produção de INF- $\gamma$  principalmente na primeira fase da doença e também está ausente no gene do *Mycobacterium bovis* (BCG). Os antígenos ESAT-6 e CFP-10 também são usados

em testes imunodiagnósticos como QuantiFERON®-TB Gold TEST IT- e ELISPOT (MATULIS et al., 2007, GANGULY N. et al., 2008).

Outras proteínas não codificadas na RD-1 são reconhecidas por anticorpos de indivíduos com tuberculose, como o antígeno *HeatShock protein* (HspX Rv2031c) codificado na região gênica Acr; a proteína alfa cristalina que é uma proteína de choque térmico com peso molecular de 16 KDa; o complexo antigênico 85 (Ag 85) proteínas MPT 64 (26 KDa) e MPT 64 (26KDa), lipoproteína (19KDa) (ANDERSEN et al., 2000) e o antígeno 38 KDa, um dos antígenos mais estudados, contém epítomos de uma lipoproteína secretada que são específicos do complexo Mtb (ARAUJO et al, 2008). As ações desses antígenos e de outros descritos por diferentes autores são sumarizados no quadro 01.

**Quadro 1** – Ações moduladas pelos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*

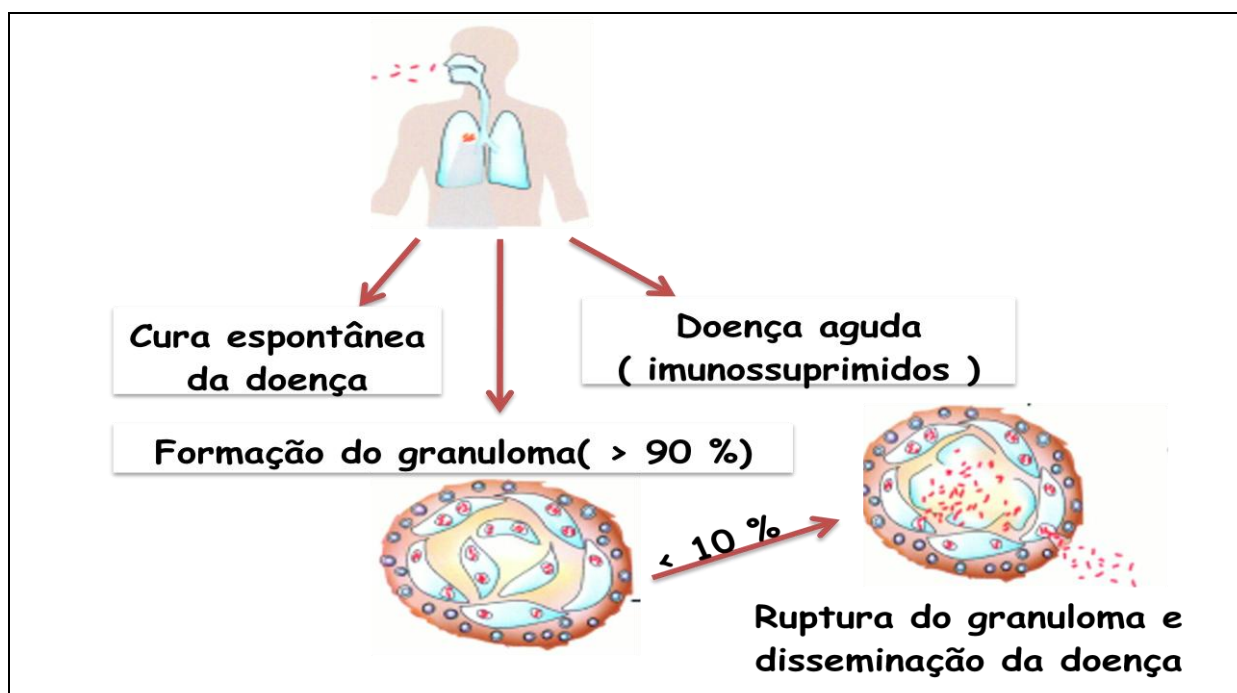
| ANTÍGENOS                 | AÇÕES  |
|---------------------------|--|
| CFP-10                    | Aumenta a secreção de INF- $\gamma$<br>Aumenta a sua síntese frente a estímulos estressantes<br>Promove redução de nutrientes e aumento de temperatura<br>Aumenta produção de óxido nítrico e a secreção de IL-10<br>Diagnóstico |
| CFP-10<br>(em recidivas)  | Inibe a produção de óxido nítrico  |
| ESAT-6                    | Aumenta a secreção de INF- $\gamma$ e TNF<br>Inibe a produção de óxido nítrico<br>Diagnóstico  |
| 38-KDa                    | Induz uma resposta humoral e resposta Th1<br>Aumenta produção de óxido nítrico<br>Elimina células T CD8+   |
| 70-KDa                    | Aumenta a sua síntese frente a estímulos estressantes promove<br>redução de nutrientes e aumento da temperatura  |
| Complexo85<br>(30/32-KDa) | Mantém as características hidrofóbicas e a integridade da parede<br>celular<br>Permite a ligação da bactéria à fibronectina<br>Utilizados em imunização  |
| MP 51 (27-KDa)            | Aumenta a secreção de INF- $\gamma$<br>Induz uma resposta humoral<br>Induz resposta Th1<br>Utilizados em imunização  |
| MP 64 (26-KDa)            | Utilizados em imunização<br>Diagnóstico  |
| 19-KDa                    | Induz uma resposta humoral<br>Inibe a expressão de MHC-II<br>Inibe a apresentação de antígenos<br>Ativa neutrófilos  |

Fonte: Adaptado de ARAUJO et al., 2008, p.425.

### 2.3 IMUNOPATOGENÊSE DA TUBERCULOSE

A tuberculose é caracterizada pela formação de granuloma nos tecidos infectados e relacionada com hipersensibilidade tardia mediada por células. Quando o indivíduo entra em contato com o *Mycobacterium tuberculosis*, podem ocorrer três processos: 1) o hospedeiro elimina o agente por meio das barreiras físicas do sistema respiratório como a mucosa ciliada existente nos brônquios; 2) o indivíduo controla a infecção formando focos infecciosos nos órgãos infectados, os quais são chamados de granulomas, que podem permanecer durante vários anos (a denominada infecção latente) e 3) desenvolvimento da doença ativa que cursa geralmente com o rompimento do granuloma (SILVA e BOÉCHAT, 2004; TEIXEIRA, 2007). A figura 04 ilustra essas três condições.

**Figura 4** – Diferentes processos envolvidos na patogênese da tuberculose humana.



Fonte: Modificado de Kaufmann - Annals of the Rheumatic Diseases, 2002.

Cerca de 70% de indivíduos doentes com a forma pulmonar são bacilíferos, ou seja, apresentam carga bacteriana e constituem a fonte de contaminação. Os principais sintomas desta doença são: tosse e escarro por mais de quatro semanas, falta de apetite e emagrecimento, dores nas costas e no peito, suores noturnos,

febre baixa geralmente à tarde, dificuldade para respirar e cansaço fácil. São vários os fatores que levam ao desenvolvimento da doença desde condições socioeconômicas, contato frequente, tempo de exposição, carga bacteriana a qual o contactante é exposto e virulência da cepa. O mecanismo pelo qual os indivíduos infectados podem não desenvolver a doença está relacionado com a resposta imune protetora e fatores genéticos. Alguns estudos epidemiológicos relatam que fatores genéticos podem estar relacionados com a intensidade da doença em determinados grupos raciais e familiares (ARAUJO et al., 2007; MOUTINHO, 2011). Alterações genéticas das subunidades p40 de interleucina-12 e de uma subunidade em seu receptor podem provocar deficiência de INF- $\gamma$  (OZBEK N. et al, 2005). Nestas condições, o granuloma não é capaz de conter a infecção e não há produção de citocinas efetoras para conter a infecção. A produção das citocinas contribui para recrutar linfócitos T para o sítio da infecção, com formação do granuloma, na tentativa de conter a replicação do bacilo (NICOD, 2007). O granuloma apresenta baixo pH, baixa quantidade de oxigênio e limitação de nutrientes, o que contribui para a diminuição do crescimento bacteriano e a estabilização do estado de latência (NANCY, 2009). Antígenos da micobactéria como lipoarabinomanana e a lipoproteína de 19 KDa induzem a expressão e secreção de certos peptídeos antimicrobianos por meio dos *Toll-like receptor* (TLRs) em células epiteliais pulmonares, as quais são capazes de eliminar a micobactéria (MOUTINHO, 2009; AHMAD, 2010). Alguns fatores como a imunodepressão e o uso de drogas imunossupressoras podem ser responsáveis pela multiplicação do bacilo e reativação endógena da TB (SMALL, 2001). As formas de TB estão descritas abaixo.

### 2.3.1 Tuberculose Primária

A tuberculose primária ocorre quando o indivíduo entra em contato com o bacilo pela primeira vez por meio da inalação de partículas infectantes. Inicialmente ocorre uma resistência inespecífica do hospedeiro, por meio das barreiras físicas que podem debelar o Mtb, e a doença pode não se manifestar. Entretanto, é possível que este sistema de defesa falhe e o Mtb atinge os alvéolos pulmonares, iniciando a tuberculose doença. As barreiras naturais, a imunidade inata e adaptativa participa do mecanismo de defesa contra esse agente. Após 3 a 4 semanas da

infecção do indivíduo, os macrófagos ativados secretam citocinas quimiotáticas, interferon-gama ( $\text{INF-}\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF), cuja finalidade é atrair células T para formar um granuloma estável que conterá os bacilos. A TB primária pode evoluir para uma cura bacteriológica, permanecer latente ou ocorrer uma disseminação bacilar por via linfática ou hematológica produzindo lesões em diversos órgãos (BRASIL, 2002; ARAUJO, 2008). A radiografia do tórax é um dos principais meios de diagnóstico de TB primária embora alterações pulmonares não sejam demonstradas em até 15% dos casos (BURRIL et al., 2007). A TB miliar é caracterizada pela reativação da TB primária por via hematogênica em diversas partes do organismo, o que leva a uma infecção grave (CAMPOS, 2006).

### *2.3.2 Tuberculose Secundária*

A doença ativa ocorre tardiamente após uma infecção primária devido à reativação do bacilo por origem endógena ou por origem exógena a partir de uma nova exposição à micobactéria, geralmente cepa mais virulenta. Caracteriza-se por uma inflamação granulomatosa, com presença de células multinucleadas gigantes contendo os bacilos, denominadas células epitelioides, fibroblastos, células T e B, e de uma reação inflamatória de hipersensibilidade tardia com formação de fibrose e cavitação (KAUFMANN, 2005). Observa-se, com frequência, presença de necrose caseosa central encontrada no interior da parede inflamatória granulomatosa e uma massa eosinofílica com resto nuclear fragmentada observada no exame microscópico. Os granulomas parecem ter importante papel para conter a disseminação sistêmica (CAMPOS, 2006).

### *2.3.3 Tuberculose Infecção Latente*

A Tuberculose infecção latente (infecção latente) compreende o período entre a entrada do bacilo no organismo e o aparecimento da TB doença, sendo evidenciada pela prova de tuberculina positiva, mas com ausência de sinais e sintomas clínicos e radiológicos de atividade da doença, que pode permanecer neste estado latente durante um longo período ou durante toda a vida do indivíduo. Nos últimos anos, tem sido estudada a liberação de  $\text{INF-}\gamma$  pelos linfócitos do hospedeiro

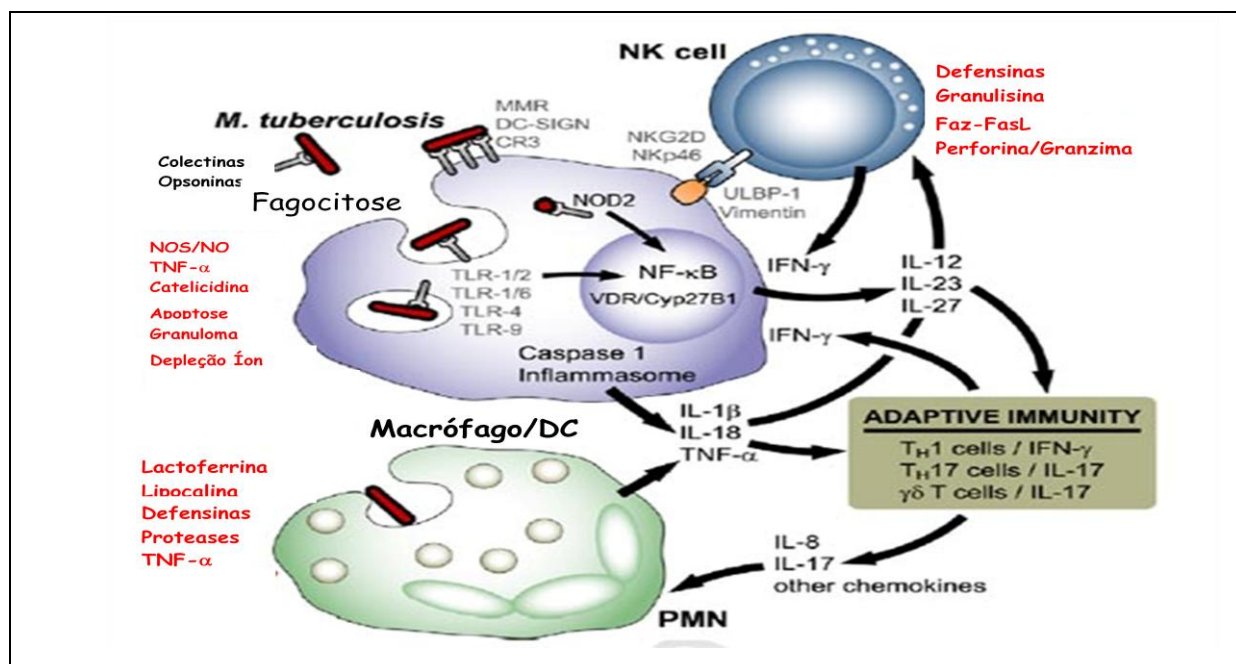
quando ele entra em contato com os fragmentos do bacilo não presentes na vacina BCG. O sistema imunológico impede a multiplicação do bacilo formando o granuloma, porém, os bacilos permanecem viáveis. Portanto, o organismo controla, mas não elimina a doença. A reativação da doença pode ocorrer em resposta a distúrbios imunológicos, infecção pelo HIV, diabetes *mellitus*, uso de medicações que interferem na imunidade como os corticoides, abuso de drogas, álcool, idade (pessoas idosas e crianças) e outros (BRASIL, 2007).

#### 2.4 RESPOSTAS IMUNES AO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

A TB é basicamente uma doença pulmonar. Momentos após uma infecção primária, por meio de partículas aéreas infectantes, os macrófagos residentes no tecido constituem uma das primeiras barreiras de defesa contra a micobactéria. Os macrófagos alveolares e células dendríticas, que fagocitaram o Mtb, migram através do sistema linfático em direção ao linfonodo regional e formam o complexo de Ghon. Esse granuloma é considerado o mecanismo que limita a disseminação do Mtb (AKIRA, 2010). A imunidade celular é o principal mecanismo de defesa contra o Mtb, sendo realizada por intermédio do reconhecimento de antígenos por receptores em células da imunidade inata e adquirida, secretando citocinas imunorreguladoras pelos linfócitos TCD4+. Após ser fagocitado, o bacilo permanece no interior do fagossomo. A partir da fusão do fagossomo e do lisossomo, os antígenos podem ser processados e apresentados aos linfócitos T auxiliares (CD4+), denominados T helper (Th). Essa apresentação é feita por meio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), de classe II, presente em macrófagos, células dendríticas e linfócitos B; denominados células apresentadoras de antígenos (APC). Células CD4+ Th1 desempenham uma função efetora na resposta imune à micobactéria. Contudo, células T-citotóxicas (CD8+), que reconhecem antígenos vindos do citoplasma, em sinergia com o fator de necrose tumoral (TNF), ativam macrófagos infectados, iniciando um mecanismo efetor da imunidade mediada por células. A resposta imune inata é deflagrada pelos neutrófilos que são as primeiras células inflamatórias a localizar-se no sítio de multiplicação do bacilo, seguidas das células *natural killer* (NK) e macrófagos. A ativação de receptores de reconhecimento padrão, como os receptores do tipo TLRs, conduz a uma importante ligação entre a resposta imune inata e a adquirida. As células NK podem destruir os

patógenos diretamente ou os monócitos infectados, e ativar células fagocíticas no sítio da infecção (MOUTINHO, 2011). A figura 05 demonstra os mecanismos envolvidos na resposta imune inata e a ativação da resposta imune celular.

**Figura 5** – Mecanismos envolvidos na resposta imune inata e imune celular.



Fonte: Adaptado de [http://www.sepeap.org/archivos/revisiones/alergia/tlr\\_tuberculosis.htm](http://www.sepeap.org/archivos/revisiones/alergia/tlr_tuberculosis.htm).

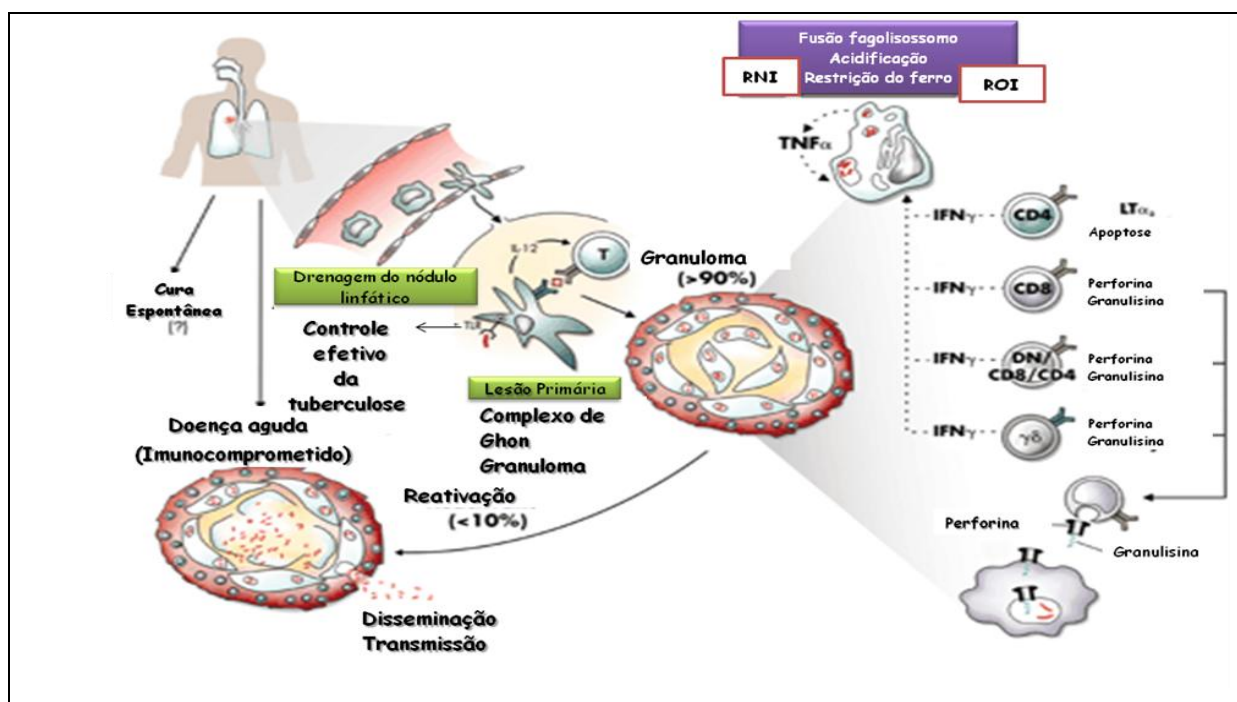
Células CD4+ Th1 desempenham uma função efetora na resposta imune à micobactéria. Contudo, células T-citotóxicas (CD8+), que reconhecem antígenos vindos do citoplasma, em sinergia com o fator de necrose tumoral (TNF), ativam macrófagos infectados, iniciando um mecanismo efetor da imunidade mediada por células. A resposta imune na TB é, muitas vezes, modulada por atividade imunossupressora, especialmente na doença grave, evidenciada pela diminuição da produção de interleucina IL-2 e IFN-γ, e da anergia às proteínas do teste tuberculínico (AKIRA. et al., 2008). Esse fenômeno correlaciona-se bem com o aumento na produção de IL-10, TGF-β e de outras citocinas com efeitos supressores sobre a imunidade celular, sobretudo nas lesões granulomatosas pulmonares. O fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) é um fator de desenvolvimento e atividade de células T regulatórias (T reg) que também participam da resposta imune ao Mtb (HERNANDEZ J. et al., 2009). Em todos os estágios da resposta imune, as citocinas produzidas participam dos processos regulatórios, assim como das funções efectoras (LAWRENCE et al., 2006). O reconhecimento da micobactéria e

posterior secreção da IL-12 por macrófagos são processos iniciados antes da apresentação de antígenos do Mtb aos linfócitos T. A IL-12 induz a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em células *natural killer* (NK), na fase inicial da resposta imune, e também induz a ativação, diferenciação, produção de IFN- $\gamma$  e expansão de células Th1 antígeno-específicas que são a principal fonte de IL-12 e IFN- $\gamma$  durante a resposta imune adquirida. O IFN- $\gamma$ , em sinergia com o fator de necrose tumoral (TNF), ativa macrófagos infectados, o que inicia um importante mecanismo efetor da imunidade mediada por células pulmonares. Células T CD8+ são capazes de reconhecer fragmentos peptídicos ligados ao MHC classe I. No caso da micobactéria, foi demonstrado que vesículas apoptóticas, oriundas de células infectadas e contendo antígenos da micobactéria associados ao MHC classe I são capazes de estimular, especificamente, células TCD8+. Os antígenos de patógenos intracelulares por uma via alternativa podem ter acesso direto à apresentação via MHC classe I, devido à capacidade dos fagossomos de se fundirem com o retículo endoplasmático e do recrutamento de proteínas do retículo endoplasmático para o fagossomo. Nesse contexto, os antígenos fagocitados podem ter acesso ao citoplasma, sofrer degradações por proteases, denominadas proteossomas, retornar ao fagossomo através de transportadores associados ao processamento de antígenos e se ligar a moléculas do MHC classe I situadas no fagossomo, levando à posterior expressão na superfície celular e ao reconhecimento pelas células CD8+.

Os linfócitos (CD4- e CD8-), com seus receptores contendo as cadeias polipeptídicas gama e delta, reconhecem componentes fosfóricos do Mtb independente do MHC classe I ou II enquanto que, os receptores de linfócitos T, restritos apenas ao CD1, podem ser estimulados por glicolipídios derivados da parede da micobactéria (MOHAN, et al.,2001; MOUTINHO, 2011). A figura 06 demonstra os mecanismos envolvidos na resposta imune celular.



**Figura 6** – Curso da infecção da doença e ativação da resposta imune na tuberculose. Produção de IFN- $\gamma$ , interleucinas, linfoquinas, NO/ROI, reativo intermediário de oxigênio/nitrogênio, TNF e Toll like receptor.



Fonte: Modificada de Kaufmann - Annual Rheum Disease 2004;63.

#### 2.4.1 Vacina BCG

As principais medidas para conter o avanço da TB no mundo englobam o diagnóstico precoce dos pacientes e da infecção latente dos contatos, tratamento efetivo contra as formas resistentes e uma vacina mais protetora do que a atual BCG (bacilo de Calmette-Guérin), produzida inicialmente com *Mycobacterium bovis* atenuado. Atualmente, as vacinas BCG utilizadas no mundo correspondem a outras cepas cultivadas ao longo dos anos em diferentes laboratórios. São cepas genotipicamente similares ao *Mycobacterium bovis*, porém diferem entre si por características genotípicas e fenotípicas, com distintas expressões em relação à viabilidade, imunogenicidade, reatogenicidade e virulência (ANDRADE *et al.*,2005).

A variação da proteção da vacina BCG tem sido atribuída a diversos fatores: Diferença na virulência do Mtb, alto risco de reinfecção, mutações na cepa vacinal que podem alterar o poder imunizante, dose e métodos de administração da vacina, reações adversas pós-vacinais entre indivíduos, exposição à micobactérias ambientais, características genéticas da população e diferenças nutricionais. Em

áreas de alta incidência, a vacinação é recomendada como efeito protetor contra formas graves principalmente em crianças. No Brasil, apesar do efeito protetor satisfatório da primeira dose aplicada no período neonatal, o efeito foi de 39% (CV: 9-58%) em adolescentes entre 15 e 20 anos, apontando a permanência do efeito da primeira dose durante duas décadas (BARRETO, PERREIRA, FERREIRA, 2006; VILAPLANA et al., 2008; PEREIRA et al., 2007; BRICKS, 2004; WORLD..., 2009).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose no Brasil está fundamentado principalmente no diagnóstico clínico, realização de exames bacteriológicos (baciloscopia e cultura), radiografia do tórax, testes imunológicos (teste sensibilidade da tuberculina e IGRAs), anatomopatológico, bioquímico e biologia molecular.

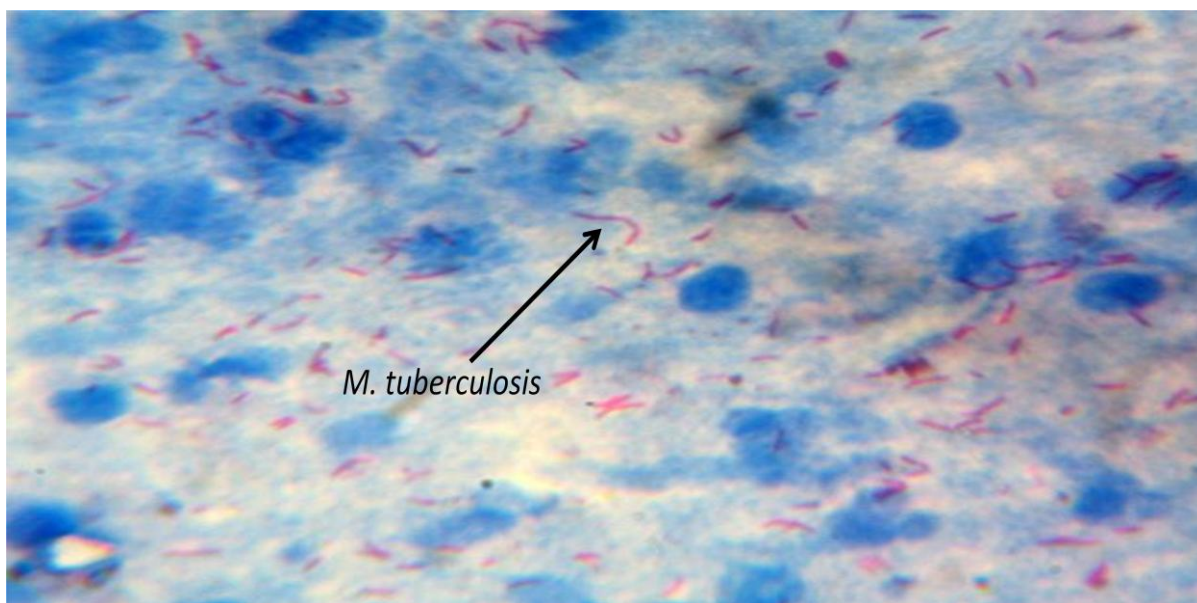
### 2.5.1. *Baciloscopia*

A coloração para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) ou método de Ziehl-Neelsen é utilizado basicamente para micobactérias que possuem uma parede celular constituída de ácidos micólicos resistente à descoloração por álcool-ácido. Essa coloração é o método mais rápido para detecção de micobactérias em amostras clínicas. Embora seja um exame rápido, com baixo custo, com alta especificidade e elevado valor preditivo positivo no nosso meio, apresenta baixa sensibilidade (30% a 70%). Esse método depende de o paciente ser bacilífero, da quantidade de bacilos eliminados, da coleta e processamento da amostra, o que poderá originar resultados falso-negativos. Recomenda-se a coleta de duas amostras de escarro espontâneo em potes plásticos descartáveis, uma no momento da consulta médica e outra pela manhã ao acordar ou em caso de evidências clínicas podem ser solicitadas amostras adicionais. Indivíduos sem expectoração espontânea e raio x de tórax suspeito de TB devem ser submetidos a indução de escarro ou broncoscopia. A pesquisa de BAAR no escarro tem elevado valor preditivo positivo em nosso meio (> 95%) mas não diferencia as espécies. A importância desse método, principalmente em adulto está relacionada ao controle da eficácia do tratamento, diagnóstico presuntivo) e a vigilância epidemiológica da

tuberculose, devido à dificuldade de se obter secreções na criança o lavado gástrico é um importante procedimento para o diagnóstico bacteriológico da TB infantil, (CAMPOS, 2006; SBPT, 2009, PNCT,2010).

A figura 07 mostra uma baciloscopia positiva pelo método de Ziehl-Neelsen.

**Figura 7** – Coloração de Ziehl-Neelsen, a seta mostra o BAAR corado.



Fonte:<http://www.thehindu.com>. Acesso em 06.09.2011.

### 2.5.2 Cultura Bacteriológica

A cultura é o método considerado padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose e permite a identificação e a realização do teste de sensibilidade. Os meios sólidos mais utilizados são o Lowenstein Jensen e Ogawa Kudoh, Apesar de sua importância, é um processo demorado, somente é possível detectar o crescimento do bacilo 4 a 6 semanas após a inoculação, há riscos de contaminação e nem sempre apresenta 100% de sensibilidade. Os sistemas automatizados BACTEC 460 TB ®, BACTEC 9000® são sistemas de detecção radiométrica, que utilizam o meio líquido Middlebrook 7H12, acrescido de ácido palmítico marcado com um radioisótopo do carbono 14 ( $^{14}\text{C}$ ). Durante o crescimento bacilar, o bacilo utiliza o ácido palmítico no seu metabolismo, liberando gás carbônico ( $^{14}\text{CO}_2$ ), cuja concentração é convertida em unidades de crescimento pelo equipamento, indicando que houve crescimento bacteriano. Esses sistemas têm a vantagem de

acelerar o crescimento bacteriano, o que torna possível a liberação do resultado em um menor tempo (10 a 15 dias), mas têm, como limitação, resultados falso-positivos devido à contaminação por outras bactérias. Há também o fato de a cultura nem sempre apresentar 100% de positividade (ARAUJO et al., 2008). A figura 08 mostra uma cultura positiva pós-cultivo no meio Ogawa Kudoh.

**Figura 8** – Cultura do *Mycobacterium tuberculosis* em meio Ogawa Kudoh



Fonte: Arquivo próprio

### 2.5.3 Exame Radiológico

A radiografia do tórax é usada como auxílio diagnóstico e tem sua importância no diagnóstico da TB primária, embora alterações pulmonares não sejam demonstradas em até 15% dos casos, na diferenciação de formas de tuberculose e na diferenciação de TB atípica de outras pneumopatias no paciente portador de HIV/AIDS ou de outras situações de imunossupressão (BURRIL, 2007).

#### *2.5.4 Exame Anátomo-Patológico*

A biópsia é realizada principalmente nas formas extrapulmonares. O exame histopatológico permite identificar a lesão granulomatosa, a necrose de caseificação e outras apresentações da lesão tecidual. No entanto, é necessário a identificação do Bacilo de Kock(BK) no material para confirmação do diagnóstico (CAMPOS, 2006).

#### *2.5.5 Testes Bioquímicos*

Os principais testes bioquímicos são: A dosagem da adenosina desaminase (ADA), utilizada principalmente nos casos de TB pleural. A ADA é uma enzima que participa do metabolismo das purinas e está relacionada à proliferação dos linfócitos durante a resposta celular é um método de baixo custo e de fácil execução. A atividade da ADA pode estar aumentada em indivíduos com comprometimento pleural por artrite reumatoide, em alguns tipos de linfomas e na maioria dos empiemas. Tais fatos constituem a limitação do teste (MORISSON, 2008). Outros testes bioquímicos como o teste da niacina, redução de nitratos e reação da catalase não são utilizados na rotina laboratorial e dependem do crescimento da micobactéria em cultura (SVE/MS, 2008).

#### *2.5.6 Método Molecular*

A técnica de reação da cadeia em polimerase (PCR) consiste em uma reação de síntese de regiões específicas de DNA em ciclos repetidos. Os mecanismos associados à multirresistência do Mtb geralmente envolvem mutações nos genes que codificam determinadas proteínas, que são inibidas pelas drogas tuberculostáticas ou que as metabolizam alterando a expressão gênica. A necessidade de testes rápidos para diagnóstico da TB levou ao desenvolvimento dos métodos moleculares para a detecção e identificação do Mtb diretamente de espécimes clínicos, ou a partir das colônias isoladas em cultura. Para material de escarro, esse método possibilita resultado em cerca de 2 horas e apresenta uma média sensibilidade (65%), e tal fato está relacionado à quantidade de bacilo

presente na amostra e alta especificidade (>90%). O resultado falso-positivo pode ocorrer devido à contaminação da amostra e o falso-negativo pela presença de proteínas inibidoras da reação. O *INNO-Lipa Mycobacteria*® e o *GenoType Mycobacterium*® são métodos baseados na amplificação de uma determinada região do DNA do Mtb, que permite a detecção e a identificação simultânea da micobactéria. Diversas técnicas de PCR, baseadas na amplificação, na sequência e comparação com padrões de partes do DNA, vêm sendo testadas. As sondas de DNA comerciais como as denominadas *AccuProbe* têm sido utilizadas para identificação de espécies do complexo *M. tuberculosis* e do complexo *M. avium*. Essas sondas hibridizam tanto no DNA como no RNA ribossomal da bactéria. A utilização desses métodos em laboratórios clínicos é limitada. Os métodos moleculares apresentam resultados mais rápidos, confiabilidade e reprodutibilidade. Entretanto são necessários equipamentos sofisticados que demandam um custo operacional alto e mão de obra especializada (ASSIS, 2007; FREITAS, 2009).

### 2.5.7 Testes Imunológicos

Os testes imunológicos estão relacionados à resposta-imune do indivíduo e podem fornecer informações para o diagnóstico na fase inicial da doença, confirmação clínica, avaliação da efetividade terapêutica e acompanhamento. A resposta inflamatória do organismo a TB depende principalmente da resposta imunológica celular de cada indivíduo. O diagnóstico sorológico da tuberculose, baseado na resposta humoral, recebeu grande contribuição da identificação de anticorpos monoclonais de micobactérias, o que permitiu isolar antígenos bacterianos específicos. A imunidade humoral parece ser relevante nas fases iniciais da lesão tuberculosa. Sant'Anna, (2001) e Steingart e colaboradores (2007), numa revisão sistemática, concluíram que os testes comerciais para diagnósticos de TB ativa ou Infecção latente não são recomendados em países de alta carga de TB devido a baixa especificidade. A imunidade envolvendo células T sensibilizadas é a base para o teste cutâneo da tuberculina (TST), um teste *in vivo* de triagem para infecção latente.

Novos testes imunológicos *in vitro* baseados na resposta celular relacionados à produção de interferon-gama (INF- $\gamma$ ) em resposta a antígenos específicos do Mtb

vêm sendo desenvolvidos, os chamados *interferon-gamma Release Assays* (IGRA), como alternativa para o diagnóstico de TB infecção latente, em substituição ao teste cutâneo PPD. A infecção por Mtb induz uma forte resposta imunocelular mediada por macrófagos e células T-*helper* e regulada por diversas citocinas, como IFN- $\gamma$ , Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- $\beta$ ) e interleucina (IL) (TEIXEIRA et al., 2007).

### 2.5.8 Teste Cutâneo da Tuberculina

O teste cutâneo da tuberculina é usado como um método auxiliar no diagnóstico da TB. Nesse teste, uma proteína derivada e purificada da bactéria da tuberculose é utilizada. A frequência e a repetição do teste dependem do risco de exposição do indivíduo, ocorrência de TB no grupo da população e grupos de alto risco como profissionais da área de saúde. Uma reação positiva pode indicar que o indivíduo teve, em algum momento, uma infecção de tuberculose, mas pode indicar também uma prévia vacinação de BCG ou uma infecção na forma latente. Quando administrado intradermicamente, uma reação de hipersensibilidade tardia se manifesta com endurecimento e eritema nos indivíduos sensíveis. É um teste de fácil execução, barato e não exige infraestrutura laboratorial. As limitações desse teste são: técnica inadequada de aplicação, possibilidade de resultados falso-positivos, retorno do indivíduo para a leitura, indivíduos vacinados com BCG, infecções por micobactérias ambientais, armazenamento inadequado do PPD, efeito *Booster*. Considera-se efeito *Booster* quando a prova tuberculínica for < 10 mm na 1ª dose e, na 2ª dose, realizada de uma a três semanas depois, apresentar endureção  $\geq$  10 mm e aumento de pelo menos 6 mm em relação à primeira dose. Compreende-se por viragem tuberculínica quando o TST inicial for > 10mm (apenas com a 1a. dose) ou sem resposta do tipo *booster* (após a 2a. dose), e no teste seguinte, após um período de 6 a 12 meses, apresentar aumento de induração  $\geq$  10 mm (CASCANTE et al., 2007; OLIVEIRA, et al., 2008).

A tuberculina usada é uma proteína purificada derivada da (PPD RT-23 que é um produto que consiste em uma solução aquosa de uma fração de proteína purificada e isolada de filtrado de cultura do tipo humana do *Mycobacterium tuberculosis*. A dose usada é de 0,1 ml, equivalente a 2 UT, e aplicada por via

intradérmica, no terço médio do antebraço esquerdo. Se o indivíduo estiver infectado com TB, as células T sensibilizadas reagem com as proteínas do PPD e ocorre uma reação de hipersensibilidade tardia em cerca de 72 a 96 horas após a administração. Essa reação ocorre como uma endureção e avermelhamento em torno da aplicação. Contudo, exames complementares são necessários.

O resultado deve ser avaliado após 3 a 4 dias da injeção (72 a 96 horas). A reação positiva se observa quando há uma infiltração nodular, plana e irregular (pápula), acompanhada de área eritematosa(avermelhada) de extensão mais ou menos delimitada. Considerar somente o endurecimento (pápula) na interpretação do teste. Deve-se medir com uma régua milimétrica no sentido transversal em relação ao maior eixo do braço e anotar o resultado em milímetros. O paciente reator forte pode ainda apresentar a chamada “reação flictenular”, crivada de pequenas bolhas e pústulas. Esta reação em geral se associa à presença de tuberculose ativa e deve ser relatada.

A reação é Interpretada da seguinte forma:

0mm a 4mm – não reator – indivíduo não infectado pelo Mtb, infectado há menos de duas semanas, hipersensibilidade reduzida, anergia (ausência de reação) ou uso de droga imunossupressora;

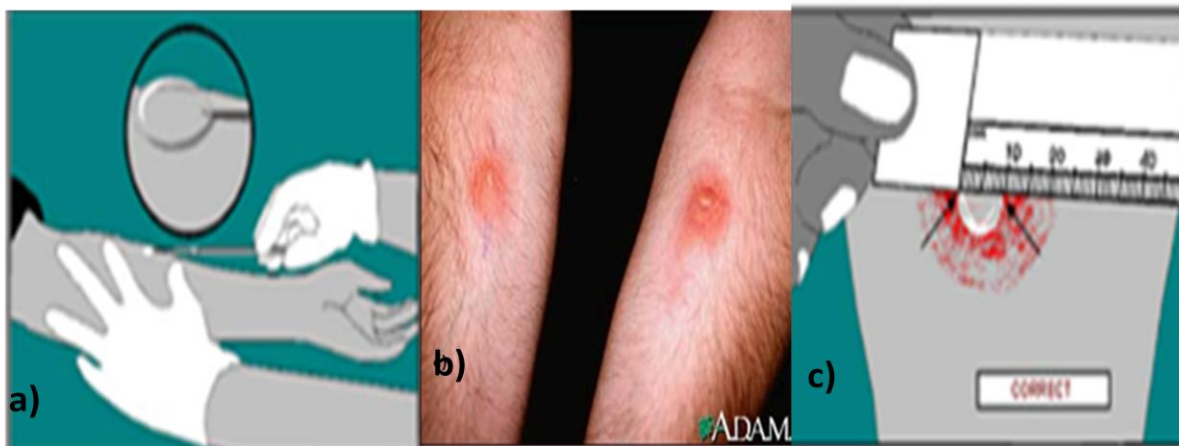
5mm a 9mm – reator fraco – indivíduo vacinado com BCG ou infectado pelo Mtb ou por outras micobactérias;

10mm ou mais – reator forte – indivíduo infectado pelo Mtb, que pode estar doente ou não, indivíduos vacinados com BCG nos últimos dois anos (MS, 2010).

A figura 09 demonstra a aplicação, reação de hipersensibilidade tardia e leitura do teste (BRASIL, 2010).



**Figura 9** – a) Técnica de aplicação do PPD no antebraço esquerdo; b) Reação positiva com formação da pápula após 72-96 horas e c) Leitura do diâmetro do endurecimento transversal em milímetros.



Fonte: Adaptado de Respiratory Medicine 100, 2098–2106 (2006)

### 2.5.9 Ensaios de Liberação de $INF-\gamma$

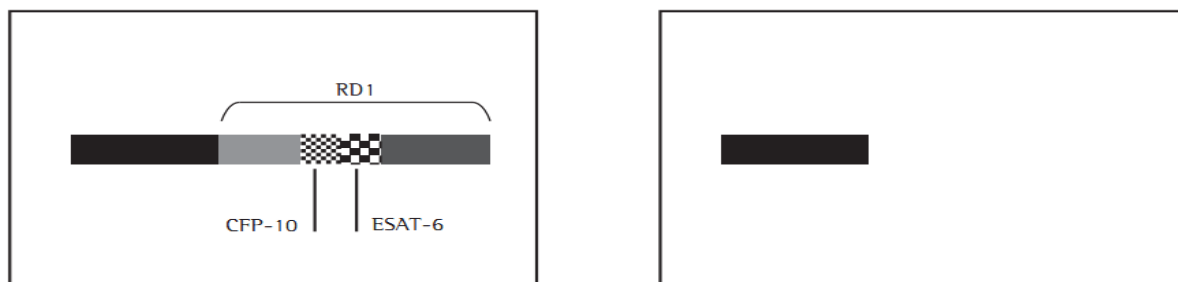
Evidências sugerem que os ensaios baseados na detecção de  $INF-\gamma$  têm um melhor desempenho que o teste tuberculínico por apresentar: alta especificidade, resultado em 12 horas, não retorno do paciente, não subjetividade, melhor correlação com a exposição ao *Mtb* e uma menor reação cruzada com a vacinação por BCG e infecções por outras micobactérias, bem como a detecção da infecção latente. Porém, esses ensaios têm um alto custo e requer equipamentos específicos. Encontram-se disponíveis comercialmente o QuantiFERON®-TB Gold In Tube (Cellestis Limited, Carnegie, Austrália-QFT-IT) e T-SPOT®.TB (Oxford Immunotec, Abdingdon, UK). Esses testes baseiam-se na detecção de  $INF-\gamma$  produzido por amostras de sangue periférico. O T-SPOT®.TB utiliza células mononucleares de sangue periférico e detecta pelo uso de ELISPOT, o número de células T produtoras de  $INF-\gamma$ . O QuantiFERON®-TB Gold In Tube é um teste para diagnóstico *in vitro* que utiliza peptídeos antigênicos que simulam proteínas micobacterianas, simulando as proteínas *early secreted antigenic target 6-kDa* (ESAT-6), *culture filtrate protein 10-kDa* (CFP-10) e Tb7.7, cuja finalidade é estimular as células no sangue total heparinizado. A detecção de  $INF-\gamma$  pelo método ELISA é usada para detectar respostas *in vitro* a estes peptídeos antigênicos, os quais estão associados à infecção por *Mtb*. Essas proteínas estão ausentes de todas as cepas vacinais BCG e

da maioria das micobactérias não tuberculosas, à exceção de *M. Kansaii*, *M. szulgai* e *M. marinum*. Indivíduos infectados com micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* normalmente têm linfócitos no sangue que reconhecem esses e outros antígenos micobacterianos. Esse processo de reconhecimento envolve a geração e secreção da citocina INF- $\gamma$ . A detecção e quantificação de INF- $\gamma$  constituem a base desse teste. Os genes que codificam esses antígenos estão localizados na região de diferença 1 (RD-1) do *Mycobacterium tuberculosis* (BARNES, 2004; MARQUES, 2007; DUARTE, 2009) conforme demonstrado na figura 10.

*M. tuberculosis*, *M. bovis*,  
*M. africanum*, *M. Kansaii*,  
*M. marinum*, *M. szulgai*.

*M. bovis* BCG,  
micobactérias ambientais.

Figura 10 – Presença ou ausência de genes da região de diferença 1 (RD1) em micobactérias.



Fonte: TEIXEIRA et al., 2007.

### **3 OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o valor do teste QuantiFERON®-TB GOLD IT quanto às citocinas produzidas *in vitro* (nas condições técnicas do teste pela população do estudo no diagnóstico de considerar maiúscula infecção latente) e quanto ao seu significado na considerar maiúscula ativa.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar a produção *in vitro* das citocinas INF- $\gamma$ , TNF, TGF- $\beta$ , IL-12/23, presentes no sobrenadante do Kit QuantiFERON®-TB Gold IT em indivíduos controle saudáveis, com diagnóstico de TB infecção latente, TB em tratamento e sem tratamento para diagnóstico da tuberculose;

3.2.2. Comparar os resultados do teste QuantiFERON®- TB GOLD IT e Teste Cutâneo da Tuberculina nos grupos com diagnóstico de TB infecção latente, TB em tratamento e sem tratamento;

3.2.3 Verificar o perfil de resposta das citocinas do estudo entre indivíduos com TB em tratamento e sem tratamento.



H0-1: Não se observa diferença no perfil de produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, TGF- $\beta$  e IL-12/23 sob estímulo de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* no QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT de indivíduos com diagnóstico de tuberculose ativa, tuberculose infecção latente e sem tuberculose.

H1: Observa-se diferença no perfil de produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, TGF- $\beta$  e IL-12/23 sob estímulo de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* no QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT de indivíduos com diagnóstico de tuberculose ativa, tuberculose infecção latente e sem tuberculose.

H02- Não se observa correlação entre o Teste Cutâneo da Tuberculina e o QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT de indivíduos com diagnóstico tuberculose ativa, tuberculose infecção latente e sem tuberculose.

H2- Observa-se correlação entre o Teste Cutâneo da Tuberculina e o QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT de indivíduos com diagnóstico tuberculose ativa, tuberculose infecção latente e sem tuberculose.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

## 5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA para avaliação dos aspectos éticos e bioéticos de acordo com as normas vigentes na Resolução CNS no. 196/96 – Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Anexo I).

O projeto foi explicado aos voluntários e os que concordaram em participar assinaram um o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com a resolução 196 de 1996 do Conselho Nacional de Saúde. Após a assinatura do TCLE, responderam a um questionário padronizado para obtenção de dados clínicos e sociodemográficos (Anexo II). Em seguida, realizou-se a coleta de sangue por punção venosa. As informações de cada participante foram registradas em suas respectivas fichas (Anexo III) e repassadas para um banco de dados, para posterior análise estatística. Este estudo foi financiado pelo Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças – INCT-DT.

## 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado Padronização de teste imundiagnóstico *in vitro* alternativo para tuberculose humana e avaliação da resposta *in vitro* a diferentes antígenos *Mycobacterium sp* E *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

As características da população de estudo foram feitas utilizando análises descritivas. As diferenças na análise estatística foram realizadas utilizando o programa *Graph Pad Prism* versão 5.0 e SPSS versão 19. Também foram realizados testes não paramétricos de kruskal-Wallis para estabelecer a significância geral entre todos os grupos. A concordância entre os testes TST e o QuantiFERON®-TB Gold IT foi feita utilizando-se o índice Kappa.

## 5.3 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os indivíduos participantes do estudo foram selecionados e diagnosticados no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM) e no Instituto Brasileiro para



Investigação da Tuberculose (IBIT), segundo os critérios preconizados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). A coleta das amostras foi realizada no período de abril de 2010 a maio de 2011.

**Crítérios de Inclusão:** Participantes de ambos os gêneros com idade entre 18 e 65 anos, com diagnóstico de TB em tratamento e sem tratamento para tuberculose, Tb infecção latente indivíduos com TST  $\geq 5$  mm e sem tratamento para tuberculose e indivíduos controle TST negativo, sem história de contato e evidências clínicas da doença.

**Grupo 1 com TB doença em tratamento (n= 14):** composto por indivíduos, com confirmação de tuberculose doença (pulmonar), que tiveram evidências clínicas e radiografia de tórax compatível com tuberculose; TST  $\geq 5$  mm, vacinados (BCG) ou não, baciloscopia positiva ou isolamento do *M. tuberculosis* em cultura e que estavam em tratamento para tuberculose.

**Grupo 2 TB doença sem tratamento (n= 17):** formado por indivíduos recém-diagnosticados com tuberculose pulmonar e que não estavam em tratamento, TST  $\geq 5$  mm, baciloscopia positiva, vacinados (BCG) ou não, radiografia de tórax compatível com tuberculose ou cultura positiva para Mtb.

**Grupo 3 TB infecção latente (n=34):** foram selecionados indivíduos com história de contato com pessoas bacilíferas, TST  $\geq 5$  mm, vacinados (BCG) ou não, sem sintomas clínicos da doença e não estavam em tratamento para tuberculose.

**Grupo 4 Controle negativo (n=32):** participaram desse grupo indivíduos com TST não reator, sem história de contato com pacientes bacilíferos, sem clínica de tuberculose, vacinados (BCG).

#### 5.4 COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Para cada indivíduo participante do estudo, foram coletados 3 mL de sangue por punção venosa, sendo 1 mL para cada um dos 3 tubos fornecidos pelo Kit QFT-IT, tubos esses que, no momento da coleta, estavam em temperatura ambiente. O sangue foi coletado na seguinte ordem: 1) Tubo *Nil*, controle nulo (tampa cinza); 2) Tubo *Antigen*, antígeno da TB, ESAT-6, CFP-10, TB-7.7 (tampa vermelha); 3) Tubo *Mitogen*, controle positivo, o agente mitógeno é a fitohemaglutinina como controle positivo (tampa violeta). Imediatamente após o enchimento dos tubos, eles foram homogeneizados durante 5 segundos para assegurar que toda a sua superfície

interna fosse revestida com sangue. Em seguida, os tubos foram identificados e incubados em até, no máximo, 3 horas após a coleta, na posição vertical, a 37°C, durante 24 horas. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 minutos em 2000g. O tampão de gel presente nos tubos separa as células do plasma. Após a separação do plasma, o material foi transferido para tubos secundários em alíquotas e congelados a - 70° C para posterior dosagem de citocinas.

## 5.5 PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ EM RESPOSTA AOS ANTÍGENOS PRESENTES NO QFT-IT

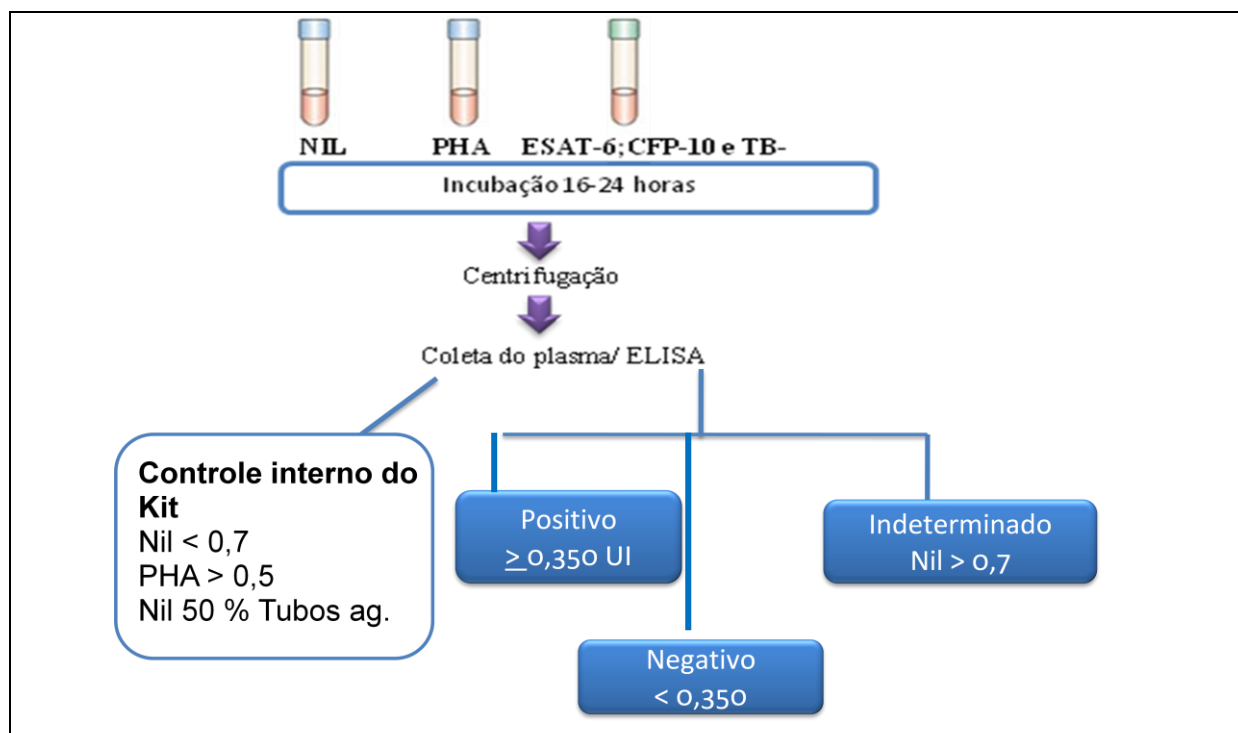
As amostras de plasma foram descongeladas e os reagentes do QFT-IT foram colocados em temperatura ambiente ( $22^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), com exceção do conjugado 100x para a realização do teste. Todos os reagentes, substratos enzimáticos e soluções do Kit QFT-IT foram reconstituídos seguindo as recomendações do fabricante. Antes da análise, os plasmas foram homogeneizados para garantir que o IFN- $\gamma$  fosse distribuído de maneira uniforme pela amostra. Para a dosagem de IFN- $\gamma$  foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  do plasma (sobrenadante) aos poços da placa de ELISA previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal anti-IFN humano e 50  $\mu\text{L}$  do conjugado. Em seguida, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 120 minutos. Após a incubação, ela foi lavada com solução de tampão de lavagem por 6 ciclos e, após o último ciclo, o tampão residual foi retirado, batendo-se a placa com os poços virados para baixo sobre um papel absorvente. Após esse processo, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução cromogênica tetrametilbenzidina em cada poço e agitou-se. A placa foi novamente incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) em cada poço. As densidades óticas (DO) foram medidas em menos de 5 minutos após a adição da solução de parada, em leitor de ELISA com filtro de 450 nm. Os valores de DO foram usados para calcular os resultados.

### 5.5.1 Interpretação dos Resultados

De acordo com o fabricante, um teste é considerado positivo quando uma resposta do IFN- $\gamma$ ao tubo de antígenos da TB estiver significativamente acima do

valor nulo UI/mL de IFN- $\gamma$ . Para a amostra de plasma estimulada pelo mitógeno, controle positivo do IFN- $\gamma$ , uma resposta reduzida ( $<0,5$  UI/mL) indica um resultado inconclusivo caso uma amostra de sangue também tenha uma resposta negativa ao antígeno da TB. Esse padrão pode verificar-se em determinadas condições como linfócitos insuficientes, atividade linfocitária reduzida devido ao manuseamento inadequado das amostras, coleta incorreta, homogeneização da amostra ou incapacidade dos linfócitos do paciente para gerar IFN- $\gamma$ . O tubo nulo, controle negativo, corrige os efeitos de reações não específicas de anticorpos heterófilos ou IFN- $\gamma$  não específico presente nas amostras de sangue. Desse modo, o valor de IFN- $\gamma$  do tubo nulo é subtraído do valor de IFN- $\gamma$  do tubo de antígeno da TB e do tubo do agente mitógeno. O teste foi considerado positivo quando  $\geq 0,350$  (após a subtração do *NIL* e TB antígeno), negativo para valores menores que 0,350. Se  $PHA > 0,5$  o teste foi validado e os valores menores que esses foram considerados indeterminados como demonstrado na figura 11.

**Figura 11** – Interpretação dos resultados do QTF-IT



De acordo com o fabricante do Kit QuantiFERON®-TB Gold IT (QFT-IT), diagnosticar ou excluir a TB doença e avaliar a TB infecção latente exige uma

combinação de fatores que devem ser avaliados como a história médica, diagnóstico e epidemiologia. Os possíveis resultados e as interpretações estão relacionados no Quadro 02.

**Quadro 2** – Interpretação dos possíveis resultados a serem obtidos com o Kit QFT-IT.

| Nulo (UI/mL) | Antígenos de TB menos nulo (UI/mL) | Agente mitógeno menos nulo | QFT-IT       | Relatório/Interpretação       |
|--------------|------------------------------------|----------------------------|--------------|-------------------------------|
| ≤ 8,0        | < 0,35                             | ≥ 0,5                      | Negativo     | Infecção por Mtb Não provável |
|              | ≥ 0,35 e < 25% do valor do nulo    | ≥ 0,5                      | Negativo     | Infecção por Mtb Não provável |
|              | ≥ 0,35 e ≥ 25% do valor do nulo    | Qualquer um                | Positivo     | Infecção por Mtb Provável     |
|              | < 0,35                             | < 0,5                      | Inconclusivo | Inconclusivo                  |
|              | ≥ 0,35 e < 25% do valor do nulo    | < 0,5                      | Inconclusivo | Inconclusivo                  |
| > 8,0        | Qualquer um                        | Qualquer um                | Inconclusivo | Inconclusivo                  |

Fonte: Cellestis Limited, Carnegie, Austrália.

### 5.5.2 Dosagem do Fator de Crescimento de Transformação beta (TGF- $\beta$ )

Foi realizada com o kit ELISA (Duo-Set-R&D Systems-USA) segundo a recomendação do fabricante. O limite de detecção do Kit foi de 31,25 a 2000 pg/mL.

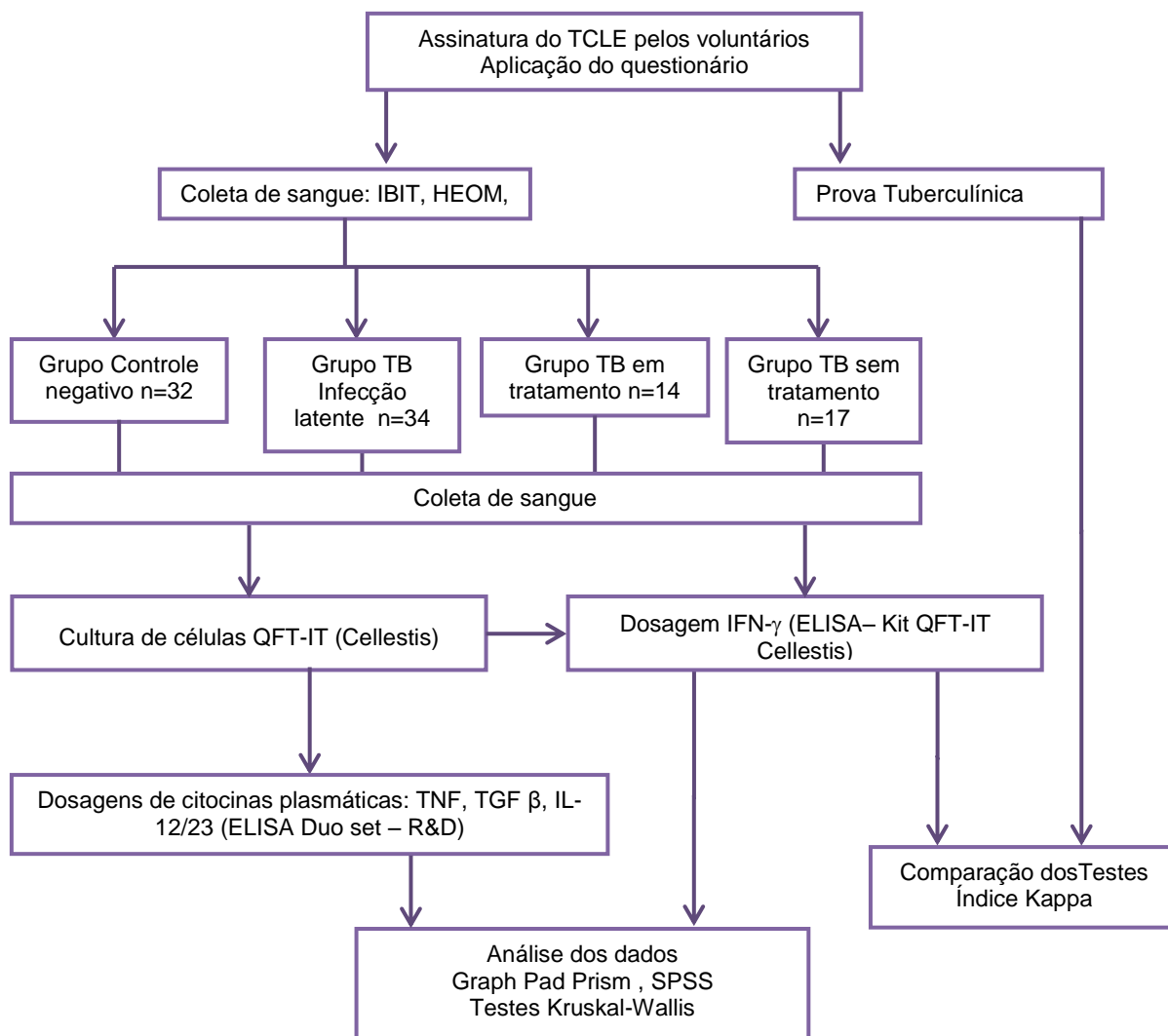
### 5.5.3 Dosagem do Fator de Necrose Tumoral (TNF)

Foi realizada com o Kit ELISA (Duo-Set-R&D Systems-USA) segundo recomendação do fabricante. O limite de detecção do Kit foi de 31,25 a 2000 pg/mL.

### 5.5.4 Dosagem de Interleucina 12/23 (IL12/23)

Foi realizada com o kit ELISA (Duo-Set-R&D Systems-USA) segundo a recomendação do fabricante. O limite de detecção do Kit foi de 80 a 4000 pg/mL.

## 5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



## **6 RESULTADOS**

Neste estudo, no grupo controle negativo, participaram 32 indivíduos, com média de idade de 32 anos, 13 do gênero masculino e 19 do gênero feminino, sendo que todos possuíam cicatriz vacinal (BCG) e todos foram TST não reator. Esses indivíduos se autotranscrituraram como brancos (11), pardos (17) e pretos (4). Já no grupo latente, foram 34 indivíduos, média de idade 39 anos, sendo 20 do gênero masculino e 14 do gênero feminino, desses, 32 possuíam cicatriz vacinal e 2 não e em relação ao TST, 23 foram TST reator fraco e 11 foram reatores fortes. Todos apresentaram baciloscopia negativa. Desses, 21 foram pardos, 12 pretos e 1 indígena. No grupo TB sem tratamento, por sua vez, foram 17 indivíduos, média de idade 35 anos, 10 foram do gênero masculino e 7 do gênero feminino. A presença da cicatriz vacinal foi observada em 13 indivíduos e em 4 não. Quanto ao TST, 3 foram não reatores, 3 reatores fracos e 11 reatores fortes. Desses, 1 indivíduo foi branco, 10 pardos e 6 pretos. No grupo TB em tratamento, foram 14 indivíduos com média de idade de 38 anos, quanto ao gênero, 12 foram masculinos e 2 foram femininos. Desses indivíduos 12 apresentaram cicatriz vacinal e 2 não. Quanto ao TSTD, 3 foram não reatores, 3 reatores fracos e 11 reatores fortes. Nesse grupo tivemos 1 indivíduo branco, 10 pardos, 6 pretos. Doze indivíduos apresentaram resultado de baciloscopia positiva e 2 negativa. Os dados sociodemográficos da população estudada nos grupos analisados encontram-se registrados de forma resumida na tabela 01.

Tabela 1 – Dados sociodemográficos da população estudada nos grupos analisados

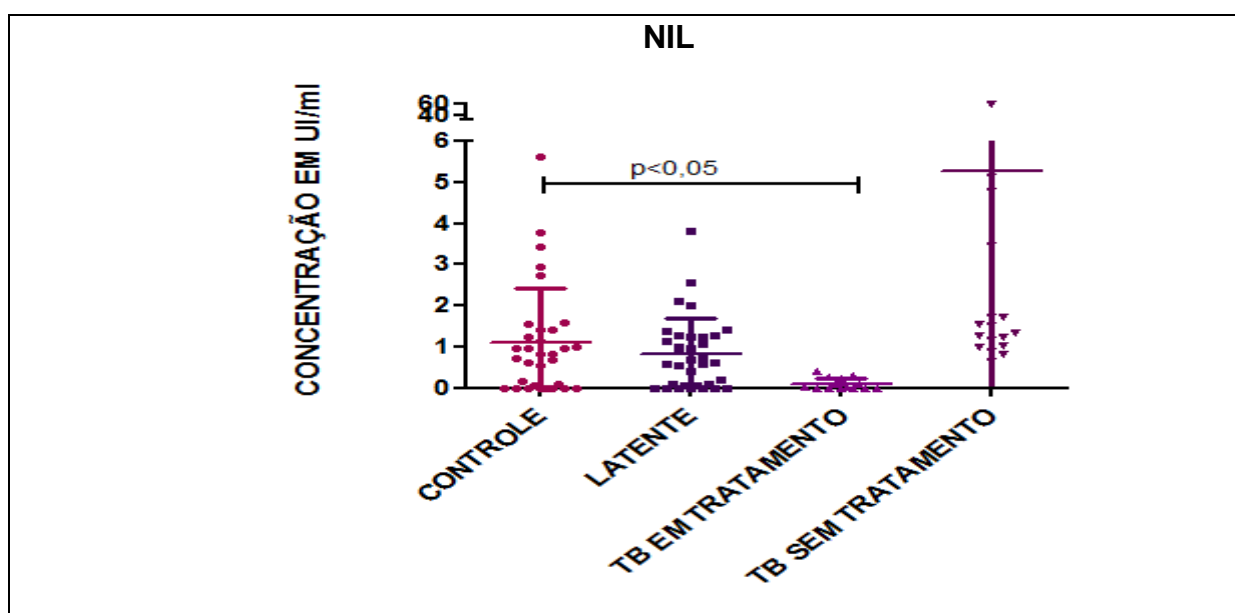
| Variáveis            | Grupo Controle | Grupo TB Latente | Grupo TB sem tratamento | Grupo TB em tratamento |
|----------------------|----------------|------------------|-------------------------|------------------------|
| Número de indivíduos | 32             | 34               | 17                      | 14                     |
| Média de idade       | 32             | 39               | 35                      | 38                     |
| Gênero               |                |                  |                         |                        |
| Masculino            | 13             | 20               | 10                      | 12                     |
| Feminino             | 19             | 14               | 07                      | 02                     |
| Vacinação BCG        |                |                  |                         |                        |
| Sim                  | 32             | 32               | 13                      | 12                     |
| Não                  | 00             | 02               | 04                      | 02                     |
| PPD mm               |                |                  |                         |                        |
| Não reator           | 32             | 00               | 03                      | 00                     |
| Fraco reator         | 00             | 23               | 03                      | 09                     |
| Forte reator         | 00             | 11               | 11                      | 05                     |
| Classificação Étnica |                |                  |                         |                        |
| Branco               | 11             | 00               | 01                      | 00                     |
| Pardo                | 17             | 21               | 10                      | 07                     |
| Negra                | 04             | 12               | 06                      | 07                     |
| Índigena             | 00             | 01               | 00                      | 00                     |
| Baciloscopia         |                |                  |                         |                        |
| Positiva             | 00             | 00               | 13                      | 12                     |
| Negativa             | 32             | 34               | 04                      | 02                     |

## 6.1 IFN- $\gamma$ PRODUZIDO EM RESPOSTA AO QuantiFERON® TB Gold IT

### 6.1.1 Produção em Resposta ao Tubo Nil

Os níveis basais das culturas no tubo Nil (sem estímulo) apresentaram valores diminuídos com exceção de um indivíduo do grupo controle e outro do grupo TB sem tratamento. As medianas dos 4 grupos encontram-se abaixo de 1,330 UI/mL: medianas de 0,84 UI/mL no grupo controle; 0,67 UI/mL no grupo TB infecção latente; 0,0315 UI/mL; e, TB em tratamento, 1,330 UI/mL. As médias nos 4 grupos foram abaixo de 5,271 UI/mL: médias 1,103 UI/mL no grupo controle; 0,8413 UI/mL no grupo TB latente; TB em tratamento, 0,1053 UI/mL; e, TB sem tratamento, 5,271 UI/mL. Os valores mínimos e máximos encontrados nos 4 grupos estão entre 0,00- 60,22 UI/mL: 0,00-5,630 UI/mL no grupo controle; 0,00-3,810 UI/mL no grupo TB latente; TB em tratamento, 0,00-0,4110 UI/mL; e TB sem tratamento 0,6500-60,22 UI/mL. O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de 14,22 UI/mL: 1,314 UI/mL no grupo controle; 0,8586 UI/mL no grupo TB infecção latente; TB em tratamento 0,139 UI/mL; e TB sem tratamento 14,22 UI/mL. A distribuição da produção de IFN- $\gamma$  basal, no tubo sem estímulo (NIL) encontra-se no gráfico 01.

**Gráfico 1** – Distribuição dos valores e medianas da produção de IFN- $\gamma$  em cultura de células de sangue heparinizado no tubo NIL sem estímulo (puro) do QFT- IT do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ).

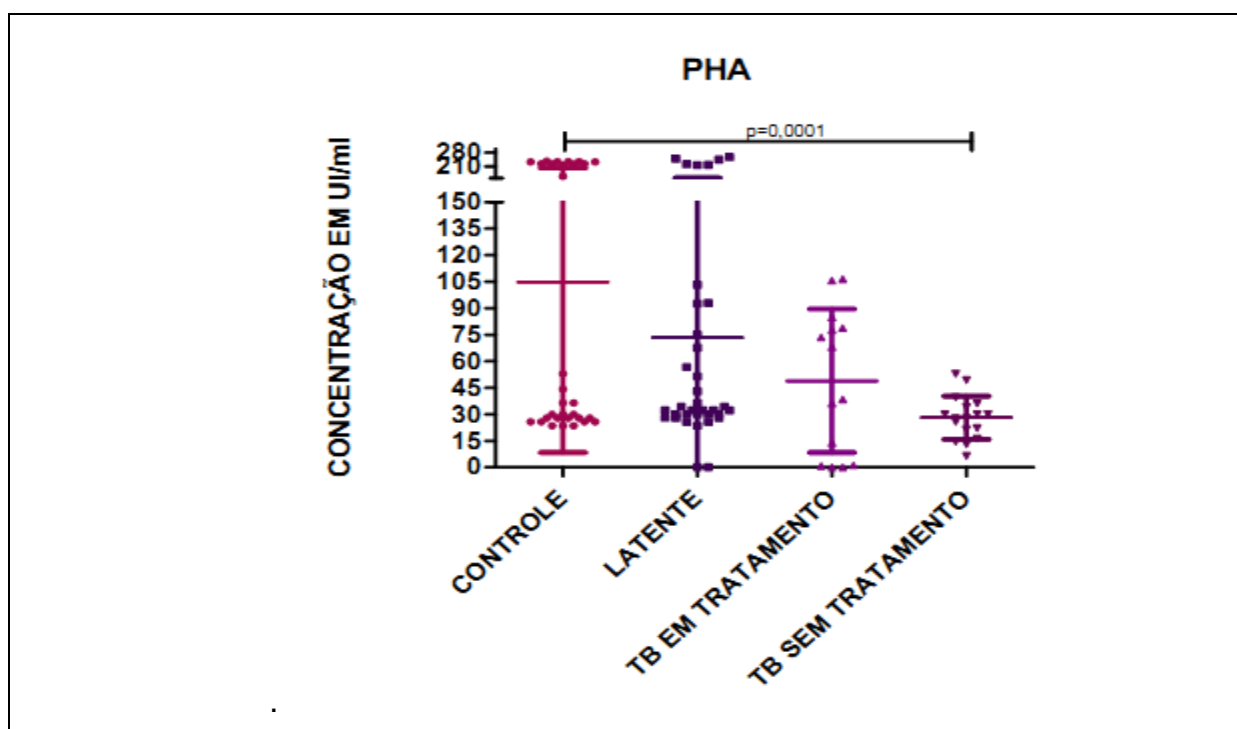




### 6.1.2 Produção em Resposta ao Tubo com Mitógeno PHA

Os resultados da resposta a PHA apresentaram perfil de resposta diferente entre os grupos. Nos grupos controle e TB latente houve duas subpopulações de resposta e no grupo TB em tratamento foi homogênea. Observam-se maiores níveis de resposta no grupo TB latente em 18 indivíduos de 34 (53%). As medianas de todos os grupos encontram-se abaixo de 53,18 UI/mL: medianas de 36,47 UI/mL no grupo controle; de 32,17 UI/mL no grupo TB latente; TB em tratamento, 53,18 UI/mL; e TB sem tratamento 27,87 UI/mL. Médias abaixo de 104,80 UI/mL: respectivamente 104,80 UI/mL; 73,32 UI/mL; 48,94 UI/mL; e 28,08 UI/mL. Os valores mínimos e máximos estão entre 0,00 e 257,8 UI/mL: 23,57-237,4 UI/mL; 0,00-257,8 UI/mL; 0,00-106,5 UI/mL; e 6,45-52,95 UI/mL entre os grupos acima descritos. O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de 96,55 UI/mL: 96,55 UI/mL, 78,15 UI/mL, 40,57 UI/mL e 12,29 UI/mL. Houve diferença significativa entre os grupos controle e TB sem tratamento. A distribuição da produção de INF- $\gamma$  basal no tubo com mitógeno (PHA) encontra-se no gráfico 02.

**Gráfico 2** – Distribuição dos valores e medianas da produção de INF- $\gamma$  em cultura de células de sangue heparinizado, estimuladas *in vitro* com PHA do QFT- IT de indivíduos do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ).



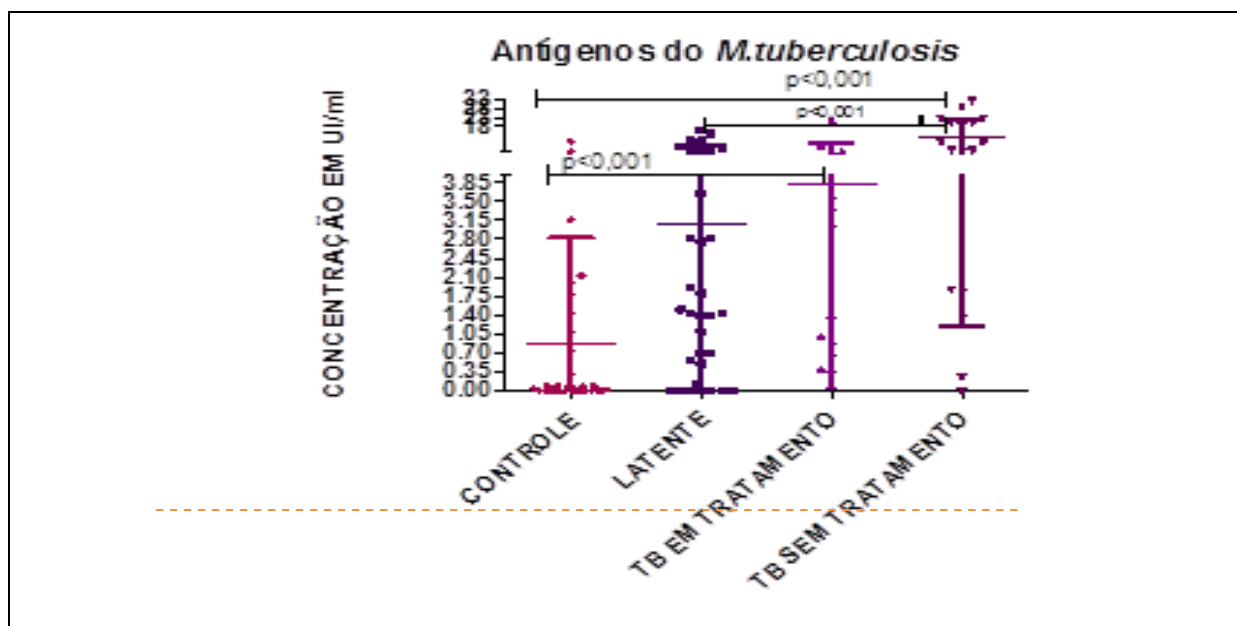
### 6.1.3 Produção em Resposta ao Tubo com Antígeno do Mtb

Os resultados da resposta ao antígeno TB apresentam perfil de resposta diferente. No grupo controle a resposta foi homogênea, no grupo latente ( r) foi identificado duas subpopulações já no grupo TB em tratamento verificou-se respostas diferentes e o grupo TB sem tratamento apresentou resposta homogênea com exceção de um indivíduo.(.). As medianas de todos os grupos encontram-se abaixo de 9,060 UI/mL: medianas de 0,06 UI/mL no grupo controle; , no grupo infecção latente; 1,440 UI/mL, TB em tratamento 2,250 UI/mL e TB sem tratamento 9,060 UI/mL. Médias abaixo de 11,79 UI/mL : respectivamente grupo controle 0,8748 UI/mL; (); TB infecção latente 3,078 UI/mL, TB em tratamento 3,814 UI/mL, TB sem tratamento 11,79 UI/mL

Os valores mínimos e máximos estão entre 0,00 e 32,00 UI/mL( Grupo controle 0,00-9,800 UI/mL. infecção latente 0,00-16,00 UI/mL , TB em tratamento 0,10 – 21,80 UI/mL , TB sem tratamento 0,00-32,00 UI/mL.

O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de 10,60 UI/mL respectivamente 1,955 UI/mL; 4,079 UI/mL , 5,620 UI/mL , 10,6 UI/mL. A distribuição da produção de INF- $\gamma$  basal, no tubo com estímulos antigênicos específicos (Mtb) encontra-se registrado no gráfico 03.

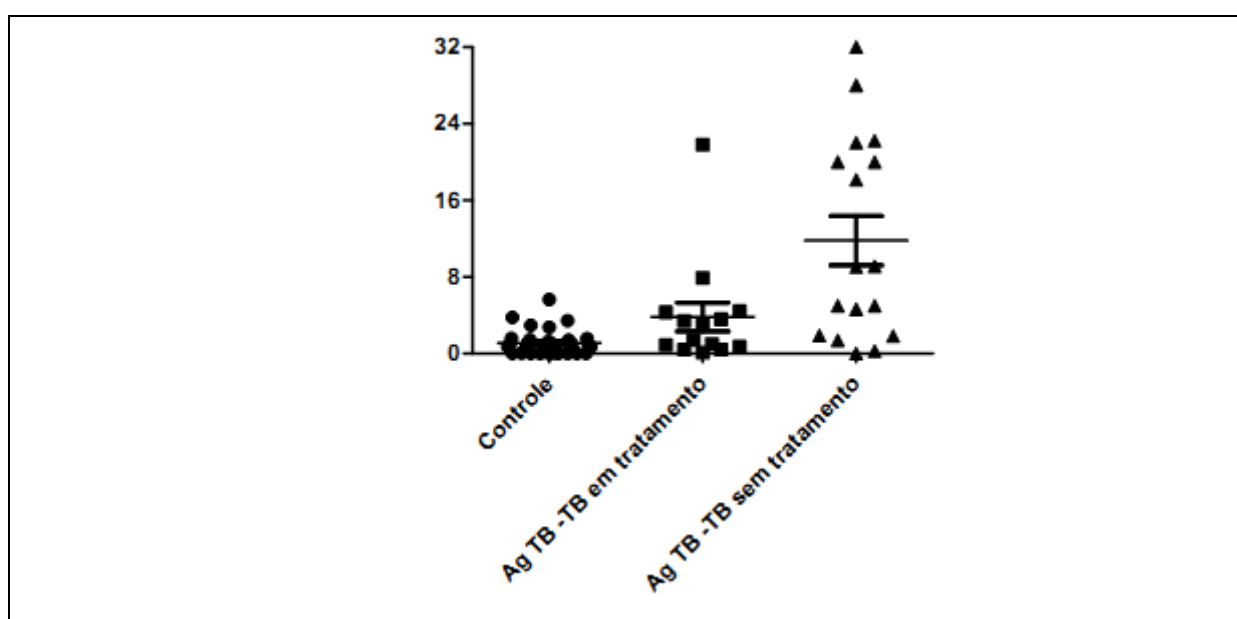
**Gráfico 3** – Distribuição dos valores e medianas da produção de IFN- $\gamma$  em cultura de células de sangue heparinizado estimulados *in vitro* com antígenos do *M. tuberculosis* do QFT-IT do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ).



### 6.1.4 Índice de Estímulo

Quando o grupo TB sem tratamento foi estimulado com os antígenos do Mtb (Kit QFT-IT) verificou-se uma resposta elevada. Provavelmente esses antígenos selecionaram e estimularam os linfócitos T por meio da síntese de determinados receptores que apresentaram uma alta afinidade ao estímulo antigênico. O índice de estímulo com antígenos Mtb na produção de IFN- $\gamma$  encontra-se no gráfico 04.

**Gráfico 4** – Índice de estímulo com antígenos Mtb na produção de IFN- $\gamma$  na população estudada: indivíduos controle (n=32), TB em tratamento (n=14) e TB sem tratamento (n=17).



### 6.1.5 Correlação entre o Teste Cutâneo da Tuberculina e QuantiFERON® TB Gold IT

A correlação entre o TST e QuantiFERON® TB Gold IT mostrou os seguintes resultados: no grupo controle, 10 indivíduos foram positivos aos antígenos do Mtb e 22 negativos, porém todos apresentavam TST negativo. No grupo latente, 9 indivíduos foram positivos e 25 negativos no QFT IT, e, no TST, 23 foram reator fraco e 11 reator forte. No grupo TB sem tratamento, 13 indivíduos foram positivos, 4 negativos aos antígenos do Mtb do QFT IT e, em relação ao TST 3, foram não reator, 3 reator fraco e 11 reator forte. No grupo TB em tratamento, 12 indivíduos foram positivos, no QFT IT, e 2 negativos, no TST, 9 foram reator fraco e 5 reator

forte. A concordância entre o TST e QUANTIFERON® -TB GOLD IT foi feita utilizando o teste Kappa que mostrou uma concordância moderada ( $\kappa=0,6$ ). Um resultado falso-negativo pode ser devido a um erro técnico na aplicação do TST e a variabilidade de resposta imune devido a fatores intrínsecos ou extrínsecos (HOWARD et al.,1970; HOLDEN et al.,1971; KARDJITO T, et al.;1981; PAI et al., 2005). Um resultado falso-positivo pode ser devido a uma resposta cruzada com a vacina BCG. (CAMPOS, 2006) ou a um aumento da área de endurecimento em resposta ao teste TST em indivíduos vacinados (TISSOT et al, 2005; MACHADO et al, 2009).

Os resultados da correlação entre o TST e QuantiFERON® TB Gold IT dados estão correlacionados na Tabela 02.

**Tabela 2 – Correlação do QUANTIFERON® -TB GOLD TEST IT e TST**

|                   | Grupo Controle | Grupo TB latente | Grupo TB sem tratamento | Grupo TB em tratamento |
|-------------------|----------------|------------------|-------------------------|------------------------|
| QUANTIFERON       | 32             | 34               | 17                      | 14                     |
| Positivo          | 10             | 09               | 13                      | 12                     |
| Indeterminado     | 00             | 00               | 00                      | 00                     |
| Negativo          | 22             | 25               | 04                      | 02                     |
| TST               |                |                  |                         |                        |
| Não reator        | 32             | 00               | 03                      | 00                     |
| Fracamente reator | 00             | 23               | 03                      | 09                     |
| Forte reator      | 00             | 11               | 11                      | 05                     |

A concordância entre o TST e QuantiFERON® -TB Gold Test IT foi feita utilizando o teste Kappa que mostrou uma concordância moderada ( $\kappa=0,6$ ).

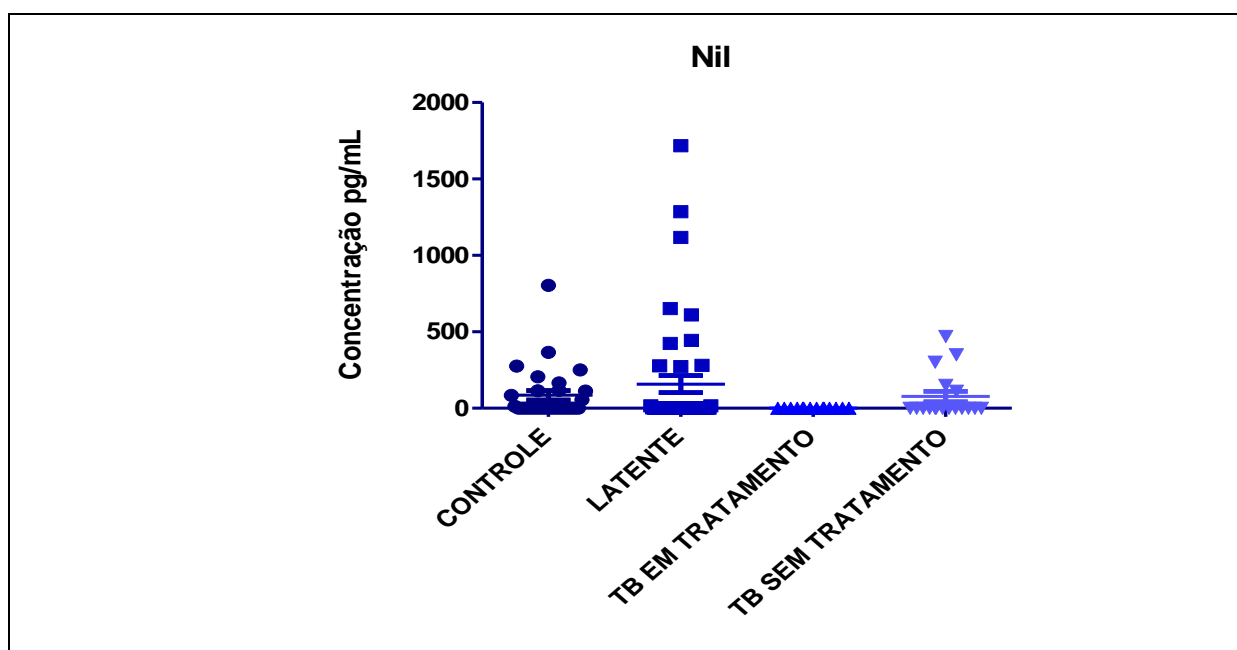
## 6.2. TNF PRODUZIDO EM RESPOSTA AO QuantiFERON® TB Gold IT

### 6.2.1 Produção em Resposta ao Tubo Nil

Os níveis basais das culturas no tubo Nil (sem estímulo) mostram perfil de resposta diversificados: no grupo controle, mostrou 6 (19%) indivíduos de 32 foram positivos; no grupo TB latente, tivemos 2 subpopulações e 10 indivíduos (34%) de 34 foram positivos; o grupo TB em tratamento não apresentou resposta; e no grupo TB sem tratamento, 6 (34%) indivíduos de 17 foram positivos. Houve diferença

significativa entre os grupos TB latente e TB sem tratamento. As medianas dos 4 grupos encontram-se abaixo de 0,26 UI/mL : medianas de 0,41 UI/mL no grupo controle; 0,00 UI/mL no grupo TB latente; TB em tratamento, 0,0315 UI/mL; e TB sem tratamento, 0,26 UI/mL. As médias nos 4 grupos foram abaixo de 158,2 UI/mL: médias 85,89 UI/mL no grupo controle; 158,2 UI/mL no grupo TB latente; TB em tratamento, 0,1053 UI/mL; e TB sem tratamento 0,1053 UI/mL. Os valores mínimos e máximos encontrados nos 4 grupos estão entre 0,00- 1718 UI/mL .: 0,00-804 UI/mL no grupo controle; 0,00- 1718 UI/mL no grupo TB latente; Tb em tratamento, 0,00-0,4110 UI/mL; e TB sem tratamento 0,00 – 470 UI/mL . O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de 373,4 UI/mL : 168,1 UI/mL no grupo controle; 373 UI/mL no grupo TB latente; em tratamento, 373,4 UI/mL; e TB sem tratamento 146,1 UI/mL. A distribuição da produção de TNF no tubo Nil encontra-se no gráfico 05:

**Gráfico 5** – Distribuição dos valores e medianas da produção de TNF dosadas por ELISA (Duo-Set-R&D Systems-USA) no plasma do QTF-IT, não estimulado (puro), do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ).

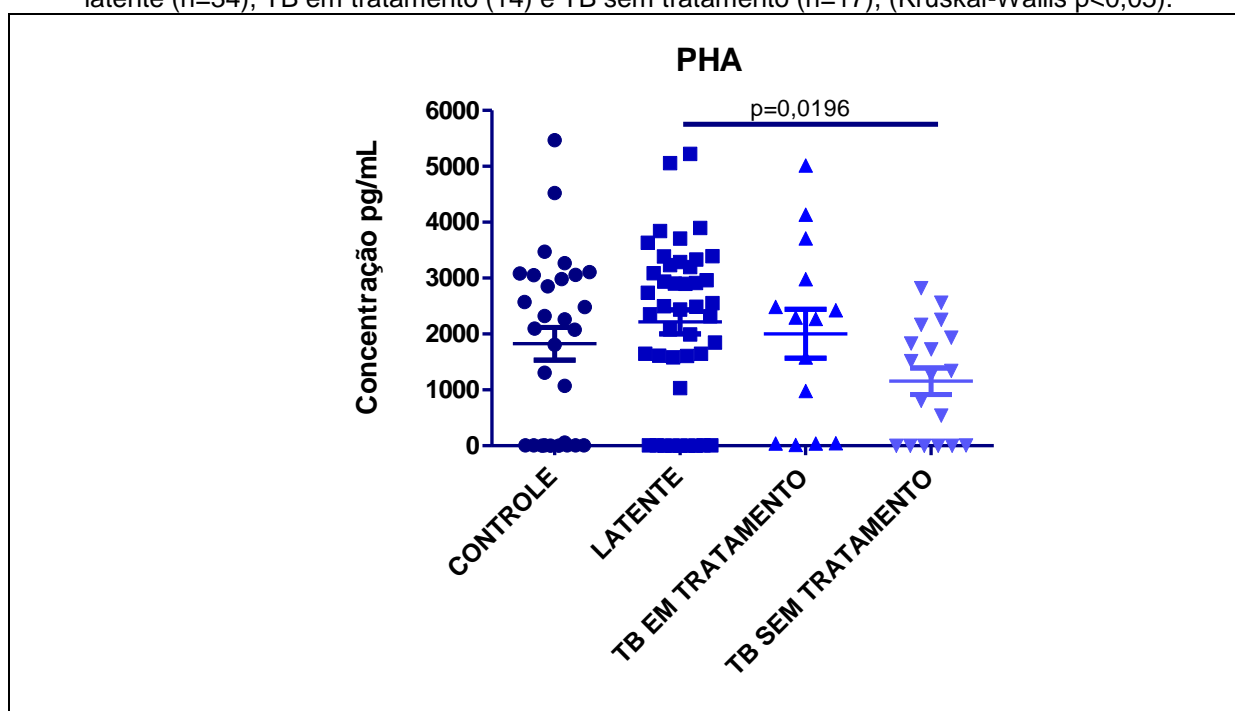


### 6.2.2 Produção em Resposta ao Tubo com Mitógeno Fitohemaglutinina (PHA)

Os resultados da resposta à PHA mostraram perfil de resposta diferente entre os grupos. Nos grupos controle e TB latente houve duas subpopulações de resposta

semelhantes; no grupo TB em tratamento, 5 (36%) foram positivos; no grupo TB sem tratamento, 8 (47%) indivíduos de 17 foram positivos. Foram observados maiores níveis de resposta no grupo TB latente: 18 indivíduos de 34 (53%). As medianas de todos os grupos encontram-se abaixo de 2488 UI/mL: medianas de 2096 UI/mL no grupo controle; 2488 UI/mL no grupo TB latente; TB em tratamento, 2285 UI/mL; e, TB sem tratamento, 1308 UI/mL. Média abaixo de 2218 UI/mL : respectivamente 1827 UI/mL; 2218 UI/mL; 2003 UI/mL; e 1156 UI/mL. Os valores mínimos e máximos estão entre 0,00 e 5469 UI/mL: 0,4280 – 5469 UI/mL; 0,00-5223UI/mL; 18,00 - 5016 UI/mL; e 0,728 - 2820 UI/mL entre os grupos acima descritos. O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de 1636 UI/mL : 1574 UI/mL; 1425 UI/mL; 1636 UI/mL; e 1001 UI/mL. Houve diferença significativa entre os grupos controle e TB sem tratamento. A distribuição da produção de TNF com mitógeno (PHA) encontra-se no gráfico 06.

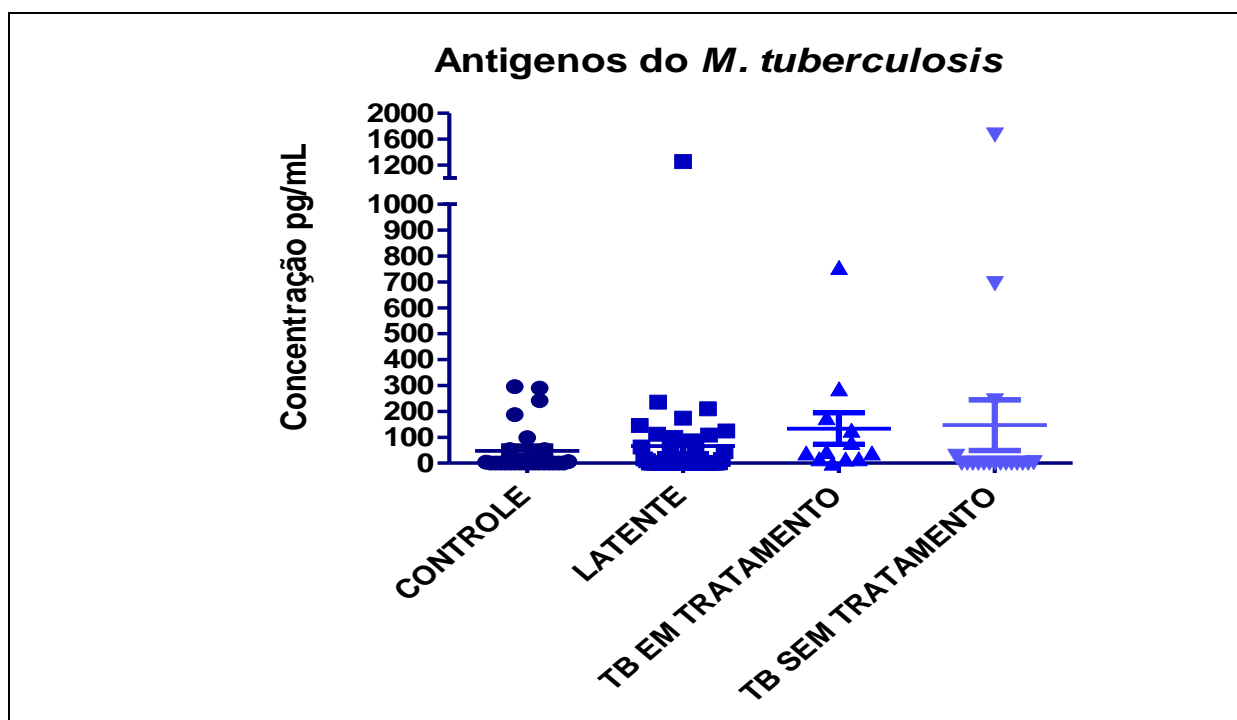
**Gráfico 6** – Distribuição dos valores e medianas da produção de TNF dosadas por ELISA no plasma do QFT-IT estimulados *in vitro* com PHA, do grupo controle (n=32), TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14) e TB sem tratamento (n=17), (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ).



### 6.2.3 Produção em Resposta ao Tubo com Antígeno do *Mtb*

Os resultados da resposta ao antígeno Mtb mostraram que, no grupo TB latente, houve uma resposta proliferativa aumentada e 15 indivíduos (44%) de 34 foram positivos; nos grupos TB em tratamento, 2 (14%) indivíduos de 14; e TB sem tratamento, 3 (18%) indivíduos de 17 apresentaram resposta. Na avaliação dos resultados por índice de estimulação, verificou-se que houve uma tendência aumentada de resposta no grupo TB latente. As medianas de todos os grupos encontram-se abaixo de 43,00 UI/mL: medianas de 0,284 UI/mL no grupo controle; 0,332 UI/mL no grupo TB latente; 43,00 UI/mL, TB em tratamento; e, TB sem tratamento, 0,292 UI/mL. Médias abaixo de 146,6 UI/mL: grupo controle, 47,64 UI/mL; grupo TB latente, 65,96 UI/mL; TB em tratamento, 133,8 UI/mL; e TB sem tratamento, 146,6 UI/mL. Os valores mínimos e máximos estão entre 0,00 e 1670 UI/mL: no grupo controle, 0,00-296,0 UI/mL; no grupo TB latente, 0,00-1256 UI/mL; TB com tratamento, 0,00-756,0 UI/mL; e, TB sem tratamento, 0,00-1670 UI/mL. O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de 416,1 UI/mL: grupo controle, 92,3 UI/mL; grupo TB latente, 196 UI/mL; TB em tratamento, 213,1 UI/mL; e TB sem tratamento, 416,1 UI/mL. A distribuição da produção de TNF com estímulos antigênicos específicos (Mtb) encontra-se no gráfico 07.

**Gráfico 7** – Distribuição dos valores e medianas da produção de TNF dosadas por ELISA no plasma do QFT-TI estimulados *in vitro* com antígenos do Mtb do grupo controle (n=32), grupo latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n= 17) (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ).

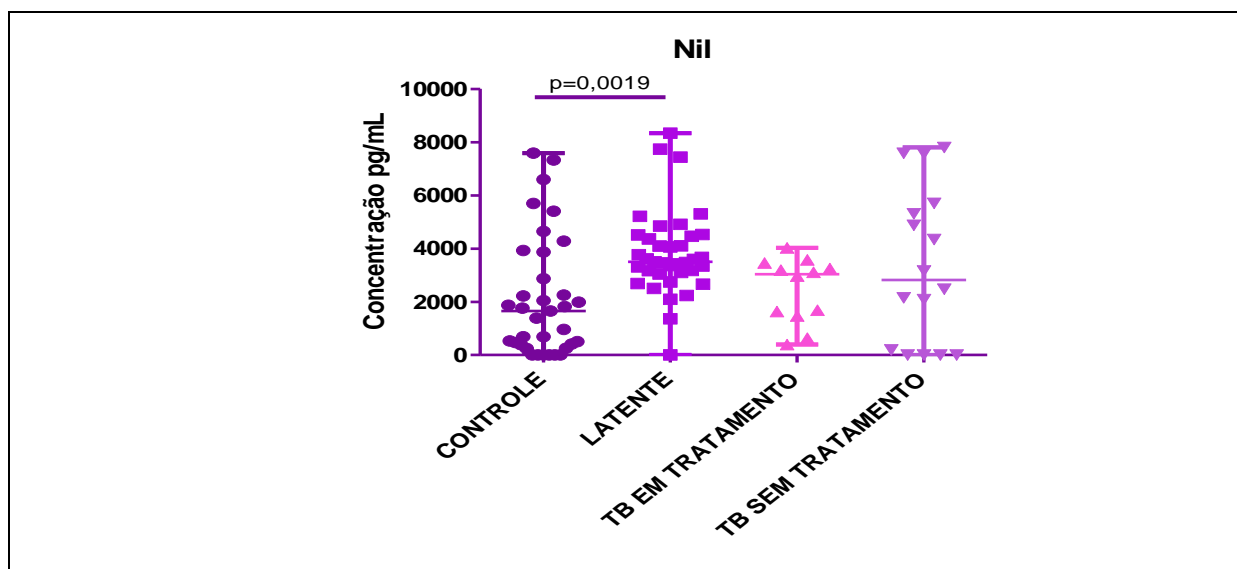


### 6.3 TGF- $\beta$ PRODUZIDO EM RESPOSTA AO TUBO DO QuantiFERON® TB Gold IT

#### 6.3.1 Produção em Resposta ao Tubo Nil

Os resultados basais das culturas no tubo Nil mostraram que em todos os grupos houve resposta. No grupo controle, 28 de 34 indivíduos (82%) responderam; o grupo TB latente apresentou resposta mais alta, 32 de 34 (94%) foram positivos; no grupo TB em tratamento, 5 de 14 (36%) foram positivos; e no grupo TB sem tratamento 7 de 17 (41%) responderam. As medianas dos 4 grupos encontram-se abaixo de 3505 UI/mL: medianas de 1665 UI/mL no grupo controle; 3505 UI/mL no grupo TB latente; TB com tratamento, 3041UI/mL; e, TB sem tratamento, 2823 UI/mL. As médias nos 4 grupos foram abaixo de 3819 UI/mL: médias 2124 UI/mL no grupo controle; 3819 UI/mL no grupo TB latente; TB com tratamento, 2452 UI/mL; e, TB sem tratamento, 3330 UI/mL. Os valores mínimos e máximos encontrados nos 4 grupos estão entre 0,00-8340UI/mL: no grupo controle, 0,00-7590 UI/mL; no grupo TB latente, 0,00-8340; TB com tratamento, 395-4026UI/mL; e, TB sem tratamento, 0,00-7805UI/mL. O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de UI/mL: 2910 UI/mL. No grupo controle; 2255 UI/mL, no grupo TB latente; 1598 UI/mL, TB com tratamento 1222 UI/mL e TB sem tratamento 2910UI/mL. A distribuição da produção de TGF $\beta$  sem estímulo (Nil) encontra-se no gráfico 08.

**Gráfico 8** – Distribuição dos valores e medianas da produção de TGF- $\beta$  dosadas por ELISA no plasma não estimuladas (puro). do QFT-IT do grupo controle n=32) TB latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17) (Kruskal-Wallis p<0,05).

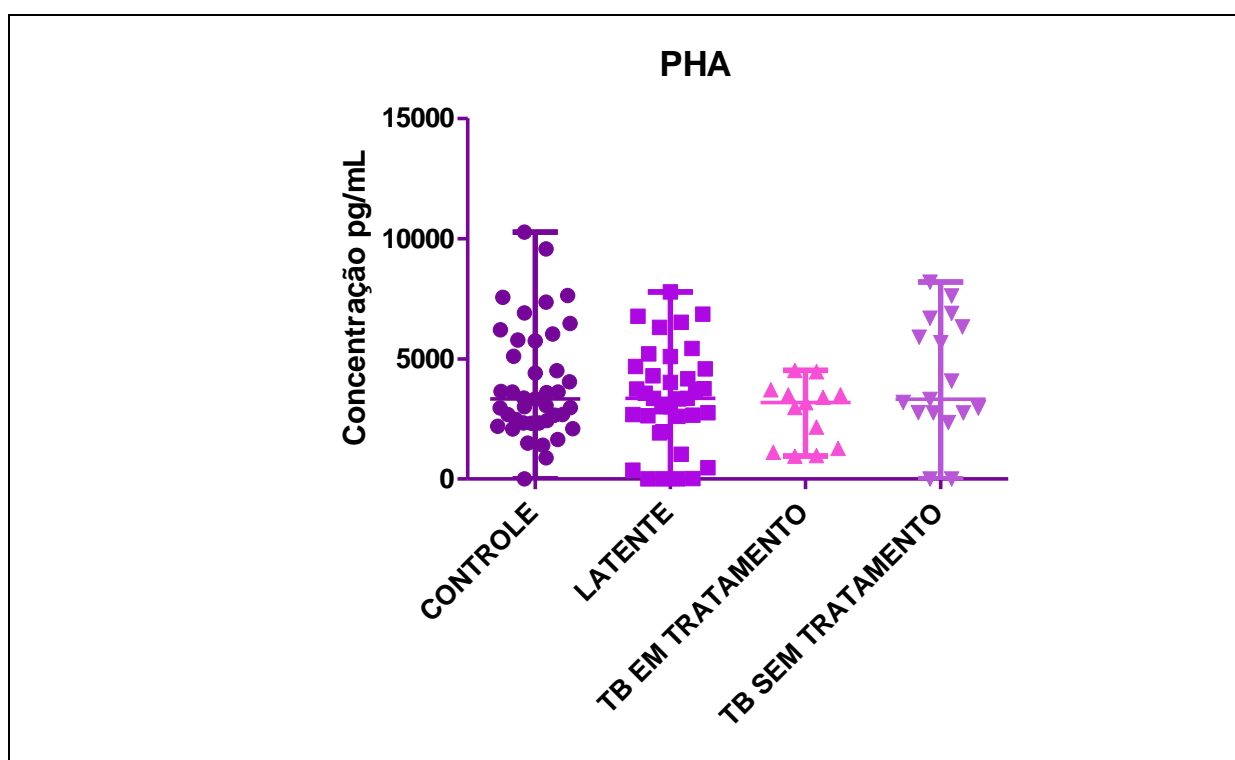




### 6.3.2 Produção em Resposta ao Tubo com Mitógeno PHA

Todos os grupos apresentaram resposta a essa citocina. No grupo TB com tratamento, 7 de 14 indivíduos apresentaram respostas mais baixas (50%); no grupo TB sem tratamento, 5 de 17 indivíduos (29%); e, no grupo TB latente, 16 de 34 (50%) foram positivos. Em relação aos níveis de resposta, não houve diferença significativa entre os grupos TB com e TB sem tratamento e TB latente. As medianas de todos os grupos encontram-se abaixo de 3353 UI/mL: medianas de 3335 UI/mL no grupo controle; 3353 UI/mL no grupo TB latente; TB com tratamento 3185 UI/mL e, TB sem tratamento, 3320 UI/mL. Médias abaixo de 4206 UI/mL: grupo controle, 3962/mL; grupo TB latente, 3378 UI/mL; TB com tratamento, 2753 UI/mL; e TB sem tratamento, 4206 UI/mL. Os valores mínimos e máximos estão entre 0,00 e 10270 UI/mL: no grupo controle, 0,00-10270 UI/mL; no grupo TB latente, 0,00-7780 UI/mL; TB com tratamento, 950,0-4516 UI/mL; e, TB sem tratamento, 0,00-8190 UI/mL. O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de 2487 UI/mL: grupo controle, 2332 UI/mL; grupo TB latente, 2090 UI/mL; TB com tratamento, 1303 UI/mL; e TB sem tratamento 2487 UI/mL. A distribuição da produção de TGF $\beta$  com mitógeno (PHA) encontra-se no gráfico 09.

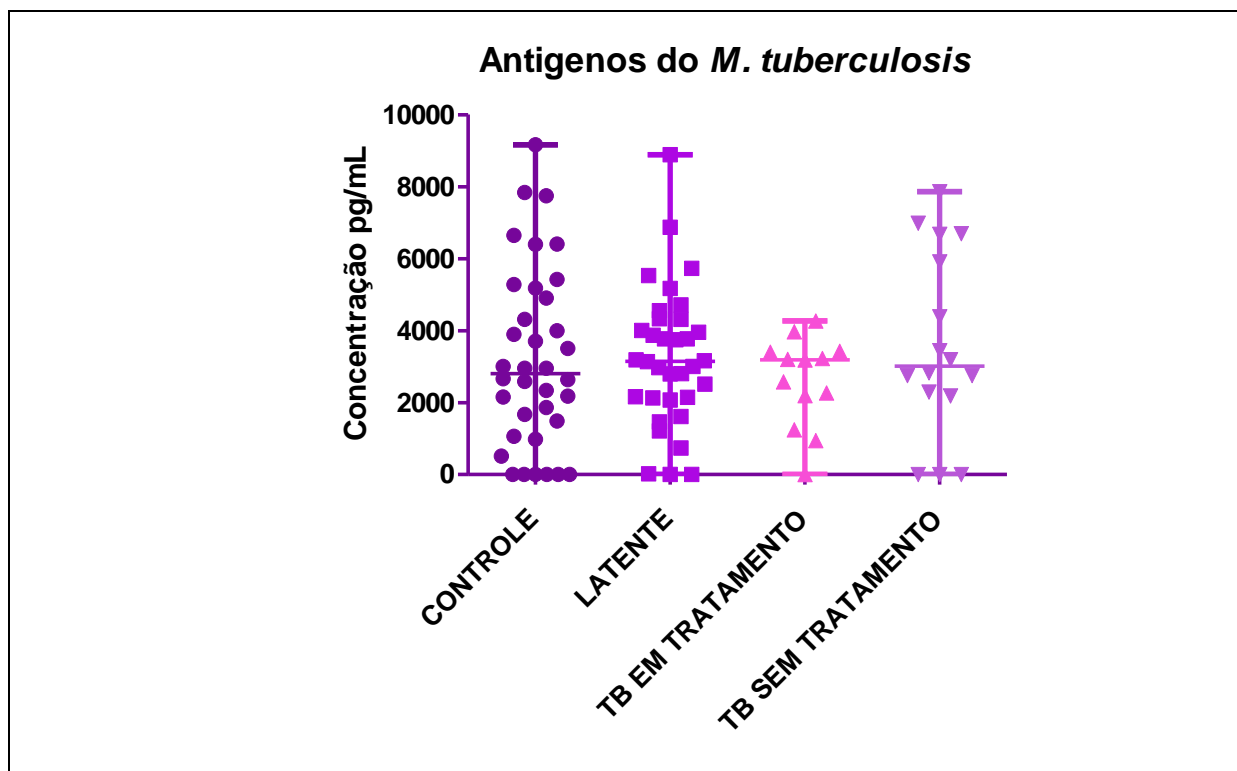
**Gráfico 9** – Distribuição dos valores e medianas da produção de TGF- $\beta$  dosadas por ELISA no plasma estimulados *in vitro* com PHA do QFT-IT do grupo controle (n = 32) TB latente (n = 34), TB em tratamento (n = 14), TB sem tratamento (n = 17) (Kruskal-Wallis p<0,05).



### 6.3.3 Produção em Resposta ao Tubo com Antígeno Mtb

Os resultados da resposta ao antígeno TB mostraram que houve uma distribuição homogênea. No grupo TB em tratamento, a resposta foi inferior quando comparada aos restantes dos grupos. As medianas de todos os grupos encontram-se abaixo de 3188 UI/mL: medianas de 2808 UI/mL no grupo controle; no grupo TB latente, 3148 UI/mL; TB com tratamento, 3188 UI/mL; TB sem tratamento, 3010UI/mL. Médias abaixo de 3625UI/mL: grupo controle, 3207UI/mL; grupo TB latente, 3246 UI/mL; TB com tratamento, 2610 UI/mL; e TB sem tratamento, 3625 UI/mL. Os valores mínimos e máximos estão entre 0,00 e 9162 UI/mL: no grupo controle, 0,00-9162 UI/mL; no grupo TB latente, 0,00-8890 UI/mL; TB com tratamento, 0,00-4268 UI/mL; e TB sem tratamento 0,00-7865UI/mL. O desvio padrão nos 4 grupos foi abaixo de 2576 UI/mL: grupo controle, 2496UI/mL; grupo TB latente, 1926 UI/mL; TB com tratamento, 1249 UI/mL; e, TB sem tratamento, 2576 UI/mL. A distribuição da produção de TGF- $\beta$  com estímulos antigênicos específicos (Mtb) encontra-se no gráfico 10.

**Gráfico 10** – Distribuição dos valores e medianas da produção de TGF-  $\beta$  dosadas por ELISA no plasma estimulados *in vitro* com antígenos do Mtb do QTF-IT do grupo controle (n=32) grupo Tb latente (n=34), TB em tratamento (n=14), TB sem tratamento (n=17), Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ).



#### 6.4 PRODUÇÃO DE IL12/23 EM RESPOSTA AO TUBO QFT-IT

Na dosagem de IL 12/23, não se observou valor na densidade óptica em todas as amostras testadas. Como a curva padrão funcionou como descrita no kit, o teste foi validado. Presumiu-se que essas leituras das amostras testadas ocorreram devido ao fato de o limite de detecção do teste ficar acima dos valores presentes nelas.

Na tabela 3, são mostradas a distribuição das médias, medianas, valores mínimos e máximos da quantificação de IFN- $\gamma$ , TNF e TGF- $\beta$  nos tubos sem estímulo, com estímulo PHA e antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* no plasma do tubo QuantiFERON® TB Gold Test IT.

Tabela 03. Distribuição das médias, medianas, mínimo, máximo para a produção de IFN- $\gamma$ , TNF e TGF- $\beta$  em cultura de sangue total sem estímulo e com estímulo PHA e antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*

| Citocinas     | Tipo de Estímulo | Controle N= 32 |       |         |                  | Tuberculose sem tratamento N=17 |       |         |                    | Tuberculose em tratamento N=14 |       |         |                    | Latente N=34 |        |         |                    |
|---------------|------------------|----------------|-------|---------|------------------|---------------------------------|-------|---------|--------------------|--------------------------------|-------|---------|--------------------|--------------|--------|---------|--------------------|
|               |                  | Média pg/mL    | DP    | Mediana | Valores Mín-Máx. | Média pg/mL                     | DP    | Mediana | Valores Mín - Máx. | Média pg/mL                    | DP    | Mediana | Valores Mín - Máx. | Média pg/mL  | DP     | Mediana | Valores Mín - Máx. |
| IFN- $\gamma$ | Nil              | 1,103          | 1,314 | 0,84    | 0-5,630          | 5,271                           | 14,22 | 1,330   | 0,6500-60,22       | 0,1053                         | 0,139 | 0,0315  | 0,00-0,4110        | 0,8413       | 0,8586 | 0,67    | 0,00-3,810         |
|               | PHA              | 104,80         | 96,55 | 36,47   | 23,57-237,4      | 28,08                           | 12,29 | 27,87   | 6,450-52,95        | 48,94                          | 40,57 | 53,18   | 0,00-106,5         | 73,32        | 78,15  | 32,17   | 0,00-257,8         |
|               | Ag. TB           | 0,8748         | 1,955 | 0,06    | 0,00-9,800       | 11,79                           | 10,6  | 9,060   | 0,00_32,00         | 3,814                          | 5,620 | 2,250   | 0,10-21,80         | 3,078        | 4,079  | 1,440   | 0,00-16,00         |
| TNF           | Nil              | 85,89          | 168,1 | 0,41    | 0,00-804         | 0,1053                          | 146,1 | 0,26    | 0,00-470           | 0,1053                         | 373,4 | 0,0315  | 0,00-0,4110        | 158,2        | 373,0  | 0,00    | 0,00 -1718         |
|               | PHA              | 1827           | 1574  | 2096    | 0,4280-5469      | 1156                            | 1001  | 1308    | 0,728-2820         | 2003                           | 1636  | 2285    | 18,00-5016         | 2218         | 1425   | 2488    | 0,00-5223          |
|               | Ag. TB           | 47,64          | 92,3  | 0,284   | 0,00-296,0       | 146,6                           | 416,1 | 0,292   | 0,00-1670          | 133,8                          | 213,1 | 43,00   | 0,00-756,0         | 65,96        | 196    | 0,332   | 0,00-1256          |
| IL12/23       | Nil              | -              | -     | -       | -                | -                               | -     | -       | -                  | -                              | -     | -       | -                  | -            | -      | -       | -                  |
|               | PHA              | -              | -     | -       | -                | -                               | -     | -       | -                  | -                              | -     | -       | -                  | -            | -      | -       | -                  |
|               | Ag. TB           | -              | -     | -       | -                | -                               | -     | -       | -                  | -                              | -     | -       | -                  | -            | -      | -       | -                  |
| TGF- $\beta$  | Nil              | 2124           | 2255  | 1655    | 0,00-7590        | 3330                            | 2910  | 2823    | 0,00-7805          | 2452                           | 1222  | 3041    | 395-4026           | 3819         | 1598   | 3505    | 0,00-8340          |
|               | PHA              | 3962           | 2332  | 3335    | 0,00-10270       | 4206                            | 2487  | 3320    | 0,00-8190          | 2753                           | 1303  | 3185    | 950,0-4516         | 3378         | 2090   | 3353    | 0,00-7780          |
|               | Ag. TB           | 3207           | 2496  | 2808    | 0,00-9162        | 3625                            | 2576  | 3010    | 0,00-7865          | 2610                           | 1249  | 3188    | 0,00-4268          | 3246         | 1926   | 3148    | 0,00-8890          |



O diagnóstico da TB latente representa um desafio para o controle da Tuberculose. Novos testes que detectam a produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* em resposta à liberação de antígenos presentes no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, têm sido avaliados como testes mais sensíveis e específicos. Vários estudos têm demonstrado a importância das citocinas como marcadores de atividade da tuberculose e a sua função imune protetora na regulação da resposta imunológica e inflamatória contra a micobactéria (PEREZ et al., 2002; ABRAMO et al., 2006; PERZI et al., 2008). No presente trabalho, foi avaliado o perfil das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, TGF- $\beta$ , IL-12/23 em indivíduos do grupo controle (n=32), grupo TB latente (n=34), grupo TB sem tratamento (n=17) e TB em tratamento (n=14).

Foi possível observar que a produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* em resposta ao tubo Nil, sem estímulo, mostrou valores diminuídos no grupo TB em tratamento (n=14), tal fato pode estar associado a alguns fatores, como o uso de medicamentos para tuberculose que inibiria a resposta imune, citotoxicidade ou no receptor de IFN- $\gamma$ .

Observou-se que dos indivíduos do grupo controle (n=32), média de idade 32 anos, em que todos participantes eram TST negativos, 31% foram positivos, quando estimulados com antígenos específicos do Mtb em resposta ao QFT-IT, o que pode estar associado à reatividade cruzada do IGRA a bactérias que compartilham a região de diferenciação 1 (RD1). Alguns trabalhos corroboram esse resultado, como o de Machado e colaboradores (2009) que, em um estudo de análise discordante entre o TST e liberação de interferon-gama em contactantes (n=301), realizado na cidade de Salvador-Bahia, encontrou resultado TST negativo e IGRA positivo em 17 indivíduos com média de idade de 37 anos. O autor ressalta que esse dado provavelmente seja devido ao pequeno número da amostra. Outro estudo semelhante foi o de Cabral e colaboradores (2011), em indivíduos TST negativos e com produção de IFN- $\gamma$ . A grande limitação do TST é a possibilidade de falso-negativo relacionado a fatores intrínsecos.

O grupo TB latente apresentou uma variabilidade de respostas, 29% ficaram abaixo do *cut off* do kit, sendo considerados negativos. Resultados reativos ao TST podem ocorrer devido à vacinação prévia com BCG, indivíduos que já entraram em contato com micobactérias ambientais, entretanto alguns indivíduos com TST reator foram negativos para o QFT-IT, o que pode evidenciar um resultado falso-positivo do

teste. Alguns estudos demonstram resultados semelhantes, entre eles os de Van Pinxteren e colaboradores (2000), que, em um estudo experimental utilizando ESAT-6 e CFP-10, relatam que esses antígenos são pouco sensíveis em áreas endêmicas apesar da alta especificidade. Entretanto, Brock e colaboradores (2001), em um estudo na Dinamarca, quanto à produção de  $\text{INF-}\gamma$  pelos antígenos ESAT-6 e CFP-10 e *M. tuberculosis*-PPD *in vitro*, avaliaram a especificidade e sensibilidade de grupos de indivíduos – vacinados (n=19), não vacinados (n=15) e TB doença (n=18) – e não encontraram diferença entre esses grupos, porém o grupo TB latente (n=34) apresentou maior positividade. Estudo similar foi feito com 312 indivíduos, TB latente, e 2848 indivíduos, TST negativos, sem doença, não vacinados, na população holandesa. Esse estudo estimou vários valores de corte de sensibilidade e especificidade para o TST – encontraram uma sensibilidade de 98,9% em 5 mm, 95,4% em 10 mm (BERKEL et al., 2005). Em um estudo populacional com diferentes etnias, Tian e colaboradores (2011) mostraram diferenças nas frequências dos alelos do gene  $\text{INF-}\gamma$  referente ao polimorfismo (+874T). A presença dessa mutação determina diferentes comportamentos quanto a sua liberação, podendo o indivíduo ser um alto ou um baixo produtor dessa citocina. Portanto, indivíduos com diferentes perfis de produção do  $\text{INF-}\gamma$  poderiam ser os responsáveis pela variabilidade dos resultados encontrados no estudo.

Neste estudo, o grupo TB em tratamento respondeu menos aos antígenos do *Mtb in vitro* do Kit QFT-IT quando comparados com o grupo TB sem tratamento. É possível que tal fato ocorra devido ao uso de quimioterápicos para TB que podem reduzir a produção de  $\text{INF-}\gamma$ . Esses resultados estão de acordo com os achados de Bocchino e colaboradores (2010) que verificaram que quanto maior for o tempo de tratamento, menor produção dessa citocina. Além disso, os quimioterápicos para TB podem reduzir a produção de  $\text{INF-}\gamma$ . Em contrapartida, indivíduos com TB sem tratamento obtiveram níveis elevados de  $\text{INF-}\gamma$ , provavelmente esta liberação aumentada deve-se à carga bacteriana (BOCCHINO et al., 2010; MATTOS et al., 2010).

Foi evidenciado nesse estudo que indivíduos TB sem tratamento são menos responsivos ao mitógeno fitohemaglutinina (PHA). É possível que, por estarem os linfócitos no sítio da infecção, teriam menos linfócitos circulantes e assim haveria uma resposta menos intensa ao estímulo inespecífico do mitógeno PHA.

Esses achados se assemelham aos resultados encontrados por Hernandez e colaboradores (2010) que, delineando um perfil linfocitário de indivíduos com TB ativa, demonstraram uma diminuição de linfócitos B. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de UMA e colaboradores (1999) e Carneiro e colaboradores, (2011)<sup>1</sup>

Neste estudo, não foi detectado IL-12/23, tal fato pode ser devido à concentração do Kit QFT-IT estar abaixo do limite de detecção do ELISA (Duo-Set-R&D Systems-USA). Como a curva padrão funcionou, o nosso teste foi validado. A IL-23 é uma citocina envolvida no recrutamento de células para o sítio da infecção, no entanto, em doenças inflamatórias, muitas vezes não é detectada. Outros trabalhos sugerem que a não detecção de IL-23 não influencia na produção de outras citocinas do perfil Th1, principalmente IFN- $\gamma$  (BROMBACHER, KASTELEIN, ALBER, 2003). KHADER e colaboradores (2005) em um trabalho experimental com camundongos deficientes de IL-23, demonstraram que não havia supressão de IFN- $\gamma$ .

Avaliando a resposta com TNF, observou-se que indivíduos com TB sem tratamento foram menos responsivos em comparação com os grupos controle e TB latente. No grupo TB latente, foi observado o maior perfil de resposta, o que parece mostrar a importância do TNF na formação e na manutenção do granuloma. Esses achados estão de acordo com o estudo Harari e colaboradores (2011) que analisaram células T CD4<sup>+</sup> Mtb-específica por citometria de fluxo para diferenciar TB latente e Tuberculose. Outros estudos, que corroboram os nossos resultados, avaliaram indivíduos TB em tratamento e após tratamento (MOHAN et al., 2001; MATTOS et al., 2007).

A produção elevada de TGF- $\beta$  é um fator importante para a regulação de resposta imune bem como na prevenção de doença autoimune. No presente estudo, foi observado que pacientes com TB em tratamento responderam menos aos antígenos de Mtb quando comparados com grupo TB sem tratamento. Diversos estudos têm demonstrado a importância do TGF- $\beta$  na imunopatogênese da tuberculose. Toossi e colaboradores (1995), trabalhando com células mononucleares de indivíduos com tuberculose, demonstraram uma alta produção dessa citocina e esse aumento foi mais significativo na lesão granulomatosa dos pulmões dos indivíduos com TB sem tratamento. Olobo e colaboradores (2010), avaliando

---

<sup>1</sup>) Dados do nosso grupo, não publicados.



citocinas do perfil Th1 e Th2 no soro de indivíduos com TB, mostraram uma alta produção de TGF- $\beta$  nos indivíduos com TB e uma diminuição significativa dos níveis pós-tratamento. Esses dados são condizentes com os resultados deste estudo que demonstraram que os indivíduos com TB sem tratamento têm níveis basais elevados dessa citocina em torno de 7500 a 2500 pg/mL, e os indivíduos do grupo TB em tratamento responderam menos na faixa de 500 a 3500 pg/mL aos antígenos Mtb, quando comparados com o grupo TB sem tratamento. Além disso, a liparanimana presente na parede celular do *Mycobacterium tuberculosis* é um potente indutor de TGF- $\beta$ . Contudo, a alta produção de TGF- $\beta$  pode estar associada à atividade de imunossupressão, dependendo da concentração e da cinética de cada citocina no sítio da infecção como demonstrado em diversos modelos animais (HERNANDEZ-PANDO et al. 2006). Outro fator associado à imunopatogênese da TB é a fibrose, sendo a maior causa de disfunção respiratória na TB e associada a uma alta produção de citocina fibrogênica, TGF- $\beta$ , bem como na presença de citocinas do perfil Th2 (HERNANDEZ-PANDO et al. 2009).

## **8 CONCLUSÕES**

Ao término deste trabalho, podemos chegar às seguintes conclusões:

Provavelmente com o QuantiFERON® TB Gold Test IT não é possível diferenciar indivíduos com TB latente e TB na população estudada;

Não se observa diferença no perfil de produção de citocinas no QuantiFERON® TB Gold Test IT com amostras da população de indivíduos com TB em tratamento e TB sem tratamento;

Há uma correlação moderada entre o Teste *in vivo* TST e o Ensaio de Liberação de IFN- $\gamma$  *in vitro* (QFT-IT);e,

Estudos mais conclusivos tornam-se necessários assim como a obtenção de uma amostragem maior.



ABRAMO, C. et al. Monokine induced by interferon –gamma and IFN- $\gamma$  response to a fusion protein of mycobacterium tuberculosis ESAt-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. **Microbes Infect**, v. 8, p. 45-51, 2006.

AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. **Clin Develop Immunol**, v. 2011, n. 2011, p. 17, 2010.

AKIRA, S. et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ANDERSEN, P. et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. **Lancet**, v. 356, n. 9235, p. 1099-1104, 2000.

ARAUJO, Z. et al. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de mycobacterium tuberculosis em la protección, patología y diagnóstico. **Invest Clin**, v. 49, n. 3, p. 411-441, 2008.

BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. **J Pediatr**, v. 82, p. 45-54, 2006. Suplemento 3.

BERGAMINI, B. M. et al. Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. **J. Pediatr**, v. 123, p. 419–424, 2009.

BERKEL, J. M. et al. Tuberculin skin test: estimation of positive and negative predictive values from routine data. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.9, n. 3, p. 310–316, 2005.

BMC Immunology, 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/24.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2011

BOCCHINO M., et al. Limited usefulness of QuantiFERON-TB Gold In-Tube\_ for monitoring anti-tuberculosis therapy. **Respir Med**, v. 4, p. 1551-1556, 2010.

BROMBACHER, F.; KASTELEIN, R.A.; ALBER, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. **Trends Immunol**, v. 24, p. 207–212, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Medicina. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **DTO da tuberculose na atenção básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Program Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico de tuberculose, v. 9, n. 2, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 20 jul 2011.

BRICKS, L. F. Vacina BCG: via percutânea ou intradérmica? **J. Pediatr**, v. 80, n. 2, p. 93-8, 2004.

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

BURRILL, J. et al. Tuberculosis: a radiologic review. **Radiographics**, v. 27, n. 5, p. 1255-1273, 2007.

CALVER, A. D. et al. Emergence of increased resistance and extensively drug-resistant tuberculosis despite treatment adherence, South Africa. **Emerg Infect Dis**, v.16, n. 2, fev, 2010.

CAMPOS H. S. Etiopatologia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**. v. 15, n. 1, p. 29-35, 2006.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n.11, p. 537-543, jun. 1998.

CONDE, M. B. (Coord), et al. III Diretrizes para tuberculose da sociedade brasileira de pneumologia e tisiologia. **J Bras Pneumol**, v.35, n.10, p.1018–1048, 2009.

DENISE, D. N; MORISSONI, P. Novos métodos na tuberculose pleural. **Pulmão**, v.16, p. 32-38, 2007.

DUARTE, R. Teste tuberculínico. Como otimizar? **Rev Port. Pneumol**, v. 15, n. 2, p. 295-304, 2009.

FERRAZ, J. C. et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 11, 2006.

GANGULY, N. et al. Mycobacterium tuberculosis 6-kDa early secreted antigenic target (ESAT-6) protein downregulates lipopolysaccharide induced c-myc expression by modulating the extracellular signal regulated kinases ½.

GUERRA R. L.; REGO, L.; CONDE, M. B. Diagnostico da tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa. **Pulmão**, v. 17, n. 2/4, p. 87-90, 2008.

GUO, et al. The CFP-10/ESAT-6 complex of mycobacterium tuberculosis potentiates the activation of murine macrophages involvement of IFN- signaling. **Med Microbiol Immunol**, v. 199, p. 129–137, 2010.

HERNANDEZ, J. et al. Low number of peripheral blood b lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. **Immunol Invest**, v. 39, n.197/205, 2010.

HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Immunology, Pathogenesis, Virulence. Tuberculossi. **Basic Science to Patient Care** 2007, n5, p.1157-189, 2007.

INOKUCHI, N. Relationship between whole-blood interferon-gamma production and extent of radiographic disease in patients with pulmonary tuberculosis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 46, n. 2, p.109-114, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v.11. n. 5, 2010.

KHADER A.S. et al. IL-23 compensates for the absence for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN- $\gamma$  responses if IL-12p70 is available. **J Immunol**, v. 175, p. 788-795, 2005.

KUNST, H. Diagnosis of latent tuberculosis infection: the potential role of new technologies. **Respir Med**, v. 100, p. 2098–2106, 2006.

MACHADO JÚNIOR., A. et al., Risk factors for failure to complete a course of latent tuberculosis infection treatment in Salvador, Brazil, **Int J Tuberc Lung Dis**, n.13, p.719–725, 2009.

MADARIAGA, M. G.; JALALI, Z.; SWINDELLS, S. Clinical Utility of Interferon Gamma Assay in the Diagnosis of Tuberculosis. **J Am Board Fam Med**, n. 20, p. 6, 2007.

MAJLESS L. et al. Influence of ESAT-6 Secretion System 1 (RD1) of Mycobacterium tuberculosis on the Interaction between Mycobacteria and the Host Immune System. **J Immunol**, n. 174, p. 3570-3579, oct. 2005.

MARAIS, B. J. et al. Diversity of disease in childhood pulmonary tuberculosis. **Ann Trop Paediat**, v. 25, p. 79–86, 2005.

MATTOS A. M.M., et al. Increased IgG1, IFN-g, TNF-a and IL-6 responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with Tuberculosis are lower after chemotherapy. **Int Immunol**, v. 22, n. 9, p. 775–782, 2010.

MATULIS G. et al. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases: performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen-specific interferon gamma assay. **Ann Rheum Dis. Bern**, v. 67, n. 1, p. 84-90, jan. 2007.

MARQUES, Claudia Diniz Lopes. **Avaliação do Teste T-SPOT.TB no Diagnóstico de Infecção Tuberculosa Latente em Pacientes Com Artrite Reumatoide**. 144f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

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

- MOHAN et al .Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology . **Infec Immun**, v. 69, p.1847–1855, 2001.
- MOUTINHO, I. L. D. et al . Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 1, p. 42-48, 2011.
- NANCY A. et al. Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. **Crit Care Nurse**, v. 29, n. 2, apr. 2009.
- NICOD, L. P. Immunology of tuberculosis. **Swiss Med Wkly**, v. 137, p. 357–362, 2007.
- OZBEC N. et al. Interleukin-12 receptor b1 chain deficiency in a child with disseminated tuberculosis. **Clin Infect Dis**, v. 40, p. 55–8, 2005.
- PEREIRA, S. et al. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. **Rev Saúde Pública**, v. 41, p. 59-66, 2007. Suplemento 1.
- PEREZ, D. P. P. et al. Comparative and prospective study of different immune parameters in healthy subjects at risk for tuberculosis and in tuberculosis Patients. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 299–307, 2002.
- PEREZI, E. et al. Citocinas e proteínas de fase aguda do soro como marcadores de regressão da resposta inflamatória ao tratamento da tuberculose pulmonar. **J Bras Pneumol**, v. 34, n.11, p. 942-949, 2008.
- PINXREM, V. L. A. H, et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. **Am Soc Microbiol Clin**. v. 2, n.7, p, 155-160, 2000.
- ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização, **Bol Pneumol Sanit**, v. 9, n. 1, p. 35-59, 2001.
- SAUZULLO, I. et al. In vivo and in vitro effects of antituberculosis treatment on mycobacterial interferon- c T cell response. **Plos One**, v.4, n.4, p. 187, 2009.
- SCHUCK, S. D., et al. Identification of T-Cell antigens specific for latent mycobacterium tuberculosis infection. **Plos One**, v. 4, n. 5, p. 5590, 2009.
- SHANAUBE, K. et al. Risk factors associated with positive quantiferon-TB gold in-tube and tuberculin skin tests results in Zambia and South Africa. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. 18206, 2011.
- SILVA, J. R. L.; BOÉCHA, N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. **J Bras Pneumol**, v. 30, n. 4, p. 478-484, jul./ago., 2004.
- SINGH, S. et al. Nontuberculous mycobacteriae infections in Indian AIDS patients detected by a novel set of ESAT-6 polymerase chain reaction primers. **J Infect Dis**, v. 60, p. 14-18, 2007.



SMALL, P. M.; FUJIWARA P. I. Management of tuberculosis in the United States. **N Engl J Med**, v. 345, n. 3, 19 jul. 2001.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T.A.R. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Quim Nova**, v. 28, n. 4, p. 678-682, 2005.

TAKEUCHI O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805–820, 2010.

TEIXEIRA, H. C. et al. Avaliação de novos antígenos do mycobacterium tuberculosis para vacinação e diagnóstico precoce da tuberculose. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 57., 2005, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: [s.n], 2005.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso,.**J Bras Pneumol**, v. 33, n. 3, p. 323-334, 2007.

TIAN, C.et. al. The 874T/A polymorphism in the interferon- gene and tuberculosis risk: an update by meta-analysis, **ASHA**, v. 72, p. 1137-1142, 2011.

UMA, H., et al. Lymphocytotoxic antibodies and Immunity in pulmonary tuberculosis. **Indian J Med Res**, n.109, p. 5.10, 1999.

VILAPLANA, C. et al. The tuberculin skin test increases the responses measured by t cell interferon-gamma release assays. **Scand J Immunol**, v. 67, p. 610–617, 2008.

WANG, X. et al. ESAT-6 inhibits production of IFN- $\gamma$  by mycobacterium tuberculosis-responsive human t cells. **J. Immunol**, v. 182, p. 3668-3677, 2009.

WEIR, R., E. et al. Mycobacterial purified protein derivatives stimulate innate immunity: malawians show enhanced tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 $\gamma$  (IL-1 $\gamma$ ), and IL-10 responses compared to those of adolescents in the United Kingdom. **Infect Immun**, p.1807–1811, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing**: WHO. Geneva, Switzerland: WHO, 2009.



## ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
Salvador, 24 de julho de 2009.

**OFÍCIO Nº. 86/2009**

REFERENTE AO PROTOCOLO Nº. 119/2008


“PEDRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNODIAGNÓSTICOS INVITRO ALTERNATIVOS PARA TUBERCULOSE HUMANA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INVITRO A DIFERENTES ANTÍGENOS MYCOBACTERIUM SP E CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS”

Pesquisador: Prof<sup>o</sup>. JOSÉ MAYER NASCIMENTO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, após a análise do ponto de vista bioético das correções de pendências do Protocolo acima citado, recebidas em 26.03.09, considera que o Protocolo atende aos princípios éticos em pesquisa em seres humanos, segundo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP CNS-MS). Diante do exposto julga o protocolo supracitado **APROVADO**.

Lembramos a necessidade do envio de relatório anual do andamento da pesquisa, dentro do cronograma citado no mesmo protocolo.

Saudações,

  
Profa. Dra. Lucíola Maria Lopes Crisóstomo  
Coordenadora do CEP/EBMSP/FBDC

Ilmo.. Sr.  
PROF. JOSÉ MAYER NASCIMENTO  
Rua Amazonas, 499 – Apt. 402- Pituba  
CEP. 41.830.980 – Salvador - Bahia

Salvador, 24 de julho de 2009.

## ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
Instituto de Ciências da Saúde  
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, numa pesquisa científica. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra, do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Se tiver alguma dúvida, você deve procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do(a) Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (CEP/EBMSP), na Av.Dom João VI, 274 – Brotas / CEP 40285-001, telefone (71) 2101-1900 — falar com a senhora Maria de Lourdes.

## INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

**1. Instituição.** Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde (Labimuno/ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA). Endereço: Rua Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela.

**2. Título do Projeto.** Padronização de teste imunodiagnóstico *in vitro* para tuberculose humana e avaliação *in vitro* a diferentes antígenos de *Mycobacterium sp* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

**3. Pesquisador Responsável.** Prof. Dr. José Roberto Meyer Nascimento no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Endereço: Rua Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela.

## 4. Descrição da pesquisa

**4.1 Justificativa.** Aproximadamente um terço da população mundial tem a tuberculose. Esta doença é causada por uma bactéria, chamada de *Mycobacterium tuberculosis*. Atualmente, para descobrir se uma pessoa tem tuberculose, o médico solicita exames de Raios-X e de laboratório. Muitas vezes, com os exames de laboratório realizados, não se consegue diagnosticar se o paciente tem ou não a tuberculose. Os exames atuais são demorados ou incômodos para o paciente pela necessidade do retorno alguns dias depois para a leitura do teste. Alguns países já

utilizam um teste internacional para auxiliar no diagnóstico da tuberculose, mas, para o Brasil, esse teste é muito caro. Por isso, os pesquisadores e médicos procuram alternativas mais baratas produzidas com qualidade e dentro da possibilidade do nosso país. Logo, os pesquisadores do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia (LABIMUNO da UFBA), tentam o desenvolvimento de um exame de laboratório para uso nacional para ser usado, em substituição ao exame internacional disponível nos países mais ricos e que seja acessível a maior parte da população brasileira.

**4.2 Objetivos.** Desenvolver um exame de laboratório mais barato e adequado à nossa realidade para auxiliar no diagnóstico da tuberculose humana.

**4.3 Metodologia.** Você está sendo convidado a participar porque você tem queixas e sintomas (febre, tosse e emagrecimento) que sugerem que você tem tuberculose (Grupo I da pesquisa), ou por que você tem exame de PPD positivo (grupo II da pesquisa) ou porque você faz parte do terceiro grupo que não tem tuberculose e também não apresenta PPD positivo. Caso concorde em participar faremos a coleta de 25 mL do seu sangue (1/2 copinho de café) que serão utilizados para contagem das células do sangue (leucograma), para os testes laboratoriais de capacidade de resposta às bactérias e microrganismos causadores de doenças relacionadas com a tuberculose e para o desenvolvimento de testes que substituam os atuais usados no diagnóstico da tuberculose.

**5. Riscos, prejuízos, desconfortos, lesões que possam decorrer da pesquisa.** Os riscos associados a esta coleta de sangue são limitados a pequenos desconfortos no local da punção sanguínea, ou, no máximo, a uma pequena mancha roxa no local da coleta.

**6. Benefícios derivados da participação nesta pesquisa.** Você não terá nenhum benefício financeiro por sua participação neste estudo, entretanto, caso durante a pesquisa com nossos testes seja identificado alterações, você será encaminhado a atendimento em unidade especializada de saúde pública. Você será encaminhado para tratamento no Instituto Brasileiro de Investigação para a Tuberculose (IBIT), se for descoberto que você sofre de tuberculose, e se já recebe cuidados contra a tuberculose, continuará seu tratamento normalmente, tudo isso mesmo que desista, em qualquer momento, de participar deste estudo. Caso concorde você poderá buscar os resultados do leucograma no local e período

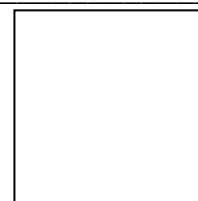
indicados no protocolo que lhe será entregue no momento da coleta para esse projeto. A comunidade poderá futuramente usufruir dos benefícios da melhoria no diagnóstico da tuberculose.

**8. Canais de esclarecimento (antes, durante e após a execução do estudo) sobre a própria pesquisa.** Sempre que desejar você poderá esclarecer suas dúvidas através do telefone (71) 3235-9682, ramal 223 (ligações a cobrar se necessário).

**9. Sigilo em relação à privacidade do sujeito de pesquisa e confidencialidade de seus dados.** Além do sangue, precisaremos ter acesso aos dados do seu prontuário médico para melhor análise da pesquisa e para divulgação em congressos e revistas médicas, mas seus dados serão protegidos e jamais será divulgada sua identidade.

Assinatura do PESQUISADOR RESPONSÁVEL  
 CONSENTIMENTO DO SUJEITO DA PESQUISA

Eu,



.....  
 ....., RG nº ..... e CPF nº .....,  
 prontuário nº ....., abaixo assinado, concordo de maneira livre e esclarecida em participar, na condição de sujeito de pesquisa, do estudo intitulado “Padronização de teste imunodiagnóstico *in vitro* para tuberculose humana e avaliação *in vitro* a diferentes antígenos de *Mycobacterium sp* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*”. Fui devidamente informado(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como sobre os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me assegurado o sigilo, em relação à privacidade do sujeito de pesquisa, e garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência e/ou tratamento.

Cidade do Salvador, Bahia, ..... de ..... de 2010.

Nome completo e legível

Assinatura (ou impressão digital) do sujeito e/ou de seu representante legal

Nós, testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores, presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos detalhados sobre o estudo e aceite do sujeito de pesquisa em participar deste protocolo.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ CPFnº: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

CPFnº: \_\_\_\_\_

## ANEXO III - FICHA CLÍNICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
 LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR

## FICHA CLÍNICA

Sub-Projeto: “Padronização de testes imunodiagnósticos *in vitro* alternativo para tuberculose humana e avaliação da resposta *in vitro* a diferentes antígenos de *Mycobacterium sp* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.”

Nome do entrevistador: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Identificação do paciente:

|   |  |  |
|---|--|--|
| Registro                                    |  |  |
| Nome Completo                               |  |  |
| Procedência                                 | 1.IBIT 2.HEOM 3.OUTROS   |  |
| Gênero                                      | 1.MASCULINO 2.FEMININO   |  |
| Data de Nascimento                          |  |  |
| Naturalidade                                |  |  |
| Profissão                                   |  |  |
| Grau de Instrução                           | 1.Fundamental Incompleto<br>2.Fundamental Completo<br>3.Nível Médio Incompleto<br>4.Nível Médio Completo<br>5.Superior Incompleto<br>6.Superior Completo |  |
| Endereço                                    |  |  |
| Telefone                                    |  |  |
| Classificação Étnica<br>(auto-referenciada) | 1.BRANCO 2.MESTIÇO<br>3.NEGRO 4.ÍNDIO  |  |



## Dados Clínico-Laboratoriais:

|   |  |
|---|--|
| O paciente já realizou a BACILOSCOPIA?<br>(Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 4</b> )<br><b>OBS:</b> BACILOSCOPIA = Exame de escarro | 1.SIM      2.NÃO      3.Não sei/Não lembro   |
| Resultado da BACILOSCOPIA<br>(Se <b>NEGATIVO</b> , pular para a <b>questão 4</b> )  | 1.POSITIVO      2.NEGATIVO      3.Não sei/Não lembro   |
| <b>Se POSITIVO</b> , qual a classificação?  | 1.1+      2.2+      3.3+      4.4+      5.Não sei/Não lembro   |
| O paciente já realizou o exame CULTURA?<br>(Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 6</b> )   | 1.SIM      2.NÃO      3.Não sei/Não lembro   |
| <b>Se SIM</b> , qual foi o resultado?   | 1.POSITIVO      2.NEGATIVO      3.Não sei/Não lembro   |
| O paciente já realizou o exame PPD?<br>(Explicar ao paciente como é o exame)<br>(Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 8</b> )          | 1.SIM      2.NÃO   |
| Qual foi o resultado do PPD?  | 1.0 a 4mm<br>2.5 a 9mm<br>3.>10mm (Não reator) (Fraco reator) (Forte reator)<br>4. Não sei/Não lembro  |
| O paciente já tomou a vacina BCG?   | 1.SIM      2.NÃO   |
| O paciente tem a cicatriz da BCG?<br>(Olhar o braço direito do paciente)  | 1.SIM      2.NÃO   |
| O paciente está em tratamento?<br>(Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 13</b> )   | 1.SIM      2.NÃO   |
| O tratamento atual tem quanto tempo?  | 1.Um mês      2.Dois meses      3.Três meses<br>4.Quatro meses      5.Cinco meses<br>6.Seis meses<br>7. Mais que seis meses  |
| Quais as drogas utilizadas no tratamento atual?<br>(Pular para a questão 17)  | 1.Isoniazida      2.Rifampicina<br>3.Pirazinamida      4.Etambutol<br>5.Estreptomicina      6.Etionamida<br>7.Não sei/Não lembro<br>8.Outros(especificar)<br>_____ |
| O paciente tem ou já teve contato com um possível COMUNICANTE da tuberculose?<br>(Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 15</b> )        | 1.SIM      2.NÃO   |

OBS: Comprimidos "vermelhos" = Isoniazida e Rifampicina; Comprimidos "brancos" = Pirazinamida

|   |  |
|---|--|
| Qual tipo de contato?   | 1.Domiciliar 2.Trabalho<br>3.Vizinhos 4.Outros   |
| O paciente utiliza ou já utilizou profilaxia (isoniazida profilático)?<br>(Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 17</b> )         | 1.SIM 2.NÃO  |
| <b>Se SIM</b> , por quanto tempo?   | 1.Um mês 2.Dois meses<br>3.Três meses 4.Quatro meses<br>5.Cinco meses 6.Seis meses<br>7.Não sei/Não lembro   |
| O paciente faz uso de algum medicamento que <b>não seja para tuberculose</b> ?<br>(Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 19</b> ) | 1.SIM 2.NÃO  |
| Se SIM, <b>qual</b> ou <b>quais</b> ?<br><br>(especificar)  |  |
| 19. Grupo no estudo   | 1.Grupo I (Tuberculose sintomática –<br>Baciloscopia + e/ ou cultura +)<br>2.Grupo II (Assintomático; PPD<br>positivo)<br>3.Grupo III (Assintomático; PPD<br>negativo ou sem PPD)<br><br>OBS: PPD positivo = maior que 5mm |

## ANEXO IV – ATESTADO DE CORREÇÃO DAS REGRAS DA ABNT E REVISÃO LINGUÍSTICA



### ATESTADO

Eu Silvana Pereira da Silva, coordenadora do Serviço de Apoio a Atividade Médico - Científica da Associação Bahiana de Medicina, atesto para os devidos fins que prestei serviços de editoração eletrônica seguindo as orientações contidas na norma ABNT NBR 14724:2011 – Trabalhos acadêmicos – Apresentação (modelo fornecido pela Instituição), tendo como parceira para revisão e adequação da norma ABNT NBR 6023:2002 – Referências – Elaboração, a Bibliotecária Eliete Costa de Souza Brito CRB5/998, e Fernanda Machado, que colaborou com a revisão linguística seguindo as orientações do novo acordo ortográfico, o resultado de pesquisa da Dra. Claudia dos Reis Motta intitulado: PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE INFECÇÃO LATENTE E TUBERCULOSE A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium Tuberculosis* no *Quantiferon®-TB GOLD TEST IN TUBE - Cellestis Limited, Carnegie, Austrália* que será submetido à apreciação do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) – UFBA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Songeli Menezes Freire.

Salvador, 26 de março de 2012.

Silvana Pereira da Silva

CPF: 872034805-34



**Instituto de Ciências da Saúde  
Programa de Pós Graduação  
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas  
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100  
Salvador, Bahia, Brasil**

**<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>**